

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 452**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7115 (2006.01) **C12N 15/117** (2010.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2007 PCT/EP2007/007024**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2017 WO08017473**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2007 E 07801562 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2056845**

54 Título: **Estructura y uso de oligonucleótidos 5' fosfato**

30 Prioridad:

08.08.2006 EP 06016578
10.10.2006 EP 06021271

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HORNUNG, VEIT y
HARTMANN, GUNTHER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 647 452 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

Estructura y uso de oligonucleótidos 5' fosfato

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia y el descubrimiento de fármacos. La presente invención proporciona oligonucleótidos que son capaces de inducir la producción de IFN tipo I, para uso en la inducción de la apoptosis de células tumorales por medio de la unión a RIG-I, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

10 Las diferentes maneras establecidas en el sistema inmunitario de los vertebrados para detectar patógenos invasores se basan en ciertas características de los ácidos nucleicos microbianos. La detección de ácidos nucleicos microbianos alerta al sistema inmunitario para montar el tipo apropiado de respuesta inmunitaria que se requiere para la defensa contra el tipo respectivo de patógeno detectado. La detección de ácidos nucleicos víricos lleva a la producción de interferón tipo I (IFN), incluyendo IFN- α e IFN- β , las citocinas clave para la defensa antivírica.

15 El IFN- α fue el primer tipo de interferón identificado y comercializado; es ampliamente utilizado clínicamente en el tratamiento de una variedad de tumores (por ejemplo, leucemia de células pilosas, leucemia cutánea de células T, leucemia mieloide crónica, linfoma no Hodgkin, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, melanoma maligno, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, carcinoma de células de la vejiga, carcinoma de colon, displasia de cuello uterino) y enfermedades víricas (por ejemplo, hepatitis B crónica, hepatitis C crónica). Los productos de IFN- α que están actualmente en uso clínico incluyen la proteína recombinante y la proteína natural altamente purificada, las cuales tienen ambas altos costes de producción. Por lo tanto, existe la necesidad de modos más económicos de proporcionar IFN- α a los pacientes que lo necesiten. Por otra parte, el IFN- α se administra actualmente sistemáticamente y provoca un amplio espectro de efectos secundarios (por ejemplo, fatiga, síntomas de tipo gripal, diarrea). Lo más alarmante, el IFN- α causa una disminución en la función de la médula ósea que lleva a una mayor sensibilidad a infecciones con peligro para la vida, a anemia y a problemas de hemorragia. Por lo tanto, existe la necesidad de métodos para proporcionar IFN- α de una manera más localizada (es decir, específica de la diana) para reducir la aparición de efectos secundarios.

20 La detección, mediada por el receptor, de ácidos nucleicos derivados de patógenos ayuda a proteger el genoma del hospedante de la invasión de material genético extraño. Está evolucionando una nueva imagen en la que la capacidad de los sistemas biológicos para detectar ácidos nucleicos víricos por medio de interacciones del ligando de ácido nucleico con el receptor de proteína es crucial para mantener la integridad del genoma y para la supervivencia.

25 Han evolucionado una serie de proteínas receptoras que toman parte en el reconocimiento del ácido nucleico. Estudios recientes indican que uno de los receptores de proteínas más importantes para la defensa antivírica es la proteína I inducible por el ácido retinoico (RIG-I), un miembro de la familia de las helicasas que contiene dos dominios de reclutamiento de caspasas (CARDs) y un dominio helicasa DExD/H-box (M. Yoneyama *et al.*, Nat Immunol 5, 730 (Jul, 2004)). El reconocimiento, mediado por RIG-I, de un conjunto específico de virus RNA (*flaviviridae*, *paramyxoviridae*, *orthomyxoviridae* y *rhodoviridae*) (M. Yoneyama *et al.*, Nat Immunol 5, 730 (Jul, 2004); R. Sumpter, Jr. *et al.*, J Virol 79, 2689 (Mar, 2005); H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006)) tiene un papel crítico en la defensa antivírica del hospedante *in vitro* e *in vivo*. Un segundo miembro de la familia de las helicasas, MDA-5 (factor asociado a la diferenciación del melanoma), es responsable de la defensa antivírica frente a un conjunto recíproco de virus RNA (*picornaviridae*) (H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006)).

Además de RIG-I y MDA-5, los cuatro miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR), TLR3, TLR7, TLR9 y TLR9, son conocidos también por estar implicados en el reconocimiento del ácido nucleico vírico. RIG-I y MDA-5 difieren de los TLR en su localización subcelular, patrón de expresión, rutas de transducción de señales y ligandos.

45 Mientras que RIG-I y MDA-5 son receptores citosólicos, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran en la membrana endosómica.

Mientras que los TLR se expresan principalmente en ciertos subconjuntos de células inmunitarias definidas (esto es, TLR9 restringido a las células PDC y células B), RIG-I y MDA-5 se expresan tanto en las células inmunitarias como en las no inmunitarias (H. Kato *et al.*, Immunity 23, 19 (Jul, 2005)).

50 Además de distintos perfiles de expresión y localización celular, la señalización de los TLR endosómicos y de los dos receptores citoplasmáticos RIG-I y MDA-5 difiere. Mientras que TLR3 señala por medio de TRIF (receptor Toll de interferón) y TLR7, TLR8 y TLR9 señalan por medio de MyD88, RIG-I recluta a un adaptador que contiene CARD, IPS-1 (T. Kawai *et al.*, Nat Immunol 6, 981 (Oct, 2005)) (conocido también como MAVS (R. B. Seth *et al.*, Cell 122, 669 (Sep 9, 2005)), VISA (L.G. Xu *et al.*, Mol Cell 19, 727 (16 Sep, 2005)) o Cardif (E. Meylan *et al.*, Nature 437, 1167 (Oct. 20, 2005))). El IPS-1 transmite la señal a las cinasas TBK1 e IKK-i, las cuales fosforilan el factor regulador de interferón-3 (IRF-3) y el IRF-7, factores esenciales de transcripción para la expresión de interferones

tipo I. Como consecuencia, *in vivo*, los receptores de ácido nucleico endosómicos y citoplasmáticos inducen diferentes patrones de citocinas. Por ejemplo, tanto TLR3 como MDA-5 contribuyen a la producción de IL-12 en respuesta a poli(I:C), mientras que MDA-5 pero no TLR3 es responsable de la inducción de IFN- α (H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006)).

5 El ligando para TLR3 es RNA de cadena doble (dsRNA) largo tal como poli(I:C) (L. Alexopoulou, *et al.*, Nature 413, 732 (Oct 18, 2001)), para TLR7 es RNA de cadena sencilla (ssRNA) (SS Diebold *et al.*, Science 303, 1529 (Mar 5, 2004); F. Heil *et al.*, Science 303, 1526 (Mar 5, 2004)) y dsRNA corto con ciertos motivos de secuencia (es decir, el RNA inmunoestimulante, isRNA) (V. Hornung *et al.*, Nat. Med 11, 263 (Mar, 2005)), y para TLR9 el DNA con CpG (A.M. Krieg *et al.*, Nature 374, 546 (Apr 6, 1995); H. Hemmi *et al.*, Nature 408, 740 (Dec 7, 2000)).

10 En varios estudios, se propuso RNA de cadena doble largo para ser el ligando para MDA-5 y RIG-I (M. Yoneyama *et al.*, Nat Immunol 5, 730 (Jul, 2004); H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006); S. Rothenfusser *et al.*, J Immunol 175, 5260 (Oct 15, 2005)). Un imitador sintético de dsRNA largo es poli(I:C). Datos recientes han demostrado que poli(I:C) es un ligando para MDA-5, mientras que no es reconocido por RIG-I (H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006)). Por otra parte, se encontró un dsRNA largo para activar RIG-I, pero no MDA-5 (H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006)). Esta discrepancia de actividad de dsRNA largo y poli(I:C) sugiere que hay más para el reconocimiento de RNA citoplásmico que el dsRNA largo.

En general, se cree que la compartimentación y la diferente estructura molecular contribuyen a la detección de ácidos nucleicos extraños. El DNA (G. M. Barton *et al.*, Nat Immunol 7, 49 (Jan, 2006)) y el RNA (F. Heil *et al.*, Science 303, 1526 (Mar 5, 2004)) localizados en el endosoma o el DNA localizado en el citoplasma (K. J. Ishii *et al.*, Nat Immunol 7, 40 (Jan, 2006)) son reconocidos y por lo tanto interpretados como extraños. La frecuencia de los denominados motivos CpG en DNA microbiano sirve como una característica molecular que mejora aún más la distinción de DNA propio y no propio en el endosoma. Aunque el reconocimiento de RNA en el endosoma es dependiente de la secuencia (F. Heil *et al.*, Science 303, 1526 (Mar 5, 2004); V. Hornung *et al.*, Nat Med 11, 263 (Mar, 2005)), no se han definido hasta ahora motivos de secuencia que sirvan como una base molecular para mejorar la distinción del RNA propio y del no propio (esto es, motivos que sean más frecuentes en el RNA vírico que en el propio) en el citoplasma. En cambio, la característica molecular de tener cadena doble parece permitir la distinción entre el RNA propio y el no propio. De hecho, en el endosoma, el RNA largo de cadena doble y su imitador poli(I:C), pero no el RNA de cadena sencilla, se reconocen por medio de TLR3 (L. Alexopoulou, *et al.*, Nature 413, 732 (Oct 18, 2001)). En el citoplasma, la abundancia de RNA propio complica el entender el reconocimiento de RNA no propio. Sin embargo, el concepto de que el dsRNA largo se detecta en el citoplasma como no propio nunca ha sido cuestionado desde el descubrimiento del IFN tipo I.

Al contrario que en ausencia de RIG-I y MDA-5, la defensa antivírica se mantiene en gran medida en ausencia de los TLR (A. Krug *et al.*, Immunity 21, 107 (Jul, 2004); K. Tabeta *et al.*, Proc. Natl Acad Sci USA 101, 3516 (Mar 9, 2004); T. Delale *et al.*, J Immunol 175, 6723 (Nov 15, 2005); K. Yang *et al.*, Immunity 23, 465 (Nov, 2005)), lo que subraya el papel crítico de RIG-I y MDA-5 en las respuestas antivíricas.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar oligonucleótidos que sean capaces de estimular la producción de IFN tipo I, en un paciente para uso en la inducción de la apoptosis de células tumorales por medio de la unión a RIG-I en el tratamiento de un tumor, como se define en las reivindicaciones.

Un estudio reciente ha demostrado que los siRNA (RNA interferentes pequeños) transcritos *in vitro*, pero no los siRNA sintéticos, estimulaban la producción de IFN tipo I a partir de líneas celulares seleccionadas (D. H. Kim *et al.*, Nat Biotechnol 22, 321 (Mar, 2004); US 2006/0178334). Sin embargo, los requisitos estructurales y la relevancia fisiológica de esta inducción y el mecanismo de detección no están claros. Además, en el trabajo de Kim *et al.*, los siRNA transcritos *in vitro*, con independencia de su secuencia de nucleótidos, indujeron la producción de IFN tipo I tanto en las células infectadas por virus como en las no infectadas, independientemente de si los mRNA diana estaban presentes o no, llevando a la muerte celular. En otras palabras, los siRNA transcritos *in vitro* indujeron la producción de IFN y, en consecuencia, la muerte celular, de una manera no dependiente de la secuencia y no específica de las células diana. La falta de especificidad de la secuencia y de las células limita gravemente, si es que no excluye, el uso de tales siRNA transcritos *in vitro* para fines terapéuticos.

El documento WO 2005/005632 A2 describe siRNAs, que debido a su especificidad para las subunidades de la proteína cinasa CK2 son adecuados para tratar el cáncer. El documento US 2005/0222060 A1 describe ligandos de TLR-3 en forma de polinucleótidos de cadena doble. El documento WO 01/68077 A2 describe secuencias y motivos de secuencias de RNA inmunoestimulante. Schlee *et al.*, Molecular Therapy 14(4): 463-470 (2006) describe siRNAs y RNAs inmunoestimulantes con foco sobre los motivos de reconocimiento de TLR.

Es por tanto un objetivo adicional de la presente invención proporcionar oligonucleótidos que son capaces de inducir una respuesta de IFN tipo I, de una manera dependiente de la secuencia de nucleótido y específica de la célula diana. Tales oligonucleótidos se pueden usar ventajosamente para el tratamiento de enfermedades y trastornos tales como tumores sin dañar a las células espectadoras (es decir, sanas, no infectadas o no enfermas).

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un oligonucleótido para uso en la inducción de la apoptosis de células tumorales por medio de la unión a RIG-I en el tratamiento de un tumor, como se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1: El RNA transcrito *in vitro* induce una potente respuesta de IFN- α en los monocitos humanos

(A) Se sembraron en placas de 96 pocillos, PDCs (células dendríticas plasmacitoides) y monocitos y se transfectoron con 200 ng de RNA transcrito *in vitro* (RNA IVT) (2500 nucleótidos, nt). Se utilizaron CpG-A (3 μ g/ml) y R848 (10 μ M) como estímulos de control para inducción de IFN- α mediada por TLR9 o por TLR7 en PDC. Se recogió el sobrenadante 24 horas después de la estimulación y se evaluó la producción de IFN- α por medio de ELISA. Se resumieron los datos de dos donantes independientes y se representan como valores medios \pm SEM.

(B) Se utilizó pBluescript KS para generar moldes de DNA de diferentes longitudes para la transcripción *in vitro* (panel inferior). Los RNA transcritos *in vitro* se analizaron sobre un gel de agarosa desnaturante al 4 % antes de la transfección. Posteriormente, los RNA generados *in vitro* se transfectoron a las PDC purificadas y a los monocitos sembrados en placas de 96 pocillos. 24 horas después de la transfección se analizaron los sobrenadantes para la producción de IFN- α . Se resumieron los datos de dos donantes independientes y se representan como valores medios \pm SEM.

(C) Se generó un conjunto de oligonucleótidos de RNA que varían de 27 a 9 nucleótidos (nt) acortando gradualmente un oligonucleótido de 27 unidades monoméricas desde el extremo 3' en etapas de tres nucleótidos. Los monocitos purificados se transfectoron con los respectivos oligonucleótidos y se analizó la producción de IFN- α 24 horas después de la estimulación. Los datos de cinco donantes independientes se normalizaron al nivel de inducción de IFN- α del oligonucleótido de 27 nucleótidos (5876 \pm 1785 pg/ml) y se resumieron como valores medios \pm SEM.

(D) Los monocitos purificados se transfectoron con 200 ng de RNA transcrito *in vitro* con diferentes colas homopoliméricas en 3'. Se incluyó Tri-GFPs como un control positivo. 24 horas después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes y se evaluó la producción de IFN- α por medio de ELISA. Se resumieron los datos de cuatro donantes independientes y se representan como valores medios \pm SEM.

Figura 2: Los oligonucleótidos de RNA 5' fosforilados, pero no sintéticos, son potentes inductores de IFN- α en los monocitos humanos

(A) Se transfectó RNA9.2s (200 ng) sintetizado sintéticamente o transcrito enzimáticamente a monocitos purificados o a PDCs. Se incluyeron CpG-A (3 mg/ml) y R848 (10 μ M) como estímulos de control positivo para la inducción de IFN- α mediada por TLR9 o TLR7 en PDC. Se resumieron los datos de dos donantes (monocitos) o de tres donantes (PDCs) independientes y se representan como valores medios \pm SEM.

(B) La cadena sentido (tri-GFPs) y la cadena antisentido (tri-GFPa) de un siRNA anti-GFP establecido se transcribieron utilizando transcripción *in vitro*. Tanto los componentes de cadena sencilla como los de la molécula hibridada de RNA de cadena doble (todos a 200 ng) se transfectoron a monocitos purificados. Además, la molécula de dsRNA se incubó con RNasa T1 para eliminar los extremos colgantes de 5' de ambas cadenas. Los datos de dos donantes independientes se representan como valores medios \pm SEM.

(C) Se utilizó fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) para desfosforilar la tri-GFPs y la tri-GFPa. Los oligonucleótidos de RNA sin tratar o desfosforilados fueron transfectorados posteriormente a los monocitos y a las PDC. Los datos de dos donantes independientes se normalizaron al respectivo oligonucleótido de control no tratado y se representan como valores medios \pm SEM.

Figura 3: La caperuza de 7-metil-guanosina y las modificaciones de bases específicas de eucariotas suprimen la inducción de IFN- α por medio de RNA 5' trifosfato

(A) Se transcribieron moléculas de RNA de diversas longitudes (27 nucleótidos - 302 nucleótidos) derivadas del plásmido pBKS como un molde (véase la Tabla 1B) en presencia del análogo de caperuza N-7 metil-GpppG (RNA con caperuza m7G) o utilizando NTPs estándar (RNA sin caperuza). Los monocitos purificados se transfectoron con RNA con caperuza m7G o con RNA sin caperuza (200 ng de cada uno) y la producción de IFN- α se evaluó 24 horas después de la estimulación. Para cada transcrito de RNA, los datos de dos donantes independientes se normalizaron al valor de RNA sin caperuza y se resumieron como valores medios \pm SEM. Los valores absolutos para los respectivos transcritos de RNA fueron 1401, 2351, 91, 797 y 2590 pg/ml, respectivamente.

(B) y (C) Se sintetizaron Tri-GFPs y tri-GFPa mediante transcripción *in vitro* en presencia de uridina-5'-trifosfato, pseudouridina-5'-trifosfato (Ψ), 2-tiouridina-5'-trifosfato (s2U) (todos en B) o 2'-O-metiluridina-5'-trifosfato (C). Posteriormente, se transfectoron monocitos purificados y PDCs con los respectivos oligonucleótidos y se evaluó la producción de IFN- α 24 horas después de la estimulación. Para cada transcrito de RNA, los datos de dos (B) o tres

(C) donantes independientes se normalizaron al valor del oligonucleótido de RNA transcrito en presencia de uridina-5'-trifosfato y se resumieron como valores medios \pm SEM.

Figura 4: La inducción de IFN- α mediada por trifosfato requiere RIG-I, pero no MDA5

- 5 (A) Se transfectaron células HEK 293 con cualquiera de RIG-I completo, RIG-IC, RIG-I K270A o el correspondiente vector vacío (todos a 200 ng cada uno) en presencia de pIFN-beta-Luc (300 ng) y pSV-beta galactosidasa (400 ng). Además, se incluyeron o bien nada, o poli I:C, RNA9.2s, tri-GFPs o tri-GFPa sintéticos (todos a 200 ng). 24 horas después de la transfección se evaluó la actividad del reportero pIFN-beta-Luc. Los datos de un experimento representativo de cada tres se normalizaron a la condición de vector vacío, y se representan como valores medios de duplicados \pm SEM.
- 10 (B) Se transfectaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de ratones desprovistos de RIG-I o de MDA5 o los MEF respectivos de ratones naturales, con tri-GFPs o tri-GFPds. Además, se infectaron los MEF con virus de la encefalomiocarditis (EMCV) a una MOI de 1. A las 24 horas después de la estimulación se recogieron los sobrenadantes y se ensayaron para la producción de IFN- β . Se representan los datos de un experimento representativo de cada tres.
- 15 (C) Además, se transfectaron células HEK 293 con RIG-I completo o con RIG-IC (200 ng cada uno) y RNA polimerasa T7 o la RNA polimerasa T7 mutante con el punto transcripcionalmente defectuoso D812N (300 ng cada una) en presencia de pIFN-beta-Luc (300 ng) y pSV-beta galactosidasa (400 ng). Además, se incluyeron o bien nada, o X8dt (vector basado en el soporte pBKS sin promotor de RNA polimerasa T7) o pBKS (todos a 300 ng). 24 horas después de la transfección se evaluó la actividad reportera de pIFN-beta-Luc.
- 20 (D) Además, se transfectaron células HEK 293 con dosis decrecientes de RNA polimerasa T7 en presencia de RIG-I completo o de RIG-IC (200 ng) con nada o con pBKS (300 ng), a la vez que se incluyeron pIFN-beta-Luc (300 ng) y pSV-beta galactosidasa (400 ng). 24 horas después de la transfección se evaluó la actividad del reportero pIFN-beta-Luc. Los datos de un experimento representativo de cada tres se normalizaron a la condición de RIG-IC/pBKS/RNA polimerasa T7 (300 ng) y se representan como valores medios de duplicados \pm SEM.

25 Figura 5: El RNA vírico provoca la inducción de IFN por medio de RIG-I dependiendo de su estado de fosforilación en el extremo 5'

- 30 (A) Se transfectaron células Vero o con vector vacío, o con RIG-I completo o con RIG-IC en presencia del plásmido reportero p125-Luc. 6 horas más tarde, las células o bien se infectaron de forma simulada o se infectaron con RV SAD L16 o con RV SAD Δ PLP a una MOI de 3. Se evaluó la actividad del reportero p125-Luc 48 h después de la transfección de DNA. Los datos medios de dos experimentos realizados por duplicado se muestran como valores medios (simulado = 1) \pm SEM.
- 35 (B) Las células HEK 293T fueron o bien transfectadas de manera simulada con PEI (polietilenimina), o con 1 μ g de RNA total aislado de células BSR no infectadas o de RNA total aislado de células BSR infectadas con RV L16 o con RV Δ PLP. Los aislados de RNA de células BSR no infectadas, de células BSR infectadas con SAD L16 (BSR L16) y de células BSR infectadas con SAD Δ PLP (BSR Δ PLP) se trataron adicionalmente con CIAP y se transfectaron en consecuencia. 48 horas después de la transfección se evaluó la actividad del reportero p125-Luc. Los datos se muestran como valores medios (simulación = 1) de triplicados \pm SEM.
- 40 (C) Para estimular las células HEK 293T se utilizó o bien una simulación, o bien RNA aislado de viriones purificados en gradiente (RV L16) o RNA tratado con CIAP procedente de viriones purificados. Como control positivo, se utilizó un oligonucleótido de RNA transcrito *in vitro* correspondiente a la secuencia líder del 5' terminal (58 nucleótidos) del cRNA de RV SAD L16 para estimular las células HEK 293T. 48 h después de la estimulación se evaluó la actividad del reportero p125-Luc. Los datos del experimento se muestran los valores medios (simulación = 1) de triplicados \pm SEM.

Figura 6: El RNA trifosfato se une directamente a RIG-I

- 45 (A) Se transfectaron transitoriamente células HEK 293 con RIG-I de longitud completa, RIG-I CARD2 o RIG-I Δ HELIC. 36 horas después de la transfección se lisaron las células y se co-incubaron con los oligonucleótidos de RNA indicados (0,375 μ g; panel inferior derecho) durante dos horas a 4 $^{\circ}$ C. A continuación, se añadieron perlas de estreptavidina agarosa durante un período adicional de una hora. Se recogieron las perlas por centrifugación y se lavaron cuatro veces consecutivas. Después de todas las etapas de lavado, se recogieron los sobrenadantes y después de cuatro lavados se recogieron las perlas de estreptavidina-agarosa por centrifugación y se hirvieron en tampón de Laemmli. Para un experimento representativo de dos, se representan la entrada (A, panel izquierdo), los sobrenadantes del primer lavado (1, SN) (A, panel central) y la fracción unida a las perlas (A, panel derecho) (no se observó ninguna o poca señal en el sobrenadante del segundo, tercero y cuarto lavado; no se muestran los datos). Todas las preparaciones se realizaron sobre el mismo gel y las membranas se expusieron durante el mismo período
- 55 de tiempo.

(B) Se inmunoprecipitó RIG-IC utilizando perlas de Flag-agarosa y posteriormente se eluyó por medio de péptido Flag. En analogía con los experimentos anteriores, los oligonucleótidos de RNA representados se añadieron a RIG-IC purificado y posteriormente se co-incubaron con perlas de estreptavidina-agarosa. Si estaba indicado, se utilizó RNasa T1 para eliminar la porción 5' del oligonucleótido que contiene el grupo trifosfato. Las perlas se lavaron cuatro veces consecutivas y el primer sobrenadante y la fracción unida a las perlas se analizaron por transferencia de Western. Se muestra un experimento representativo de tres.

Figura 7: No hay diferencia en la absorción de los oligonucleótidos sintéticos y de los oligonucleótidos de RNA trifosfato en los monocitos

(A) Se marcaron químicamente con fluoróforos Alexa 647 oligonucleótidos sintéticos u oligonucleótidos de RNA transcritos *in vitro* de la secuencia 9.2s, lo que dio como resultado una relación de base:colorante de 81 y 71 respectivamente. Posteriormente, se transfectaron los monocitos purificados con oligonucleótidos de RNA marcados (todos a 50 ng). Dos horas después de la transfección se recogieron las células y se lavaron vigorosamente con EDTA 10 mM en PBS dos veces. La absorción de los oligonucleótidos marcados con fluorescencia se evaluó por citometría de flujo. Los monocitos no tratados se utilizaron para fijar el nivel umbral para las células positivas. Se resumieron los datos de dos donantes independientes y se representan como valores medios \pm SEM.

(B) Se representan histogramas de un donante representativo.

Figura 8: Solamente los oligonucleótidos de RNA iniciados con guanosina trifosfato, pero no con guanosina difosfato, ni con guanosina monofosfato ni con guanosina inducen una potente respuesta de IFN- α en los monocitos humanos.

Utilizando un molde de RNA polimerasa T7 que codifica un oligonucleótido de RNA de 24 unidades monoméricas con solamente una guanosina inicial, se generaron oligonucleótidos de RNA mediante transcripción *in vitro* en presencia de ATP, CTP y UTP y o solamente en presencia de guanosina, guanosina-5'-monofosfato, guanosina-5'-difosfato o guanosina-5'-trifosfato. Posteriormente se transfectaron monocitos purificados con los respectivos oligonucleótidos de RNA (todos a 200 ng) y se analizó la producción de IFN- α 24 horas después de la estimulación. Se resumieron los datos de dos donantes independientes y se representan como valores medios \pm SEM.

Figura 9: Cancelada

Figura 10: Los colgantes en 3' de oligonucleótidos de RNA trifosfato de cadena doble no tienen impacto sobre la actividad inmunoestimulante

Se transfectaron monocitos purificados con cualquiera de tri-27+2s, tri-27+2a, tri-27+0s, tri-27+0a o con los respectivos oligonucleótidos de cadena doble (todos a 200 ng). La producción de IFN- α se analizó 24 horas después de la estimulación. Se resumieron los datos de tres donantes independientes y se representan como valores medios \pm SEM.

Figura 11: La inducción de IFN- α mediada por RNA trifosfato es independiente de la maduración endosómica y de TLR7

(A) y (B) Se preincubaron PDCs purificadas (A) y monocitos (B) con dosis ascendentes por duplicación de cloroquina (39 a 625 ng/ml) y, posteriormente, las células fueron o bien estimuladas con CpG-A (3 g/ml) o bien transfectadas con 200 ng de tri-GFPa. 24 horas después de la incubación se recogieron los sobrenadantes y se evaluó la producción de IFN- α por medio de ELISA. Los datos de dos donantes independientes se resumieron como valores medios \pm SEM.

(C) Se generaron células dendríticas murinas (MDC) a partir de células de médula ósea de cualquiera de los ratones inactivados en TLR7 (TLR7^{-/-}) o de los animales respectivos de control (TLR7^{+/-}). Posteriormente se transfectaron células BM-MDC con 200 ng de tri-GFPs o se estimularon con cualquiera de R848 (10 μ M), CpG-B (3 μ g/ml), CpG-A (3 μ g/ml) o poli I:C (25 μ g/ml). 24 horas después de la incubación se analizaron los sobrenadantes para la producción de IFN- α y de IP-10. Se representa un experimento representativo (media de duplicados \pm SEM) de cada tres.

Figura 12: Los transcritos de trifosfato iniciados con 5' adenosina son superiores a los transcritos iniciados con 5' guanosina en términos de inducción de IFN- α

(A) Se transfectaron monocitos purificados con cualquiera de RNA9.2-0A, RNA9.2s-1G o RNA9.2s-5A (todos a 200 ng) y se analizó la producción de IFN- α 24 horas después de la estimulación. Se resumieron los datos de dos donantes independientes y se representan como valores medios \pm SEM.

(B) Se transfectaron transcritos de RNA derivados del molde A Φ 6.5-35n o del molde G Φ 6.5-35n en monocitos purificados y se evaluó la inducción de IFN- α 24 horas después de la transfección. Se resumieron los datos de tres donantes independientes y se representan como valores medios \pm SEM.

Figura 13: Los oligonucleótidos de RNA 5'-trifosfato iniciados con la secuencia de adenosina en 5' dictan la actividad inductora de IFN- α .

Se generaron oligonucleótidos de RNA trifosfato iniciados con adenosina con todas las permutaciones posibles de bases (A, C, G y U) de la 2^a, 3^a y 4^a posición de la secuencia (5'→ 3') mediante transcripción *in vitro* (véase la Tabla 2). Posteriormente se aislaron los monocitos de tres donantes independientes y se transfectaron con los respectivos oligonucleótidos de RNA. 36 horas después de la transfección, se analizaron los sobrenadantes para producción de IFN- α . Los niveles de inducción de IFN- α obtenidos de todos los oligonucleótidos se normalizaron al nivel de inducción media de todos los oligonucleótidos (= 100 %). Los niveles de inducción normalizados obtenidos de los tres donantes se resumieron como valores medios \pm SEM.

Figura 14: Cancelada

Figura 15: Combinación de funciones inmunoestimulantes potentes con actividad eficiente de silenciamiento génico en una molécula de RNA

(a) Se sembraron células B16 en placas de 24 pocillos. A una confluencia del 50 %, las células B16 se transfectaron con los siRNA sintetizados químicamente seleccionados (anti-Bcl-2 2.1, anti-Bcl-2 2.2 y anti-Bcl-2 2.3) a 1,2 μ g/pocillo (100 pmol) usando lipofectamina 2000 (2,0 μ l). 48 horas después de la transfección se analizó la expresión de proteínas de Bcl-2 murino por transferencia Western. Posteriormente, el siRNA anti-Bcl-2 2.2 (OH-2.2) fue transcrito *in vitro* (denominado 3p-2.2) y se analizó su capacidad para inducir el silenciamiento génico. El siRNA de control y el 3p-GC, un 3p-RNA de cadena doble no específico, sirvieron como control negativo. Se muestra un experimento representativo de cuatro.

(b) Para determinar la expresión endógena de RIG-I, se estimularon células B16 con 3p-2.2 (1,2 μ g/pocillo) e IFN- β murino (1000 U/ml). Después de 6 horas se lisaron las células y se analizaron para la expresión endógena de RIG-I por transferencia Western. Las células HEK293 que sobreexpresan RIG-I de longitud completa sirvieron como control positivo. Se muestra un experimento representativo de dos.

(c) Para monitorizar la activación de IFN- β transitorio en células tumorales, se sembraron células B16 en placas de 24 pocillos y se transfectaron con los plásmidos de expresión indicados utilizando PEI de alto peso molecular o lipofectamina 2000. Se estimularon 24 células con poli(I:C) (200 ng/pocillo), 3p-2.2 (200 ng/pocillo) y OH-2.2 (200 ng/pocillo). El IRF3-5D sirvió como control positivo. 16 h después de la transfección se analizaron las células para la actividad de luciferasa con un luminómetro de microplacas (LUMIstar, BMGLabtechnologies). Los datos se muestran como las medias \pm SEM de tres experimentos independientes (*P<0,05 entre 3p-2.2, OH-2.2 y poli(I:C); ensayo t).

(d) Se sembraron células B16 en placas de 24 pocillos y se co-transfectaron con siRNA sintéticos (10 pmol) y los plásmidos de expresión indicados (200 ng) como se ha descrito. 24 horas después de la transfección se estimularon las células con 3p-2.2 durante 16 horas. Los datos se muestran como las medias \pm SEM de tres experimentos independientes (*P<0,05 entre el control siRNA (siCO) + 3p-2.2 frente a RIG-I siRNA (siRIG-I) + 3p-2.2; ensayo t)

(e) Se transfectaron células B16 con los plásmidos de expresión indicados durante 24 horas y se estimularon con 3p-2.2 durante 16 horas. Los datos se muestran como las medias \pm SEM de dos experimentos independientes (*P<0,05, NS3-4A + 3p-2.2 frente NS3-4A + 3p-2.2; ensayo t).

Figura 16: La transfección de 3p-2.2 desencadena directamente la apoptosis independiente de Cardif en las células tumorales, pero no en las células primarias

Se sembraron células B16 murinas en placas de 24 pocillos y se transfectaron con 3p-2.2 (1,2 μ g/pocillo), OH-2.2 (1,2 μ g/pocillo) y siRNA de control (1,2 μ g/pocillo) utilizando lipofectamina (2,0 μ l). 24 horas después de la transfección se analizaron las células por citometría de flujo para la apoptosis mediante desconexión de las células anexina V-positivas. Se excluyeron las células anexina V-positivas y PI-positivas (últimas células apoptóticas o muertas).

(a) Se muestra un análisis FACS representativo de cuatro experimentos independientes.

(b) Los resultados de la apoptosis de las células B16 se muestran como las medias \pm SEM de cuatro experimentos independientes (P**<0,01 3p-2.2 frente a OH-2.2 y el siRNA de control; ensayo t).

(c) Se sembraron células B16 murinas en placas de 24 pocillos y se transfectaron con pNS3-4A y pNS3-4A* durante 24 h. Después, se lavaron las células y se estimularon durante 24 horas con 3p-2.2 y se determinó el número de células apoptóticas por análisis FACS. Los datos se muestran como las medias \pm SEM de dos experimentos independientes.

(d) Los resultados de la apoptosis en las PBMC humanas se muestran como las medias \pm SEM de dos experimentos independientes.

(e) Se incubaron células B16 con siRNA de control, 3p-2.2 y poli(I:C) durante 24 horas y se evaluaron para la actividad de caspasa-1 por medio de inmunotransferencia. Como control de carga sirvió α -Tublin. Se muestra un experimento representativo de tres.

Figura 17: La producción de IFN- α por 3p-2.2 requiere TLR7 en pDCs y RIG-I en cDCs y se limita a ciertos subconjuntos de células inmunitarias

5 Las cDCs derivadas de GMCSF de ratones naturales (WT), de ratones deficientes en RIG-I (a), de ratones deficientes en MDA5 (b) y de ratones deficientes en TLR7 (c), y las pDCs derivadas de Flt3-L de ratones deficientes en TLR7 (d) se transfectaron con 200 ng de 3p-2.2, dsDNA (Sigma; dAdT), poli(I:C) (Sigma) complejados con lipofectamina 2000 y CpG-A 2216 (3 μ g/ml) en placas de 96 pocillos. Después de 24 h, se midió el IFN- α en los sobrenadantes mediante ELISA. Los datos se expresan como la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

10 (e) Se purificaron células B, células NK y células T CD8 procedentes de bazos de ratones naturales (WT) utilizando selección celular magnética y se estimularon con 200 ng de 3p-2.2. Las pDCs seleccionadas de cultivos de médula ósea inducidas por Flt3-L y las cDCs derivadas de GMCSF estimuladas con 3p-2.2 sirvieron como control positivo. Los datos se expresan como la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

Figura 18: El 3p-2.2 encapsulado conduce a la activación inmunitaria sistémica *in vivo*

15 Se inyectaron ratones C57BL/6 con 200 μ l que contenían 3p-2.2 o OH-2.2 (50 μ g/ratón) complejado con jetPEITM. Posteriormente, se inyectaron los complejos en la vena retro-orbital. Se recogió el suero después de 6 horas a menos que se indique otra cosa. Se obtuvo sangre entera cortando la cola a los puntos de tiempo indicados. Los niveles de citocinas de IFN- α (a), IL-12p40 (b) y IFN- γ (c) se determinaron por ELISA. El CpG1826 sirvió como control positivo. Los datos se muestran como las medias \pm SEM de 6 experimentos independientes; P^{**} <0,01 o P* <0,05. (d-e) Se inyectaron ratones C57BL/6 y TLR7^{-/-} por vía intravenosa con 3p-2.2 y OH-2.2 (50 μ g) complejados con jetPEITM (Biomol). Después de 6 horas, se sacrificaron los ratones y se analizó el suero para la producción de IFN- α (d), IL-12p40 (e) e IFN- γ (f) por ELISA. Los datos se muestran como las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes.

Figura 19: Activación dependiente de la dosis de subconjuntos de células inmunitarias por 3p-2.2 *in vivo*

Se inyectaron ratones C57BL/6 con 200 μ l de 3p-2.2 (25, 50 o 75 μ g/ratón) complejado con jetPEITM en la vena retro-orbital. Se recogió el suero después de 6 h a menos que se indique otra cosa.

25 (a) Los niveles de citocinas en suero de IFN- α , IL-12p40 y IFN- γ se determinaron por ELISA. Los datos se muestran como las medias \pm SEM de 5 experimentos independientes.

30 (b-c) Se inyectaron ratones C57BL/6 con 200 μ l de ácido nucleico (25, 50 o 75 μ g/ratón) complejado con jetPEITM. Se aislaron células del bazo 48 horas después de la inyección y se analizó la expresión de CD86 o CD69 en pDCs, mDCs, células NK, células T CD4 y células T CD8 por citometría de flujo. La tinción del antígeno de superficie se realizó como se ha descrito previamente. (b) Histogramas de un experimento representativo después de la estimulación con 50 μ g de 3p-2.2 (barra gris, ratones de control no estimulados), (c) La activación dependiente de la dosis por 3p-2.2 de diferentes subconjuntos de células inmunitarias. Los datos se muestran como las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes.

35 Figura 20: La estimulación por 3p-2.2 conduce a un aumento de niveles de IFN- α en suero durante menos de dos días e induce una trombocitopenia y leucopenia moderada *in vivo*.

(a) Se inyectaron ratones C57BL/6 con 50 μ g de 3p-2.2 o de OH-2.2 complejado con jetPEITM. Se recogió el suero 12 h, 24 h, y 48 h después de la inyección a menos que se indique otra cosa. Los niveles séricos de IFN- α se determinaron por ELISA. Los datos se muestran como las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes.

40 (b) Se inyectaron ratones C57BL/6 con 50 μ g de 3p-2.2 complejado con jetPEITM. Se recogió la sangre después de 48 h y se procesó como plasma con EDTA para la medida de los leucocitos (WBC) y de las plaquetas. Se realizaron los recuentos de las células sanguíneas en el Laboratorio Central del Departamento de Medicina Interna, Universidad de Munich, en el punto de tiempo indicado (P^{**} <0,01 entre el recuento de plaquetas de 3p-2.2 y CpG). Los datos se muestran como las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes.

45 Figura 21: La administración de 3p-2.2 encapsulado produce la reducción de las metástasis de pulmón de melanoma B16 inducidas experimentalmente

50 (a) Régimen terapéutico: Se enfrentaron los ratones con 4×10^5 células de melanoma B16 por vía intravenosa para inducir experimentalmente metástasis de pulmón el día 0. Se trataron los ratones por vía intravenosa con el ácido nucleico indicado complejado con jetPEITM los días 3, 6 y 9 como se indica. 14 días después del enfrentamiento, se contó el número de metástasis de melanoma visibles macroscópicamente en la superficie de los pulmones con ayuda de un microscopio de disección o se calculó el peso del pulmón.

(b) Se enfrentaron grupos de cinco ratones C57BL/6 con 4×10^5 B16 y se trataron como se describe. Se trataron los ratones intravenosamente los días 3, 6 y 9 con 50 μ g de OH-2.2, 50 μ g de 3p-2.2, 50 μ g de 3p-GC (un 3p-RNA no específico de cadena doble) o 50 μ g de ligando de oligonucleótido CpG, cada uno de ellos complejado con jetPEITM. Los grupos de control recibieron 100 μ l de glucosa al 5 % o 50 μ g de poliA complejado con jetPEITM. Se evaluó el

crecimiento del tumor después de 14 días determinando el peso de los pulmones. Se muestran los pesos de los pulmones de cinco ratones individuales. El peso medio del pulmón se indica por una columna. El peso de los pulmones de ratones sanos oscila entre 0,2 y 0,24 g ($P^{**}<0,01$ entre 3p-2.2 y poliA, OH-2.2 y 3p-GC; n = 5; test generalizado de Mann-Whitney).

- 5 (c) Se inyectó una sola dosis de siRNA marcado con FITC complejado o no complejado (100 µg) intravenosamente en ratones sanos o en ratones portadores de tumores. Después de 6 h, se sacrificaron los ratones y se extirparon distintos tejidos, incluyendo los pulmones y se analizaron para la absorción de los complejos de RNA. Se analizaron después los tejidos usando un microscopio confocal Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Germany) equipado con láseres de argón de 488 nm y de helio-neón de 633 nm. Se muestra un experimento representativo después de la inyección con 100 µg de siRNA marcado con FITC.

Figura 22: Mecanismos de reducción del tumor por 3p-2.2

- 15 (a) Se inyectaron intravenosamente grupos de 4 ratones C57BL/6 con 4×10^5 células de melanoma B16 para inducir experimentalmente metástasis pulmonares. Los ratones se trataron intravenosamente los días 3, 6 y 9 con 50 µg de 3p-2.2 y 50 µg de poli(I:C), respectivamente. Los animales tratados con poliA sirvieron como grupo de control. El crecimiento del tumor se evaluó el día 14 contando el número de metástasis de melanoma macroscópicamente visibles en las superficies pulmonares. Se muestra el número de metástasis en ratones C57BL/6 individuales. El número medio de las metástasis se indica por la línea horizontal ($P^*<0,05$ entre ratones tratados con 3p-2.2 y con poliA; n = 4; test generalizado de Mann-Whitney).

- 20 (b) Efecto de 3p-2.2 complejado con jetPEI™ sobre el crecimiento del tumor en ratones TLR7^{-/-} ($P^*<0,05$ entre ratones tratados con 3p-2.2 y poliA; n = 4; test generalizado de Mann-Whitney).

(c) Efecto de 3p-2.2 complejado con jetPEI™ sobre el crecimiento del tumor en ratones IFNAR^{-/-} ($P^*> 0,05$ entre ratones tratados con 3p-2.2 y poliA; n = 4; test generalizado de Mann-Whitney).

(d) Efecto del agotamiento, mediado por anticuerpos, de las células T CD8⁺ y de las células NK sobre la eficacia terapéutica antitumoral de 3p-2.2 complejado con jetPEI™ en ratones C57BL/6 de tipo natural.

- 25 (e) Expresión de Bcl-2 en pulmones metastáticos de ratones IFNAR^{-/-} tratados con 3p-2.2 y poli(I:C) se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se presentan como las medias ± SEM de dos experimentos individuales.

Figura 23: Inducción de la apoptosis en metástasis pulmonares por 3p-2.2 *in vivo*

- 30 Se inyectaron intravenosamente grupos de 5 ratones C57BL/6 con 4×10^5 células de melanoma B16 para inducir experimentalmente metástasis pulmonares. Los ratones se trataron intravenosamente los días 3, 6 y 9 con 50 µg de poliA (a), 50 µg de 3p-2.2 (b) o 50 µg de CpG1826 (c). Los animales tratados con poliA sirvieron como grupo de control. El día 14, se obtuvieron muestras de los pulmones cuando se sacrificaron los ratones. Las muestras de tejido se fijaron en etanol absoluto y se embebieron en parafina. Se detectó la apoptosis por el método de marcado final de corte de dUTP mediado por transferasa (TUNEL) según las instrucciones del fabricante. Se muestra un experimento representativo de 5.

- 35 Figura 24: El contenido de inosina aumenta la actividad inductora de IFN-α de 3pRNA.

(A) Se prepararon monocitos a partir de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas y se transfectaron con RNA. Se cultivaron 4×10^5 células durante 18 horas, y se midió el IFN-α por ELISA.

- 40 (B) Se prepararon células dendríticas de ratón mediante la incubación de médula ósea murina de ratones de tipo natural y ratones MDA-5^{-/-} con GM-CSF. Se transfectaron células dendríticas murinas (2×10^5 células por pocillo) con 400 ng de RNA. Después de 18 h, se midió el IFN-α en los sobrenadantes mediante ELISA.

Figura 25: Actividad inductora de IFN-α del RNA 5' trifosfato de cadena sencilla, sintético.

- 45 Se transfectaron PBMC con oligonucleótidos de cadena sencilla sintetizados químicamente solos o junto con sus cadenas complementarias antisentido (AS) usando lipofectamina y se incubaron en presencia o ausencia de cloroquina (Chl). Se utilizó CpG2331 como control positivo y control sensible a la cloroquina para la inducción de IFN-α en las PBMC.

Descripción detallada de la invención

- 50 La detección de una infección vírica es vital para los organismos superiores para salvaguardar la integridad de sus genomas. Los TLR contribuyen al reconocimiento de los ácidos nucleicos víricos, pero su función verdadera parece en gran medida prescindible para una defensa antivírica eficaz (A. Krug *et al.*, *Immunity* 21, 107 (Jul, 2004); K. Tabeta *et al.*, *Proc Natl Acad. Sci U S A* 101, 3516 (Mar 9, 2004); T. Delale *et al.*, *J Immunol* 175, 6723 (Nov 15, 2005); K. Yang *et al.*, *Immunity* 23, 465 (Nov, 2005)). No ha sido hasta recientemente cuando se ha hecho evidente que las dos helicasas citoplasmáticas, MDA-5 y RIG-I (M. Yoneyama *et al.*, *Nat Immunol* 5, 730 (Jul, 2004)), son esenciales para controlar la infección vírica.

Los presentes inventores identificaron el RNA con un grupo trifosfato en el extremo 5' y una longitud mínima óptima de 19 nucleótidos como un ligando específico para RIG-I. Tanto el RNA 5' trifosfato exógeno transfectado a una célula como el RNA 5' trifosfato formado endógenamente activaron RIG-I. El RNA genómico preparado a partir de un virus RNA de cadena negativa y el RNA preparado a partir de células infectadas por virus, pero no el RNA procedente de las células no infectadas, desencadenaron una potente respuesta de IFN- α de una manera dependiente de 5' trifosfato. Los estudios de unión de RIG-I y RNA 5' trifosfato revelaron una interacción molecular directa.

El RNA 5' trifosfato sin caperuza, no modificado, es la primera estructura molecular bien definida de ácidos nucleicos víricos que es detectada por las células eucariotas. Puesto que los virus debido a su ciclo de vida están compuestos de los mismos constituyentes moleculares que sus células hospedantes, a saber, proteína y ácido nucleico, tales estructuras moleculares definidas que permiten la discriminación del RNA vírico y del RNA propio se espera que sean poco frecuentes y la presencia de las mismas ha sido cuestionada. En este sentido, los virus son diferentes de las bacterias que contienen una variedad de moléculas tales como las endotoxinas que están ausentes en los eucariotas y que son reconocidas fácilmente con alta confianza por los TLR tal como el TLR4 localizado en la membrana citoplasmática.

Hasta ahora, se creía que la localización de los ácidos nucleicos víricos en el endosoma más que ser una característica molecular específica de los ácidos nucleicos víricos era el factor principal que permite la detección de los virus. Aunque el reconocimiento mediado por TLR del RNA de cadena sencilla (por TLR7 y TLR8) y del RNA de cadena doble corto (por TLR7) en el endosoma resultó que era dependiente de la secuencia, la frecuencia de tales motivos de secuencia en los virus y en los vertebrados es similar (observación de los presentes inventores no publicada). Esto se aplica incluso a motivos CpG, que están deprimidos tanto en el DNA vertebrado como en el vírico, pero no en el DNA bacteriano (A. M. Krieg, *Annu Rev Immunol* 20, 709 (2002)). Este punto de vista es apoyado por un estudio reciente que demuestra que la localización endosómica de TLR9 impide el reconocimiento del DNA propio y facilita la detección del DNA vírico (G. M. Barton, J. C. Kagan, R. Medzhitov, *Nat Immunol* 7, 49 (Jan, 2006)). El reconocimiento, independiente del motivo CpG, de DNA por TLR9 ha sido descrito por otros autores (J. Vollmer *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12, 165 (Jun, 2002)).

Teniendo en cuenta el hecho de que todos los transcritos de RNA independientes de los cebadores se generan inicialmente como RNAs 5' trifosfato, surge la pregunta de cómo el RNA eucariota evade el reconocimiento de RIG-I. En el citosol de las células eucariotas, la mayor parte si no todas las especies de RNA propio no tienen un extremo de 5' trifosfato libre. Antes de que el RNA propio salga del núcleo y alcance el citosol, el RNA se procesa adicionalmente. Esto es válido para los transcritos de RNA de las tres RNA polimerasas en eucariotas.

La polimerasa I transcribe un RNA ribosómico (rRNA) grande, precursor policistrónico, que contiene las secuencias de los rRNA maduros (rRNA 18, 5.8S, 25-28S), dos espaciadores transcritos externos y dos espaciadores transcritos internos. Este transcrito primario se somete a muchas etapas de proceso endonucleolítico y exonucleolítico para producir los rRNA maduros. El resultado neto de este proceso de maduración es un grupo monofosfato en el extremo 5' de todos los rRNA transcritos por la polimerasa I (M. Fromont-Racine *et al.*, *Gene* 313, 17 (Aug 14, 2003)).

Los RNA mensajeros (mRNA) y los RNA nucleares pequeños (snRNA), que son transcritos por la polimerasa II, reciben un grupo 7' metil guanosina que se une al 5' trifosfato del RNA naciente por un proceso denominado agregado de caperuza (capping) (A. J. Shatkin, J. L. Manley, *Nat Struct Biol* 7, 838 (Oct, 2000)). Por lo tanto, después de la exportación al citoplasma, no se encuentran grupos de trifosfato libres en los transcritos de polimerasa II.

La polimerasa III sintetiza los RNA de transferencia (tRNA) y los rRNA 5S que son ambos exportados al citoplasma, y otros RNA pequeños incluyendo RNA U6. Antes de la exportación al citoplasma, los tRNA maduran adicionalmente en el núcleo, incluyendo la eliminación de varios nucleótidos del extremo 5' por la ribonucleasa P. Por lo tanto, todos los tRNA maduros que se pueden encontrar en el citoplasma han sido procesados en el extremo 5' dando como resultado un 5' monofosfato (S. Xiao *et al.* *Annual review of biochemistry* 71, 165 (2002)). El estado de fosforilación del extremo 5' del RNA 5S ribosómico no ha sido estudiado y actualmente se desconoce. El RNA U6 recibe una estructura de caperuza de γ -monometilfosfato (mpppG) después de la transcripción (R. Singh, R. Reddy, *PNAS* 86, 8280 (Nov, 1989)).

Además de la falta de residuos de 5' trifosfato libre, el RNA eucariota sufre después de la transcripción una modificación significativa de sus nucleósidos y su cadena principal de ribosa. Entre todas las modificaciones de nucleósidos, la pseudouridinilación es una de las modificaciones de RNA postranscripcionales más comunes que parece ser universal entre los rRNA y los RNA pequeños estables, tal como corte y empalme de los RNA nucleares pequeños (snRNA), los tRNA, y los RNA pequeños nucleolares (snoRNA). Sin embargo, la frecuencia y la localización de los nucleótidos pseudouridinilados varían filogenéticamente. De modo interesante, los eucariotas contienen muchas más modificaciones de nucleósidos dentro de sus especies de RNA que los procariontes. En el RNA ribosómico humano, por ejemplo, el constituyente principal de RNA celular, contiene diez veces más pseudouridina (Ψ) y 25 veces más nucleósidos 2'-O-metilados que el rRNA de *E. coli* (J. Rozenki *et al.* *Nucleic acids research* 27, 196 (Jan 1, 1999)). Lo mismo se aplica a los tRNA de eucariotas, el subgrupo de RNA más

fuertemente modificado con hasta un 25 % de nucleósidos modificados. La maquinaria del hospedante que lleva a cabo las modificaciones de nucleósidos y la 2'-O-metilación de la cadena principal de ribosa está localizada en el nucleolo y consiste en complejos de RNA-proteína que contienen los snoRNAs y varias proteínas asociadas (es decir, snoRNPs) (W. A. Decatur, M. J. Fournier, J. Biol. Chem. 278, 695 (January 3, 2003)).

- 5 La información sobre modificaciones de nucleósidos específicas del nucleolo o sobre la 2'-O-metilación de la ribosa de genomas de RNA víricos es limitada. Puesto que la mayoría de los virus RNA no se replican en el núcleo y la modificación está estrechamente confinada a la secuencia y estructura de sus objetivos, parece poco probable una amplia modificación del RNA vírico.

10 En conjunto, las modificaciones post-transcripcionales de RNA de eucariotas tales como el procesamiento o agregado de caperuza en 5', así como las modificaciones de nucleósidos o la metilación de la cadena principal de ribosa proporcionan la base molecular para la distinción del RNA propio generado en el núcleo, del RNA vírico de origen citoplasmático.

15 Los mRNA de virus que infectan las células eucariotas también contienen normalmente estructuras de caperuza de 7-metil-guanosina en sus extremos 5' y colas poli(A) en sus extremos 3' (Y. Furuichi, A. J. Shatkin, Adv Virus Res 55, 135 (2000)). Algunos virus hacen uso de la maquinaria de transcripción del hospedante para adquirir las caperuzas y las colas de poli(A). Los virus RNA que no dependen de la maquinaria transcripcional del hospedante producen sus propias enzimas de formación de caperuza o utilizan otros mecanismos tales como aprovecharse de las regiones terminales 5' de los mRNA del hospedante. A pesar de estas adaptaciones de los virus al sistema transcripcional del hospedante, la síntesis de RNA vírico conduce a intermedios de RNA citoplásmicos transitorios con un extremo 5' trifosfato sin caperuza.

20 Con notables excepciones, tales como la familia picornavirus (véase más adelante), las polimerasas de RNA dependientes de RNA vírico (RdRp) inician la actividad de polimerasa *de novo* sin un cebador específico (C. C. Kao, *et al.*, Virology 287, 251 (Sep 1, 2001)). Como consecuencia, estos transcritos dependientes de RdRp empiezan con un 5' trifosfato sin caperuza. Esto ha sido estudiado en gran detalle para la replicación de los virus RNA de cadena positiva de la familia *Flaviviridae* (que incluye el virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa y el virus del dengue); se ha publicado que todos estos virus son reconocidos por medio de RIG-I (H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006); R. Sumpter, Jr. *et al.*, J. Virol. 79, 2689 (March 1, 2005); T. H. Chang *et al.*, Microbes and Infection 8, 157 (2006)). El virus RNA de cadena negativa segmentada (NSV) dependen de un cebador privado de caperuza para la transcripción de mRNA, pero inician la replicación del RNA genómico y del antígenómico complementario mediante un mecanismo *de novo* independiente del cebador que da como resultado un transcrito iniciado en 5' trifosfato (A. Honda, *et al.*, Virus Res 55, 199 (Jun, 1998); G. Neumann, *et al.*, Current topics in microbiology and immunology 283, 121 (2004)). Los NSV con un genoma no segmentado (Orden *Mononegavirales*), incluyendo los paramixovirus y rhabdovirus, inician tanto la replicación como la transcripción *de novo* llevando a RNA 5' trifosfato en el citosol. Tanto los productos de replicación de longitud completa, vRNA y cRNA, como un RNA líder corto que se sintetiza abundantemente durante la iniciación de la transcripción, mantienen sus 5' trifosfatos (R. J. Colonna, A. K. Banerjee, Cell 15, 93 (1978)), mientras que los transcritos de mRNA codificados por el virus se modifican adicionalmente en sus extremos 5' por agregación de caperuza y metilación de la caperuza. En consecuencia, se espera que el RNA genómico de los NSV *per se* desencadene una respuesta de IFN sin necesidad de replicación ni de formación de supuesto dsRNA. Consecuentemente con esta idea, se ha demostrado que no sólo los virus vivos sino también el RNA purificado de viriones NSV, en este caso, VSV, desencadenan fuertes respuestas de interferón tipo I que dependen de RIG-I (H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006)).

45 Los presentes inventores confirmaron y ampliaron estas observaciones demostrando que la desfosforilación de los aislados de RNA vírico suprimen completamente la respuesta de IFN, lo que indica que el resto 5' trifosfato es necesario para el reconocimiento. En el caso de células infectadas por RV, los RNA de longitud completa se encierran de forma permanente dentro de la nucleoproteína (N) para formar un complejo de nucleoproteína-RNA (RNP) lineal, helicoidal en el que el RNA no es accesible ni siquiera a moléculas celulares pequeñas, tales como las RNasas. Similarmente, se ha informado que el RNA líder es encapsulado por N (Blumberg DM & Kolakofsky D, J Virol 1981 Nov; 40 (2): 568-76; Blumberg BM *et al.* Cell 1981 Mar; 23 (3): 837- 45). El reconocimiento efectivo del NSV vivo por RIG-I puede sugerir que los trifosfatos terminales del complejo de N-RNA lineal no están completamente protegidos por la proteína N o que, en la fase inicial de la transcripción vírica, los niveles de la proteína N recién sintetizada son insuficientes para una protección completa. A este respecto, es interesante observar que los stocks de NSV que contienen partículas de RNA defectuosas interferentes (DI) son potentes inductores de IFN (Strahle L. *et al.* 2006, Virology 351 (1): 101-11). Las DI contienen sólo los promotores terminales para la replicación y proporcionan abundantes extremos de 5' trifosfato en condiciones de reducción de la expresión de proteínas de virus auxiliares.

50 Por otra parte, todos los virus en el supergrupo tipo picornavirus (picornavirus, potivirus, comovirus, calicivirus y otros virus) utilizan un RdRp que emplea exclusivamente una proteína como un cebador para la producción de RNA tanto de cadena positiva como de cadena negativa: este cebador proteína es parte del RdRp precursor y se escinde cuando tiene lugar la elongación del complejo inicial, para convertirse en una proteína unida al genoma en 5', conocida generalmente como proteína viral unida al genoma (VPg) (Y.F. Lee, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 74, 59

(Jan, 1977)). Así, durante el ciclo de vida de los picornavirus, sin caperuza, los extremos 5' trifosforilados están ausentes. En consecuencia, se espera que RIG-I esté involucrado en la detección de las Flaviviridae y de los NSV, pero no de los picornavirus, lo que se confirmó en un estudio reciente (H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006)).

5 Antes de la presente invención, se creía que un RNA de cadena doble larga era la única estructura definida de ácido nucleico que se produce durante la infección vírica, pero que está ausente en las células normales. La idea de que el imitador de RNA de cadena doble larga poli(I:C) induce los IFN tipo I se remonta a los primeros días de la investigación de IFN tipo I (M. Absher, W. R. Stinebring, Nature 223, 715 (Aug 16, 1969)). Se creía que la proteína cinasa dependiente de RNA de cadena doble (PKR) estaba implicada en la inducción de IFN- α (S. D. Der, A. S. Lau, Proc Natl Acad Sci USA 92, 8841 (Sep 12, 1995)), pero el grupo de Weissmann demostró que el IFN tipo I inducido por poli(I:C) no se ve alterado en los ratones deficientes en PKR (Y. L. Yang *et al.*, Embo J 14, 6095 (Dec 15, 1995)). Otros autores han encontrado que el IFN tipo I inducido por poli(I:C) era parcialmente dependiente de PKR, pero independiente de TLR3 (S. S. Diebold *et al.*, Nature 424, 324 (Jul 17, 2003)). Por otro lado, se encontró que el TLR3 era el primer receptor que se ha comprobado que se une específicamente a dsRNA largo y que induce el IFN tipo I tras la unión (L. Alexopoulou, *et al.*, Nature 413, 732 (Oct 18, 2001)). Se encontró que el TLR3 era activado durante la infección vírica (en el caso de CMV) (K. Tabeta *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 101, 3516 (Mar 9, 2004)), pero no era necesario para el aclaramiento del virus (en el caso de RSV) (B. D. Rudd *et al.*, J Immunol WQ, 1937 (Feb 1, 2006)).

20 Una serie de estudios dieron a entender que las helicasas MDA-5 y RIG-I reconocen el dsRNA (M. Yoneyama *et al.*, Nat Immunol 5, 730 (Jul, 2004); S. Rothenfusser *et al.*, J Immunol 175, 5260 (Oct 15, 2005); J. Andrejeva *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 101, 17264 (Dec 7, 2004)). Sin embargo, en la presente invención se ha encontrado que no es necesaria la formación de la cadena doble de RNA para la interacción RIG-I-RNA y que el dsRNA no es suficiente para la activación de RIG-I. Los presentes inventores han encontrado además que la MDA-5 no está implicada en el reconocimiento de RNA 5' trifosfato. Aunque hay pruebas convincentes de que MDA-5 es activada por el imitador de dsRNA largo poli(I:C), la activación de MDA-5 por el dsRNA largo natural todavía es controvertida (H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006)). Tomados en conjunto, el TLR3 es hasta el momento el único receptor que lleva a la producción de IFN tipo I tras la unión de la molécula de dsRNA larga natural, pero la contribución de TLR3 a la inducción de IFN tipo I y el aclaramiento del virus *in vivo* parece ser débil.

30 Se asume ampliamente que la replicación de ambos virus DNA y RNA está asociada con la formación de dsRNA intermedio en el citoplasma. Un estudio reciente confirma la formación de dsRNA intermedio para los virus RNA de cadena positiva, virus dsRNA y virus DNA, pero no para los NSV (F. Weber, *et al.*, J Virol 80, 5059 (May, 2006)). Sin embargo, la formación de dsRNA endógeno se produce fisiológicamente en las células eucariotas. En las células eucariotas sanas, el dsRNA está presente en la forma de los RNA micro (miRNA) y los miRNA precursores. Los miRNA precursores son estructuras en tallo-bucle de dsRNA de 70 nucleótidos que se exportan constantemente desde el núcleo hasta el citosol para ser procesadas adicionalmente en los miRNA de 22 nucleótidos que regulan postranscripcionalmente un gran número de genes diana (B. R. Cullen, Mol Cell 16, 861 (Dec 22, 2004)). Por lo tanto, el dsRNA está presente en las células eucariotas sanas normales sin inducir una respuesta de IFN tipo I. Por lo tanto, el dsRNA en el citoplasma *per se* no es específico del virus.

40 Existen buenos indicios de que el dsRNA corto tal como el siRNA generado por la escisión de dsRNA largo, mediada por enzimas Dicer, no provoca una respuesta de IFN tipo I en células no inmunitarias (V. Hornung *et al.*, Nat Med 11, 263 (Mar, 2005); D. H. Kim *et al.*, Nat Biotechnol 22, 321 (Mar, 2004); S. M. Elbashir *et al.*, Nature 411, 494 (May 24, 2001)). Un estudio reciente sugiere que los dos nucleótidos que cuelgan en el extremo 3' de los productos de escisión por enzimas Dicer son esenciales para la falta de inmunorreconocimiento de dsRNA corto (J.T. Marques *et al.*, Nat Biotechnol 24, 559 (May, 2006)). En el mismo estudio, se propuso que el dsRNA corto sintético es reconocido por medio de RIG-I. La conclusión de que RIG-I es el receptor para el dsRNA corto de extremo como se basa en experimentos que utilizan células que sobreexpresan RIG-I y que utilizan siRNA específico de RIG-I (dsRNA corto con dos nucleótidos colgantes en 3') además de la estimulación con dsRNA corto de extremo como. Las células deficientes en RIG-I no fueron examinadas en este estudio.

50 Es bien conocido que el reconocimiento, independiente del 5' trifosfato, de dsRNA corto, así como de ssRNA, se produce en el compartimiento endosómico de un subconjunto altamente especializado de células inmunitarias, las células dendríticas plasmacitoides (PDC). Las PDC llevan sólo dos TLR funcionales, TLR7 para la detección de RNA, y TLR9 para la detección de DNA. En los seres humanos, la inducción de IFN- α inducida por TLR se limita en gran parte a las PDC. Se ha publicado que las PDC son responsables de la inducción temprana de IFN- α durante la infección vírica (A. Krug *et al.*, Immunity 21, 107 (Jul, 2004)). Sin embargo, el agotamiento de las PDC no tiene un impacto importante sobre la supervivencia del hospedante después de la infección vírica (T. Delale *et al.*, J Immunol 175, 6723 (Nov 15, 2005)). En base a estos datos, está evolucionando el concepto de que las PDC contribuyen a las respuestas inmunitarias antivíricas tempranas, mientras que la principal actividad antivírica se basa en el reconocimiento citoplasmático del virus por medio de RIG-I y/o MDA-5. En situaciones en las que el virus escapa al reconocimiento de RIG-I y/o de MDA-5, el reconocimiento del virus mediado por PDC y TLR puede desempeñar un papel más crítico. Así, las PDC sirven como centinelas de las partículas virales antes de llegar a una replicación viral en células infectadas por virus, y pueden servir como una estrategia de soporte si el virus escapa al reconocimiento de RIG-I y/o de MDA-5.

- La potencia de la respuesta antivírica específica de RNA 5' trifosfato se ilustra por el hallazgo de los presentes inventores de que los monocitos primarios humanos producen grandes cantidades de IFN- α después de la estimulación con RNA 5' trifosfato. Al contrario que en los ratones (S. S. Diebold *et al.*, Nature 424, 324 (Jul 17, 2003)), no se ha demostrado previamente que las células mieloides humanas produzcan cantidades considerables de IFN- α tras la estimulación con ácidos nucleicos. Con el RNA 5' trifosfato, ahora por primera vez está disponible una molécula, que es un verdadero imitador de la infección vírica de las células y por lo tanto es capaz de inducir el IFN- α en cualquier tipo de célula incluyendo las células inmunitarias que normalmente no producen IFN- α , las células no inmunitarias y las células tumorales.
- Antes de la presente divulgación, el único modo de inducir un tipo similar de respuesta fue utilizar virus atenuados que se replican. Sin embargo, los virus atenuados pueden causar infección y enfermedad vírica en los pacientes inmunodeprimidos y las mutaciones podrían revertir eventualmente los virus para llegar a ser más patógenos. El RNA 5' trifosfato tiene el potencial de imitar a los virus atenuados replicantes con respecto a su potente estimulación de la inmunidad. En este sentido, el RNA 5' trifosfato parece ser la molécula perfecta biológicamente muerta que puede ser utilizada en el desarrollo de vacunas, vacunas terapéuticas, o inmunoterapias para la prevención y/o tratamiento de enfermedades establecidas, tales como la infección vírica crónica y los tumores.
- Además, los presentes inventores han encontrado que el RNA 5' trifosfato induce no sólo la producción de IFN tipo I en las células tumorales, sino también la apoptosis de las células tumorales. Las células tumorales son más susceptibles que las células no tumorales a la apoptosis inducida por el RNA 5' trifosfato. Por lo tanto, el RNA 5' trifosfato es un candidato ideal para la terapia tumoral
- En la técnica anterior, los RNA 5' trifosfato, ya sean de cadena sencilla o de cadena doble, eran generados rutinariamente por transcripción *in vitro* utilizando RNA polimerasas de bacteriófagos, tales como T7, T3, y SP6, que inevitablemente inician los transcritos con un 5' G (Maitra U *et al.* (1980) PNAS 77 (7): 3908-3911; Stump WT & Hall KB (1993) Nucleic Acids Research 21 (23): 5480-5484). En contraste con la práctica establecida en la técnica, los presentes inventores encontraron que los RNA 5' trifosfato que comienzan con un 5' A son más potentes en la inducción de una respuesta de IFN tipo I.
- Por otra parte, los presentes inventores han encontrado que la secuencia 5' del RNA 5' trifosfato afecta a su potencia. En contraste, la secuencia 3' de un RNA 5' trifosfato tuvo poco impacto ya que los oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato cortos con poli A, poli T, poli C o poli G en el extremo 3' tenían una actividad similar.
- Además, los presentes inventores han encontrado que la actividad inductora de IFN tipo I de un RNA 5' trifosfato aumenta con un contenido creciente de inosina.
- Además, en contraste con los oligonucleótidos cortos, los RNA 5' trifosfato largos mostraron diferentes niveles de actividad. Esto se puede explicar por la formación de la estructura secundaria de moléculas de RNA largo que podrían afectar a la accesibilidad del extremo 5' trifosfato para RIG-I.
- Aunque Kim DH *et al.* (2004, Nature Biotech 22 (3): 321-325) y el documento US 2006/0178334 dieron a conocer que el RNA 5' trifosfato de cadena sencilla transcrito *in vitro* y el RNA vírico de cadena sencilla indujeron la producción de IFN tipo I en líneas celulares seleccionadas y que el RNA 5' trifosfato de cadena sencilla inductor de IFN tipo I también se puede obtener por síntesis química, sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que el RNA 5' trifosfato sintetizado químicamente no tenía ninguna actividad de inducción de IFN tipo I por sí mismo. Antes bien, fue necesaria la formación de una estructura de cadena doble. El RNA de cadena sencilla transcrito *in vitro* y el RNA vírico de cadena sencilla es probable que contengan una estructura de cadena doble debido al bucle de vuelta del extremo 3' o a otra formación intramolecular o intermolecular de la cadena doble, lo que explica su capacidad para inducir el IFN tipo I en ausencia de una cadena antisentido (esto es, complementaria).
- Este sorprendente hallazgo abre la posibilidad de inducir el IFN tipo I de una manera específica de la secuencia y específica de la célula. En esta estrategia, un RNA 5' fosfato de cadena sencilla, en particular, un RNA 5' trifosfato, cuya secuencia es complementaria a un RNA específico de tejido o específico de célula se puede sintetizar químicamente y se introduce en las células, tejidos, órganos u organismos enteros *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.
- Un ejemplo de un RNA específico de un tejido o de una célula es un mRNA de un gen relacionado con una enfermedad/trastorno. Cuando se introduce en células sanas que no expresan el gen relacionado con la enfermedad/trastorno o que no expresan el gen relacionado con la enfermedad/trastorno en un grado significativo, el RNA 5' fosfato de cadena sencilla sigue siendo de cadena sencilla y es incapaz de ser reconocido por RIG-I o de inducir el IFN tipo I. Por el contrario, cuando se introduce en las células enfermas que expresan el gen relacionado con la enfermedad/trastorno o que expresan el gen relacionado de la enfermedad/trastorno en un nivel elevado, el RNA 5' fosfato de cadena sencilla se une al mRNA del gen relacionado con la enfermedad/trastorno, forma una estructura de cadena doble que es reconocida por RIG-I, llevando a la producción de IFN tipo I.
- Otro ejemplo de un RNA específico de un tejido o de una célula es un microRNA (miRNA). Los microRNA (miRNA) son moléculas de cadena sencilla de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud que tienen una estructura en horquilla o en tallo-bucle; ellos son parcialmente complementarios de los mRNA de los genes y regulan la expresión de dichos genes. Los miRNA se expresan de una manera específica en un tejido, una célula y/o una etapa de

desarrollo y se sabe que están asociados con ciertas enfermedades/trastornos tales como el cáncer y las enfermedades del corazón.

De esta manera, la respuesta de IFN tipo I, que normalmente es citotóxica para las células, solamente es inducida en las células enfermas, pero no en las células sanas espectadoras, lo que lleva a la erradicación efectiva de las células enfermas sin dañar a ninguna de las células sanas espectadoras.

El RNA 5' fosfato de cadena sencilla útil en la presente invención puede poseer actividad de silenciamiento génico. Sin embargo, el RNA 5' trifosfato de cadena sencilla útil en la presente invención no necesita poseer ninguna actividad de silenciamiento génico. Mientras que el RNA 5' fosfato de cadena sencilla sea capaz de unirse al RNA endógeno diana, es decir, tenga complementariedad de secuencia con el RNA endógeno diana, es útil en la inducción de IFN tipo I de una manera específica de la célula diana. En ciertas circunstancias, puede ser deseable utilizar un RNA 5' fosfato de cadena sencilla con actividad de silenciamiento génico. Por ejemplo, puede ser deseable utilizar un RNA antisentido contra un oncogen en células tumorales para inducir la producción de IFN tipo I y para reducir el potencial proliferativo de las células tumorales al mismo tiempo. En otras circunstancias, puede ser deseable utilizar un RNA 5' fosfato de cadena sencilla sin actividad de silenciamiento génico. Es concebible que el RNA 5' fosfato de cadena sencilla que carece de actividad de silenciamiento génico no es efectivamente reconocido ni degradado por la maquinaria celular después de la unión a su mRNA diana. Como resultado, el RNA 5' fosfato de cadena sencilla que carece de actividad de silenciamiento génico puede tener una semivida intracelular prolongada.

Además, se encuentra que el RNA 5' trifosfato es capaz de inducir la producción de IL-18 e IL-1 β . Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que el 5' trifosfato es reconocido por el inflammasoma, lo que lleva a la producción de IL-18 y IL-1 β . Por lo tanto, el RNA 5' trifosfato puede ser útil en el tratamiento de enfermedades y/o afecciones que pueden ser aliviadas por la inducción de estas respectivas citocinas. Las enfermedades y/o afecciones incluyen, pero no se limitan a, alergias, tumores malignos y benignos, infecciones víricas, infecciones bacterianas (en particular, infecciones bacterianas intracelulares), inmunodeficiencias e inmunodepresión (incluyendo depresión de la médula ósea por quimioterapia citotóxica).

Definiciones

Como se usan en la presente memoria, "un" y "una" se refieren no sólo a un único individuo, sino también a un grupo o especie de entidades.

Oligonucleótido

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido formado por una pluralidad de unidades de nucleósidos unidas; "oligonucleótido" y "polinucleótido" se utilizan como sinónimos. Tales oligonucleótidos se pueden obtener a partir de las fuentes existentes de ácido nucleico, incluyendo DNA genómico o cDNA, pero se producen preferiblemente por métodos sintéticos que incluyen síntesis química, transcripción *in vitro* e *in vivo*. En las realizaciones preferidas cada unidad de nucleósido incluye una base heterocíclica y un grupo de pentofuranosilo, trehalosa, arabinosa, arabinosa 2'-desoxi-2'-sustituida, arabinosa 2'-O-sustituida o de azúcar hexosa. Los residuos de nucleósidos se pueden acoplar entre sí mediante cualquiera de los numerosos enlaces internucleósidos conocidos. Tales enlaces internucleósidos incluyen, sin limitación, los enlaces internucleósidos de fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, pirofosfato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, puente de fosforamidato, puente de fosfonato de metileno, puente de fosforotioato, y sulfona. El término "oligonucleótido" engloba también los polinucleósidos que tienen uno o más enlaces estereoespecíficos internucleósidos (por ejemplo, enlaces (R_p)-fosforotioato o (S_p)-fosforotioato, alquilfosfonato, o fosfotriéster).

Los oligonucleótidos pueden incluir nucleósidos de origen natural, nucleósidos modificados, o mezclas de los mismos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "nucleósido modificado" es un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, un resto de azúcar modificado, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un nucleósido de pirimidina o de purina no natural. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un ribonucleósido 2'-sustituido, un arabinonucleósido o un arabinósido 2'-desoxi-2'-sustituido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ribonucleósido 2'-sustituido" o "arabinósido 2'-sustituido" incluye ribonucleósidos o arabinonucleósidos en los cuales el grupo hidroxilo en la posición 2' del resto pentosa está sustituido para producir un ribonucleósido 2'-sustituido o 2'-O-sustituido. Preferiblemente, tal sustitución es con un grupo alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono, saturado o insaturado, o con un grupo arilo que tiene 6-10 átomos de carbono, en donde dicho grupo alquilo, o grupo arilo puede estar insustituido o puede estar sustituido, por ejemplo, con grupos halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carboalcoxi, o amino. Ejemplos de ribonucleósidos 2'-O-sustituidos o arabinósidos 2'-O-sustituidos incluyen, sin limitación, 2'-O-metilribonucleósidos o 2'-O-metoxietilarabinósidos.

El término "ribonucleósido 2' sustituido" o "arabinósido 2' sustituido" incluye también ribonucleósidos o arabinonucleósidos en los cuales el grupo 2'-hidroxilo se reemplaza con un grupo alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono, saturado o insaturado, o con un grupo amino o halo. Ejemplos de tales ribonucleósidos 2'

sustituídos o arabinósidos 2'-sustituídos incluyen, sin limitación, 2'-amino-, 2'-fluoro-, 2'-alil-, y 2'-propargil-ribonucleósidos o arabinósidos.

5 El término "oligonucleótido" incluye oligonucleótidos híbridos y quiméricos. Un "oligonucleótido quimérico" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de enlace internucleósido. Un ejemplo preferido de tal oligonucleótido quimérico es un oligonucleótido quimérico que comprende una región fosforotioato, fosfodiéster o fosforoditioato y enlaces no iónicos tales como enlaces alquilfosfonato o alquilfosfonotioato (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.635.377 y 5.366.878).

10 Un "oligonucleótido híbrido" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de nucleósido. Un ejemplo preferido de tal oligonucleótido híbrido comprende un ribonucleótido o región de ribonucleótido 2' sustituido, y una región de desoxirribonucleótido (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.652.355, 6.346.614 y 6.143.881).

Los oligonucleótidos de RNA expuestos en la presente memoria incluyen por lo demás RNA sin modificar, así como RNA que ha sido modificado (por ejemplo, para mejorar la eficacia), y polímeros de sustitutos de nucleósidos.

15 El RNA sin modificar se refiere a una molécula en la que los componentes del ácido nucleico, a saber, azúcares, bases y restos de fosfato, son los mismos o esencialmente los mismos que existen en la naturaleza, preferiblemente como existen naturalmente en el cuerpo humano. La técnica se ha referido a los RNA raros o inusuales, pero de origen natural, los RNA como RNA modificados, véase, por ejemplo, Limbach *et al.* 1994, Nucleic Acids Res 22: 2183-2196. Tales RNA raros o inusuales, denominados a menudo RNAs modificados (aparentemente porque son típicamente el resultado de una modificación postranscripcional) están dentro del término RNA sin modificar, como se usa en la presente memoria.

20 El RNA modificado como se utiliza aquí se refiere a una molécula en la que uno o más de los componentes del ácido nucleico, a saber, azúcares, bases y restos de fosfato, son diferentes de los que existen en la naturaleza, preferiblemente diferentes de los que existen en el cuerpo humano. Aunque se conocen como "RNA" modificados, por supuesto, debido a la modificación, incluyen moléculas que no son RNA.

25 Los sustitutos de nucleósidos son moléculas en las que la cadena principal de ribofosfato se reemplaza con un constructo de no ribofosfato que permite que las bases se presenten en la relación espacial correcta de tal modo que la hibridación es sustancialmente similar a la que se ve con una cadena principal de ribofosfato, por ejemplo, imitadores no cargados de la cadena principal de ribofosfato.

30 Todas las secuencias de ácido nucleico listadas en la presente memoria están en la dirección 5' a 3' a menos que se indique otra cosa.

El oligonucleótido de RNA de la invención puede ser de cadena sencilla (ssRNA), de cadena doble (dsRNA), o parcialmente de cadena doble (parcialmente dsRNA).

35 Un oligonucleótido de RNA de cadena sencilla puede contener secuencias autocomplementarias y forma una horquilla. Por ejemplo, 5'-GACCTAGCCTAAAACTAGGTC-3'. La secuencia autocomplementaria puede ser una secuencia palindrómica. Por ejemplo, 5'-AAAGATCCGGATCAAAA-3'.

Un oligonucleótido de RNA de cadena doble puede tener uno o dos nucleótidos que cuelgan en el extremo 5' o 3' de una o ambas cadenas.

40 Un oligonucleótido de RNA parcialmente de cadena doble puede comprender dos cadenas de la misma o diferente longitud, en donde al menos una de las cadenas contiene nucleótidos fuera de la secuencia complementaria. Por ejemplo,

Ejemplo 1: 5'-AAAAGUUCAAAGCUCAAAA-3'

3'-CAAGUUUCGAG-5'

Ejemplo 2: 5'-UCAAAAGUCAAAAGCUCAAAGUUGAAAGUUUAAA-3'

3'-GACUUGAAAAUUUCAGUUUUCGAGUUUAAGUUGAAAACUCG-5'

45 Ejemplo 3: 5'-UCAAAAGUCAAAAGCUCAAAGUUGAAA-3'

3'-UUUCAGUUUUCGAGUUUAAGUUGAAAACUCG-5'

La longitud de un oligonucleótido de RNA de cadena sencilla es el número de nucleótidos contenidos en el oligonucleótido.

En el caso de un oligonucleótido de cadena doble o parcialmente de cadena doble, la longitud del oligonucleótido es la longitud de las cadenas individuales. En otras palabras, un oligonucleótido parcialmente de cadena doble puede tener dos longitudes.

Aumento de la resistencia a la nucleasa

- 5 Para una mayor resistencia a las nucleasas y/o afinidad de unión a la diana, un oligonucleótido puede incluir, por ejemplo, unidades de ribosa 2'-modificada y/o enlace o enlaces de fosforotioato y/o enlace o enlaces de pirofosfato. Por ejemplo, el grupo 2' hidroxilo (OH) puede ser modificado o reemplazado con un número de diferentes sustituyentes "oxi" o "desoxi".

- 10 Los ejemplos de modificaciones del grupo "oxi"-2' hidroxilo incluyen alcoxi o ariloxi (OR, por ejemplo, R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) en los cuales se conecta el 2' hidroxilo, por ejemplo, mediante un puente de metileno, al carbono 4' del mismo azúcar ribosa; O-amina y aminoalcoxi, $O(CH_2)_n$ amina, (por ejemplo, amina = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclicil amino, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, o diheteroaril amino, etilendiamina, poliamino). Es de destacar que los oligonucleótidos que contienen sólo el grupo metoxietilo (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, un derivado de PEG, presentan estabildades de nucleasa comparables a los modificados con la modificación robusta de fosforotioato.

- 15 Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno (es decir, azúcares desoxirribosa, que son de particular relevancia para las porciones colgantes de los RNA parcialmente de cadena doble); halo (por ejemplo, fluoro); amino (por ejemplo, NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclicil, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, diheteroaril amino, o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -amina (amina = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclicilamino, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino), $-NHC(O)R$ (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alqueno y alquino, que pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con una función amino.

Los sustituyentes preferidos son 2'-metoxietilo, 2'-OCH₃, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, y 2'-fluoro.

- 25 Para maximizar la resistencia a las nucleasas, se pueden utilizar las modificaciones en 2' en combinación con una o más modificaciones de enlaces fosfato (por ejemplo, fosforotioato). Los denominados oligonucleótidos "quiméricos" son aquellos que contienen dos o más modificaciones diferentes.

- 30 La inclusión de azúcares de furanosa en la cadena principal del oligonucleótido también puede disminuir la escisión endonucleolítica. Un agente oligonucleótido puede ser modificado además incluyendo un grupo catiónico en 3', o invirtiendo el nucleósido en el extremo 3' con un enlace 3'-3'. En otra alternativa, el extremo 3' puede ser bloqueado con un grupo aminoalquilo, por ejemplo, un 3' C5-aminoalquilo dT. Otros conjugados en 3' pueden inhibir la escisión exonucleolítica en 3'-5'. Aunque sin limitarse a ninguna teoría, un conjugado en 3', tal como el naproxeno o el ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica bloqueando estéricamente la exonucleasa de la unión al extremo 3' del oligonucleótido. Incluso las cadenas pequeñas de alquilo, grupos arilo, o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa etc.) pueden bloquear las 3'-5'-exonucleasas.

- 35 De manera similar, los conjugados en 5' pueden inhibir la escisión exonucleolítica en 5'-3'. Aunque sin limitarse a ninguna teoría, un conjugado en 5', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica bloqueando estéricamente la exonucleasa de la unión al extremo 5' del oligonucleótido. Incluso las cadenas pequeñas de alquilo, grupos arilo, o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa etc.) pueden bloquear las 5'-3'-exonucleasas.

Los oligonucleótidos de RNA de cadena sencilla que contienen secuencias autocomplementarias y que forman una estructura de horquilla han mejorado la resistencia a la nucleasa en comparación con los oligonucleótidos de cadena sencilla que no lo hacen.

Ligandos anclados

- 45 Los oligonucleótidos de RNA incluyen también aquellos con ligandos anclados. Las propiedades de un oligonucleótido de RNA, incluyendo sus propiedades farmacológicas, pueden ser influenciadas y adaptadas por la introducción de ligandos, por ejemplo, ligandos anclados.

- 50 Los ligandos se pueden acoplar, covalentemente o no covalentemente, preferiblemente covalentemente, ya sea directamente o indirectamente por medio de un anclaje intermedio, al oligonucleótido de RNA. En realizaciones preferidas, el ligando se une al oligonucleótido por medio de un anclaje intermedio.

En realizaciones preferidas, un ligando altera la distribución, orientación o vida útil de un oligonucleótido de RNA al que se incorpora. En realizaciones preferidas, un ligando proporciona una afinidad mejorada para una diana seleccionada, por ejemplo, molécula, célula o tipo celular, un compartimento celular o de un órgano, un tejido, órgano o región del cuerpo.

Los ligandos preferidos pueden mejorar el transporte, la hibridación, y las propiedades de especificidad y pueden mejorar también la resistencia a las nucleasas del oligorribonucleótido natural o modificado resultante, o una molécula polimérica que comprende cualquier combinación de monómeros descritos en la presente memoria y/o ribonucleótidos naturales o modificados.

- 5 Se puede utilizar una amplia variedad de ligandos. Los ligandos pueden incluir agentes que permiten la orientación específica del oligonucleótido hacia un objetivo; compuestos de diagnóstico o grupos indicadores que permiten la monitorización de la distribución del oligonucleótido; agentes de reticulación; restos que confieren resistencia a las nucleasas; y nucleobases naturales o inusuales. Ejemplos generales incluyen moléculas lipófilas, lípidos, lectinas, esteroides (por ejemplo, uvaol, hecigenina, diosgenina), terpenos (por ejemplo, triterpenos, por ejemplo, sarsasapogenina, friedelina, epifriedelanol, ácido litocólico derivatizado), vitaminas, carbohidratos (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico), proteínas, agentes de unión a proteínas, moléculas dirigidas a integrinas, policatiónicos, péptidos, poliaminas y compuestos peptídicos miméticos.

- 15 El ligando puede ser una molécula de origen natural o recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido sintético. Ejemplos de poliaminoácidos incluyen, sin limitación, poli L-lisina, ácido poli-L-aspártico, ácido poli-L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero poli (L-lactida-co-glicol), copolímero de éter divinílico-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, o polifosfazina. Ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, poli lisina, espermina, espermidina, poliamina, poliamina pseudopéptido, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, restos catiónicos, por ejemplo, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina, o un péptido alfa helicoidal.

- 20 Los ligandos pueden incluir también grupos de dirección al objetivo, por ejemplo, un agente de direccionamiento a una célula o tejido, por ejemplo, una tirotropina, melanotropina, proteína surfactante A, carbohidrato de mucina, un poliaminoácido glucosilado, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, o un péptido RGD o péptido mimético de RGD.

- 25 Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glucoproteínas, lipoproteínas, por ejemplo, lipoproteína de baja densidad (LDL), o albúminas, por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA), o péptidos, por ejemplo, moléculas que tienen una afinidad específica para un co-ligando, o anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específico, tal como una célula de cáncer, célula endotelial, o célula ósea. Los ligandos pueden incluir también hormonas y receptores de hormonas. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, o fucosa multivalente. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de p38 MAP cinasa, o un activador de NF-kB.

- 30 El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo, un fármaco, que puede aumentar la absorción del agente oligonucleótido en la célula, por ejemplo, mediante la ruptura del citoesqueleto de la célula, por ejemplo, mediante la ruptura de microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jlaplaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina, o mioservina.

- 35 En una realización, el ligando es un lípido o molécula basada en lípidos. Dicho lípido o molécula basada en lípido se une preferiblemente a una proteína sérica, por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA). Un ligando de unión a HSA permite la distribución del conjugado en un tejido diana, por ejemplo, tejido hepático, incluyendo las células del parénquima del hígado. Otras moléculas que se pueden unir a HSA se pueden usar también como ligandos. Por ejemplo, se pueden utilizar neproxinao aspirina. Un ligando de lípidos o basado en lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar la orientación o transporte a una célula o membrana celular diana, y/o (c) se puede utilizar para ajustar la unión a una proteína sérica, por ejemplo, HSA.

- 40 Un ligando basado en lípidos puede ser utilizado para modular la unión del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un lípido o un ligando basado en lípidos que se une a HSA con más fuerza será menos propenso a ser dirigido al riñón y por lo tanto menos probable que sea aclarado del cuerpo. Se puede utilizar un lípido o ligando basado en lípidos que se une a HSA menos fuertemente para dirigir el conjugado al riñón.

- 45 En otra realización, el ligando es un resto, por ejemplo, una vitamina o un nutriente, que es absorbido por una célula diana, por ejemplo, una célula en proliferación. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por una proliferación no deseada de células, por ejemplo, de tipo maligno o no maligno, por ejemplo, células cancerosas. Los ejemplos de vitaminas incluyen vitamina A, E, y K. Otras vitaminas ejemplares incluyen las vitaminas B, por ejemplo, ácido fólico, vitamina B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células cancerosas.

En otra realización, el ligando es un agente de permeación celular, preferiblemente un agente de permeación de células helicoidales. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente ejemplar es un péptido tal como tat o antennapedia. Si el agente es un péptido, puede ser modificado, incluyendo un peptidomimético, invertómeros,

enlaces de no péptidos o pseudo-péptidos, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que tiene preferiblemente una fase lipófila y una fase lipófila.

- 5 En una realización preferida, el ligando es un anticuerpo o un fragmento del mismo que es específico para un resto presente en una célula a seleccionar. El resto puede ser una proteína, una estructura de carbohidrato, un polinucleótido, o una combinación de los mismos. El resto puede ser secretado, asociado con la membrana plasmática (por ejemplo, sobre la superficie extracelular o intracelular), citosólico, asociado a orgánulos intracelulares (por ejemplo, ER, complejo de Golgi, mitocondrias, endosoma, lisosoma, vesícula secretora) o nuclear. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser quimérico o humanizado. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena única. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, o cualquier fragmento que retiene la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo intacto.

Actividad inmunoestimulante

Como se utiliza en la presente memoria, "actividad inmunoestimulante" se refiere a la capacidad de un agente, tal como una molécula o una composición, para inducir una respuesta inmunitaria. En una realización, la actividad inmunoestimulante se refiere a la actividad inductora de IFN tipo I, en particular, la actividad inductora de IFN- α .

- 15 Como se usa en la presente memoria, "inducir una respuesta inmunitaria" significa iniciar o causar un aumento en una o más entre la activación de células B, activación de células T, activación de células asesinas naturales, activación de células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células B, células dendríticas, monocitos y macrófagos), producción de citocinas, producción de quimiocinas, expresión de marcador de superficie celular específico, en particular, la expresión de moléculas co-estimulantes. En un aspecto, tal respuesta inmunitaria implica la producción de IFN tipo I (IFN- α y/o IFN- β), en particular, IFN- α , en células tales como PDC (células dendríticas plasmacitoides) y/o monocitos.

Como se usa en esta memoria, "actividad inductora de IFN tipo I" incluye la actividad inductora de IFN- α y/o la actividad inductora de IFN- β .

- 25 Como se usa en la presente memoria, "actividad inductora de IFN- α " se refiere a la capacidad de un agente, tal como una molécula o composición, para inducir la producción de IFN- α a partir de una célula capaz de producir IFN- α . Las células capaces de producir IFN- α incluyen, pero no se limitan a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (por ejemplo, células B, células dendríticas (células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmacitoides), macrófagos, monocitos, células asesinas naturales, granulocitos), células endoteliales, y líneas celulares.

- 30 Como se usa en esta memoria, "actividad inductora de IFN- β " se refiere a la capacidad de un agente, tal como una molécula o composición, para inducir la producción de IFN- β de una célula capaz de producir IFN- β . Cualquier célula somática, tal como las PBMC, las células dendríticas mieloides, monocitos, PDC, fibroblastos, son capaces de producir IFN- β .

Respuesta antiviral

- 35 Como se usa en la presente memoria, "respuesta antiviral" se refiere a la respuesta de una célula, tejido u organismo a la infección por un virus con el fin de eliminar o incapacitar el virus. Las respuestas antivirales típicas incluyen, pero no se limitan a, producción de IFN tipo I, MIP1-a, MCP, RANTES, IL-8, IL-6, IP-10, e IFN- γ .

Respuesta antibacteriana

- 40 Una respuesta antibacteriana es la respuesta de una célula, tejido u organismo a la infección por una bacteria con el fin de eliminar o incapacitar la bacteria. Las respuestas antibacterianas típicas incluyen, pero no se limitan a, eliminación, mediada por las células T o por las células NK, de la célula infectada o por apoptosis mediada por el receptor o por apoptosis mediada por citocinas por medio de TNF o TRAIL, fagocitosis de macrófagos o monocitos.

- 45 Una respuesta antibacteriana, en particular, la producción de IFN tipo I y tipo II, puede ser inducida en células inmunitarias o en células no inmunitarias. Las células inmunitarias incluyen, pero no se limitan a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células dendríticas plasmacitoides (PDC), células dendríticas mieloides (MDC), células B, macrófagos, monocitos, células asesinas naturales, células NKT, células T CD4+, células T CD8+, granulocitos. Las células no inmunitarias incluyen, entre otras, células tumorales, células epiteliales, células endoteliales, y fibroblastos.

Genes, RNA y antígeno relacionados con un trastorno/enfermedad

- 50 Como se utiliza en la presente memoria, "gen relacionado con un trastorno/enfermedad" se refiere a un gen que se expresa o sobreexpresa en una enfermedad/trastorno y que no se expresa o se expresa en cantidad reducida en las células sanas normales. Por ejemplo, un gen CF mutante se expresa en pacientes con fibrosis quística, pero no en un individuo sin fibrosis quística; ErbB2 (o Her2) se sobreexpresa en las células de cáncer de mama en comparación con las células de mama normales; un gen vírico o un gen del hospedante inducido víricamente se expresa en las

- células infectadas, pero no en las células no infectadas. El producto génico del gen relacionado con el trastorno/enfermedad se denomina aquí como el "antígeno relacionado con un trastorno/enfermedad". Un "RNA relacionado con un trastorno/enfermedad" se refiere a una molécula de RNA que está presente o se presenta en un nivel elevado en una célula enferma y que no está presente o se presenta en un nivel reducido en una célula sana normal. Un RNA relacionado con un trastorno/enfermedad puede ser un mRNA, un miRNA, o otro RNA no codificante tal como rRNA o tRNA.
- 5 Mamífero
- Como se utiliza en la presente memoria, el término "mamífero" incluye, sin limitación, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ovejas, ganado, vacas, cerdos, conejos, primates no humanos, y seres humanos.
- 10 Oligonucleótido
- La presente divulgación proporciona un oligonucleótido capaz de inducir la producción de IFN tipo I, en donde el oligonucleótido comprende al menos tres grupos fosfato en el extremo 5', en donde el grupo fosfato está libre de cualquier estructura o modificación de caperuza, en donde el oligonucleótido comprende al menos 1, preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, más preferiblemente al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, aún más preferiblemente al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, lo más preferiblemente al menos 18, 19, 20, 21 ribonucleótidos en el extremo 5', y en donde el oligonucleótido tiene al menos 21 nucleótidos de longitud.
- 15 El oligonucleótido puede ser de cadena sencilla, de cadena sencilla que contiene una secuencia autocomplementaria que puede formar una estructura de horquilla, de cadena doble, o parcialmente de cadena doble.
- 20 Cuando el oligonucleótido es de cadena sencilla, de cadena sencilla que contiene una secuencia autocomplementaria o cadena doble, la longitud del oligonucleótido es la longitud de una sola cadena.
- Cuando el oligonucleótido es parcialmente de cadena doble, la longitud del oligonucleótido es la longitud de la cadena más larga. Por lo tanto, el oligonucleótido incluye oligonucleótidos parcialmente de cadena doble en donde al menos una de las cadenas es al menos de 21 nucleótidos de longitud.
- 25 En el oligonucleótido, el al menos 1 ribonucleótido en el extremo 5' comprende un trifosfato. En el caso de un oligonucleótido de cadena doble o parcialmente de cadena doble, al menos una de las cadenas comprende al menos un grupo 5' trifosfato. Cuando ambas cadenas comprenden grupos 5' fosfato, el número de grupos fosfato puede ser el mismo o puede ser diferente en las dos cadenas. Por lo tanto, los oligonucleótidos de la invención pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, o 6 grupos 5' fosfato en la forma de monofosfato, difosfato y/o trifosfato. En el caso
- 30 de un oligonucleótido parcialmente de cadena doble, el al menos 1 ribonucleótido en el extremo 5' que comprende el al menos un 5' trifosfato puede estar sobre la cadena larga o sobre la corta, en donde al menos la cadena larga es al menos de 21 nucleótidos de longitud.
- En el oligonucleótido, los al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ribonucleótidos en el extremo 5' están en la misma cadena.
- 35 En una realización, al menos uno de los grupos 5' fosfato no está comprendido en un trifosfato. En otra realización, el oligonucleótido comprende al menos un grupo seleccionado de un monofosfato y un difosfato en el extremo 5', en donde el monofosfato y/o difosfato está libre de cualquier caperuza o modificación.
- En una realización, el primer ribonucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido comprende un ribonucleótido seleccionado de A, U, C y G. En una realización preferida, el primer ribonucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido comprende un ribonucleótido seleccionado de A, C y U. En una realización más preferida, el primer ribonucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido comprende un ribonucleótido seleccionado de A y C. En la realización más preferida, el primer ribonucleótido en el extremo 5' comprende una adenina (A).
- 40 En realizaciones preferidas, la secuencia de los 4 primeros nucleótidos en el extremo 5' del oligonucleótido se selecciona de: AAGU, AAAG, AUGG, AUUA, AACG, AUGA, AGUU, AUUG, AACA, AGAA, AGCA, AACU, AUCG, AGGA, AUCA, AUGC, AGUA, AAGC, AACC, AGGU, AAAC, AUGU, ACUG, ACGA, ACAG, AAGG, ACAU, ACGC, AAU, ACGG, AUUC, AGUG, ACAA, AUCC, AGUC, en donde todas las secuencias están en la dirección 5'→ 3'.
- En realizaciones más preferidas, la secuencia de los 4 primeros nucleótidos en el extremo 5' del oligonucleótido se selecciona de: AAGU, AAAG, AUGG, AUUA, AACG, AUGA, AGUU, AUUG, AACA, AGAA, AGCA, AACU, AUCG, AGGA, AUCA, AUGC, AGUA, AAGC, AACC, en donde todas las secuencias están en la dirección 5'→ 3'.
- 50 En realizaciones aún más preferidas, la secuencia de los 4 primeros nucleótidos en el extremo 5' del oligonucleótido se selecciona de: AAGU, AAAG, AUGG, AUUA, AACG, AUGA, AGUU, AUUG, AACA, en donde todas las secuencias están en la dirección 5'→ 3'.
- En las realizaciones más preferidas, la secuencia de los 4 primeros nucleótidos en el extremo 5' del oligonucleótido se selecciona de: AAGU, AAAG, AUGG, AUUA, en donde todas las secuencias están en la dirección 5'→ 3'.

En otras realizaciones, el primer nucleótido de las secuencias de 4-nucleótidos en 5' listadas anteriormente es una U, C o G en lugar de A.

5 En una realización preferida, el oligonucleótido comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, preferiblemente al menos 6, 7, 8, 9, 10, más preferiblemente al menos 11, 12, 13, 14, 15, aún más preferiblemente al menos 16, 17, 18, 19, 20, y lo más preferiblemente al menos 21, 22, 23, 24, 25 inosinas (I). En una realización, al menos 1, 2, 3, 4, 5 %, preferiblemente al menos 10, 15, 20, 25, 30, más preferiblemente al menos 35, 40, 45, 50, 55, 60 %, aún más preferiblemente al menos 70, 80, o 90 % de la adenosina (A) y/o de la guanosina (G) en el oligonucleótido se reemplaza con inosina (I).

10 El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido de RNA, o un oligonucleótido de RNA-DNA quimérico. Un oligonucleótido de RNA-DNA quimérico comprende tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. Los ribonucleótidos y los desoxirribonucleótidos pueden estar en la misma cadena, o pueden estar en diferentes cadenas.

En una realización, el oligonucleótido (RNA o RNA-DNA quimérico) comprende una cadena principal de fosforotioato. En realizaciones preferidas, al menos 1, preferiblemente al menos 2, más preferiblemente al menos 3, aún más preferiblemente al menos 4 nucleótidos son fosforotioato.

15 En una realización preferida, el oligonucleótido no contiene ninguna modificación tal como pseudouridina, 2-tiouridina, 2'-flúor-dNTP, NTP 2'-O-metilado, en particular, 2'-flúor-dCTP, 2'-flúor-dUTP, CTP 2'-O-metilado, UTP 2'-O-metilado.

20 En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene actividad de silenciamiento génico. En una realización, el oligonucleótido es activo en la interferencia de RNA (RNAi), o es una molécula de RNAi. La molécula de RNAi puede ser un siRNA (RNA interferente pequeño, de cadena doble), shRNA (RNA pequeño de horquilla, de cadena sencilla con una estructura de horquilla) o miRNA (micro RNA, de cadena sencilla con una estructura de horquilla).

25 En una realización preferida, el oligonucleótido de RNA es un oligonucleótido de RNA de cadena sencilla que no contiene ninguna secuencia que sea capaz de formar alguna estructura intramolecular o intermolecular de cadena doble consigo misma en condiciones fisiológicas, en particular, condiciones fisiológicas dentro de una célula, y la secuencia de nucleótidos del RNA de cadena sencilla es complementaria de un RNA en una célula diana.

30 En una realización, el RNA se expresa de una manera específica de un tejido, célula y/o etapa de desarrollo. En una realización preferida, el RNA es un RNA relacionado con una enfermedad/trastorno. En una realización, el RNA relacionado con una enfermedad/trastorno es un mRNA de un gen relacionado con una enfermedad/trastorno. En otra realización, el RNA relacionado con una enfermedad/trastorno es un miRNA. El RNA relacionado con una enfermedad/trastorno puede ser un RNA endógeno celular, un RNA vírico, un RNA de un microorganismo u organismo invasor tal como una bacteria, un hongo, o un parásito.

35 El grado de complementariedad es preferiblemente al menos 50 %, 60 %, 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, aún más preferiblemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y lo más preferiblemente 100 %. Tal como se utiliza en la técnica, el término "grado de complementariedad" entre dos oligonucleótidos/polinucleótidos se refiere al porcentaje de bases complementarias en la región de solapamiento de los dos oligonucleótidos. Dos bases son complementarias entre sí si pueden formar un par de bases mediante enlaces de hidrógeno. Los pares de bases incluyen tanto pares de bases de Waston-Crick como pares de bases de balanceo. Los pares de bases de Waston-Crick incluyen A-T, C-G, A-U; los pares de bases de balanceo incluyen G-U, I-U, I-A, I-C. El grado de complementariedad puede ser determinado por los expertos utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, ya sea manualmente o automáticamente por diversos medios tales como BLAST. Por ejemplo, ATCG tiene 100 % de complementariedad con CGAT y CGATGG, y 75 % de complementariedad con CGTT y CGTTGG. En una realización preferida, existe complementariedad entre el oligonucleótido y el RNA diana en la célula diana en toda la longitud del oligonucleótido.

45 El término "condición fisiológica" se usa en la presente memoria como se entiende comúnmente en la técnica. Condición fisiológica dentro de una célula se refiere a parámetros tales como la fuerza iónica, osmolaridad, concentración de sal, pH, temperatura, que se encuentran normalmente dentro de una célula, es decir, en el citosol. La célula puede estar *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. La célula puede ser una célula sana o normal o una célula enferma o anormal. Una célula enferma o anormal puede ser, por ejemplo, una célula infectada por bacterias o virus, una célula tumoral, una célula autoinmunitaria, una célula que tiene una respuesta inflamatoria. Condición fisiológica se refiere a las condiciones en el interior o en el exterior de una célula *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Las condiciones fisiológicas se pueden encontrar en un organismo, tejido, o célula vivos o se pueden obtener artificialmente en un laboratorio. Un ejemplo de una condición fisiológica es NaCl 150 ± 50 mM, pH 7,4 ± 0,8, y 20 ± 20 °C.

55 Si un oligonucleótido de RNA contiene o no alguna estructura de cadena doble puede ser determinado fácilmente por un experto utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un espectrómetro para medir los espectros de absorción de la cadena doble frente a la cadena sencilla, mientras que se aumenta la temperatura. En ciertas realizaciones, el número de pares de bases dentro de la estructura de cadena doble es al menos 6, 7, 8, 9, preferiblemente al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, más preferiblemente al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, aún más preferiblemente al menos 22, 23, 24, 25. Los pares de bases incluyen tanto pares de bases de Waston-

Crick como pares de bases de balanceo. Los pares de bases de Waston-Crick incluyen A-T, C-G, A-U; los pares de bases de balanceo incluyen G-U, I-U, I-A, I-C.

El oligonucleótido de RNA de cadena sencilla puede ser generado por síntesis química.

5 En una realización, el oligonucleótido de RNA de cadena sencilla no tiene ninguna actividad de silenciamiento génico.

En otra realización, el oligonucleótido de RNA de cadena sencilla tiene actividad de silenciamiento génico.

10 Como se usa en la presente memoria, el "precursor del oligonucleótido" se refiere a cualquier molécula que puede ser procesada para generar el oligonucleótido. Los precursores del oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, moléculas de DNA o RNA que pueden servir como moldes para la síntesis de los oligonucleótidos de RNA de la invención, moléculas de RNA o de RNA-DNA quiméricas que pueden ser escindidas enzimáticamente para producir los oligonucleótidos de la invención.

15 El oligonucleótido o su precursor pueden contener también motivos o firmas moleculares que son reconocidos por los TLR. Por ejemplo, los dsRNA largos (más de 30 bases) que llevan un 5' fosfato pueden servir como ligando tanto para RIG-I como para TLR3. Un oligonucleótido de RNA-DNA quimérico que comprende un ssRNA que lleva un 5' fosfato y un ssDNA que contiene CpG puede servir como un ligando tanto para RIG-I como para TLR9. Los ssRNA o dsRNA que llevan un 5' fosfato y motivos definidos de secuencia (S. S. Diebold *et al.*, Science 303, 1529 (Mar 5, 2004); F. Heil *et al.*, Science 303, 1526 (Mar 5, 2004); V. Homung *et al.*, Nat Med 11, 263 (Mar, 2005); documento WO 03/086280; solicitud de patente europea nº 05020020.3) pueden servir como un ligando tanto para RIG-I como para TLR7. Los ssRNA que llevan un 5' trifosfato y motivos ricos en GU (documento WO 03/086280, solicitud de patente europea nº 05 020 019.5) pueden servir como un ligando tanto para RIG-I como para TLR8.

20 En una realización, el oligonucleótido o precursor del mismo comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, aún más preferiblemente al menos cuatro, incluso más preferiblemente al menos cinco, y lo más preferiblemente al menos seis, de los motivos de 4-nucleótidos (4 meros) seleccionados del grupo que consiste en:

25 GUUC (Nº 1), GUCA (Nº 2), GCUC (Nº 3), GUUG (Nº 4), GUUU (Nº 5), GGUU (Nº 6), GUGU (Nº 7), GGUC (Nº 8), GUCU (Nº 9), GUCC (Nº 10), GCUU (Nº 11), UUGU (Nº 12), UGUC (Nº 13), CUGU (Nº 14), CGUC (Nº 15), UGUU (Nº 16), GUUA (Nº 17), UGUA (Nº 18), UUUC (Nº 19), UGUG (Nº 20), GGUA (Nº 21), GUCG (Nº 22), UUGG (Nº 23), UGGU (Nº 24), GUGG (Nº 25), GUGC (Nº 26), GUAC (Nº 27), GUAU (Nº 28), UAGU (Nº 29), GUAG (Nº 30), UUCA (Nº 31), UUGG (Nº 32), UCUC (Nº 33), CAGU (Nº 34), UUCG (Nº 35), CUUC (Nº 36), GAGU (Nº 37), GGUG (Nº 38), UUGC (Nº 39), UUUU (Nº 40), CUCA (Nº 41), UCGU (Nº 42), UUCU (Nº 43), UGGC (Nº 44), CGUU (Nº 45), CUUG (Nº 46), UUAC (No.47),

en donde las secuencias de nucleótidos de los motivos van de 5' →3',

35 en donde el oligonucleótido o precursor del mismo tiene entre 12 y 64, preferiblemente entre 12 y 50, más preferiblemente entre 14 y 40, aún más preferiblemente entre 16 y 36, y lo más preferiblemente entre 18 y 25 nucleótidos de longitud.

En una realización, los motivos de 4 meros se seleccionan del grupo que consiste en el Nº 1-19, Nº 1-18, Nº 1-17, Nº 1-16, preferiblemente, Nº 1-15, Nº 1- 14, Nº 1-13, Nº 1-12, más preferiblemente, Nº 1-11, Nº 1-10, Nº 1-9, Nº 1-8, Nº 1-7, aún más preferiblemente, Nº 1-6, Nº 1-5, Nº 1-4, Nº 1-3, lo más preferiblemente, Nº 1-2 de los motivos de 4 meros.

40 El oligonucleótido o precursor del mismo puede comprender una o más copias del mismo motivo de 4 meros, o una o más copias de diferentes motivos de 4 meros.

45 En otra realización, el oligonucleótido o un precursor del mismo comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, aún más preferiblemente al menos cuatro, incluso más preferiblemente al menos cinco, y lo más preferiblemente al menos seis, de los motivos de 4-nucleótidos (4 meros) seleccionados del grupo que consiste en:

50 UCGU (Nº 1), GUUG (Nº 2), UGGU (Nº 3), UGGC (Nº 4), GGUA (Nº 5), UGAU (Nº 6), UGCU (Nº 7), UUGC (Nº 8), UUGU (Nº 9), UAGU (Nº 10), GGUU (Nº 11), GUUU (Nº 12), UGUG (Nº 13), GUGU (Nº 14), UGCC (Nº 15), GUAU (Nº 16), GUGC (Nº 17), UGUA (Nº 18), UGUC (Nº 19), CUGU (Nº 20), UGAC (Nº 21), UGUU (Nº 22), UAAU (Nº 23), GUAG (Nº 24), UCUU (Nº 25), UUGG (Nº 26), UUUG (Nº 27), GGUA (Nº 28), UUUU (Nº 29), CGUU (Nº 30), UUAU (Nº 31), GUUC (Nº 32), GUGG (Nº 33), GGUG (Nº 34), UAAU (Nº 35), UCUG (Nº 36), GUAC (Nº 37), UAGG (Nº 38), UCUC (Nº 39), UAGC (Nº 40), UAUC (Nº 41), CUAU (Nº 42), UACU (Nº 43), CGGU (Nº 44), UGCG (Nº 45), UUUC (Nº 46), UAUG (Nº 47), UAAG (Nº 48), UACC (Nº 49), UUAG (Nº 50), GCUU (Nº 51), CAGU (Nº 52), UGAG (Nº 53), GAUU (Nº 54), GAGU (Nº 55), GUUA (Nº 56), UGCA (Nº 57), UUCU (Nº 58), GCCU (Nº 59), GGUC (Nº 60), GGCU (Nº 61), UUAC (Nº 62), UCAU (Nº 63), GCGU (Nº 64), GCAU (Nº 65), GAUG (Nº 66), GUCU (Nº 67), CGUA (Nº 68), CGAU (Nº 69),

en donde las secuencias de nucleótidos de los motivos van de 5' →3' ,

en donde el oligonucleótido o precursor el mismo tiene entre 12 y 64, preferiblemente entre 12 y 50, más preferiblemente entre 14 y 40, aún más preferiblemente entre 16 y 36, y lo más preferiblemente entre 18 y 30 nucleótidos de longitud.

- 5 En una realización, los motivos de 4 meros se seleccionan del grupo que consiste en el N° 1-11, preferiblemente N° 1-10, N° 1-9, N° 1-8, más preferiblemente N° 1-7, N° 1-6, N° 1-5, N° 1-4, aún más preferiblemente N° 1-3, N° 1-2 de los motivos de 4 meros listados anteriormente, lo más preferiblemente, el motivo de 4 meros es UCGU.

El oligonucleótido o precursor del mismo puede comprender una o más copias del mismo motivo de 4 meros, o una o más copias de diferentes motivos de 4 meros.

- 10 El oligonucleótido o el precursor del mismo se puede utilizar para generar una gran cantidad de IFN tipo I, en particular, IFN- α , IL-18 y/o IL-1 β *in vitro* y/o *in vivo*. Dichas citocinas se pueden generar en altas cantidades a partir de diferentes fuentes celulares, incluyendo tanto las células inmunitarias como no inmunitarias, de diferentes especies de vertebrados.

- 15 El oligonucleótido y el precursor del mismo se pueden preparar por métodos sintéticos incluyendo, pero sin limitarse a, síntesis química, transcripción *in vitro* y transcripción *in vivo*. En la transcripción *in vitro*, se pueden utilizar polimerasas, incluyendo, pero sin limitarse a, una polimerasa de bacteriófago tal como polimerasa T7, polimerasa T3, polimerasa SP6, polimerasas víricas, y RNA polimerasa de E. coli. La transcripción *in vivo* se puede conseguir en las células infectadas por virus, o bacterias que son infectadas o no infectadas con un fago.

- 20 Además, los oligonucleótidos o sus precursores, en particular, los oligonucleótidos de RNA, para uso de la invención pueden ser unidos covalentemente o no covalentemente a uno o más grupos lipófilos que mejoran la estabilidad y/o la actividad y/o facilitan la administración de los oligonucleótidos o precursores de los mismos.

- 25 Tal como se utiliza aquí, el término "lipófilo" o "grupo lipófilo" se refiere en términos generales a cualquier compuesto o resto químico que tiene una afinidad por los lípidos. Los grupos lipófilos engloban compuestos de muchos tipos diferentes, incluyendo aquellos que tienen características aromáticas, alifáticas o alicíclicas, y combinaciones de los mismos.

- 30 En realizaciones específicas, el grupo lipófilo es una sustancia alifática, alicíclica, o polialicíclica, tal como un esteroide (por ejemplo, esterol) o un hidrocarburo alifático ramificado. El grupo lipófilo comprende generalmente una cadena de hidrocarburo, que puede ser cíclico o acíclico. La cadena de hidrocarburo puede comprender varios sustituyentes y/o al menos un heteroátomo, tal como un átomo de oxígeno. Tales restos alifáticos lipófilos incluyen, sin limitación, ácidos grasos saturados o insaturados, ceras (por ejemplo, ésteres de alcohol monovalente de ácidos grasos y diamidas grasas), terpenos (por ejemplo, los terpenos C₁₀, sesquiterpenos C₁₅, diterpenos C₂₀, triterpenos C₃₀, y tetraterpenos C₄₀), y otros hidrocarburos polialicíclicos.

- 35 El grupo lipófilo se puede unir por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo por medio de un agrupamiento funcional presente en o introducido en el oligonucleótido de RNA, tal como un grupo hidroxilo (por ejemplo, -CO-CH₂-OH). Se puede producir la conjugación del oligonucleótido de RNA y el grupo lipófilo, por ejemplo, mediante la formación de un enlace de éter o de éster carboxílico o de carbamoilo entre el hidroxilo y un grupo alquilo R-, un grupo alcanilo RCO- o un grupo carbamoilo sustituido KNHCO-. El grupo alquilo R puede ser cíclico (por ejemplo, ciclohexilo) o acíclico (por ejemplo, de cadena lineal o ramificada; y saturado o insaturado). El grupo alquilo R puede ser un grupo butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo u octadecilo, o similares. Preferiblemente, el grupo lipófilo se conjuga con el grupo 5' hidroxilo del nucleótido terminal. En una realización preferida, el grupo lipófilo es bisdecilamida de ácido 12-hidroxidodecanoico.

- 45 En otra realización, el grupo lipófilo es un esteroide, tal como esterol. Los esteroides son compuestos policíclicos que contienen un sistema de anillo perhidro-1,2-ciclopentanofenantreno. Los esteroides incluyen, sin limitación, ácidos biliares (por ejemplo, ácido cólico, ácido desoxicólico y ácido deshidrocólico), cortisona, digoxigenina, testosterona, colesterol y esteroides catiónicos, tales como la cortisona.

- 50 En una realización preferida, el grupo lipófilo es colesterol o un derivado del mismo. Un "derivado de colesterol" se refiere a un compuesto derivado de colesterol, por ejemplo, por sustitución, adición o separación de sustituyentes. El esteroide se puede unir al oligonucleótido de RNA mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización preferida, el grupo lipófilo es carbamato de (6-hidroxihexil)colesterilo.

- 55 En otra realización, el grupo lipófilo es un resto aromático. En este contexto, el término "aromático" se refiere en términos generales a hidrocarburos mono y poliaromáticos. Los grupos aromáticos incluyen, sin limitación, restos de arilo C₆₋₁₄ que comprenden uno a tres anillos aromáticos, que pueden estar opcionalmente sustituidos; grupos "aralquilo" o "arilalquilo" que comprenden un grupo arilo unido covalentemente a un grupo alquilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente independientemente sustituido o no sustituido; y grupos "heteroarilo". Como se utiliza en la presente memoria, el término "heteroarilo" se refiere a grupos que tienen 5 a 14 átomos en el anillo,

preferiblemente 5, 6, 9, o 10 átomos en el anillo; que tienen 6, 10, o 14 electrones π compartidos en una disposición cíclica; y que tienen, además de los átomos de carbono, entre uno y aproximadamente tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y azufre (S).

5 Como se usa en esta memoria, un grupo alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, o heterocíclico "sustituido" es uno que tiene entre uno y aproximadamente cuatro, preferentemente entre uno y aproximadamente tres, más preferentemente uno o dos, sustituyentes que no son hidrógeno. Los sustituyentes adecuados incluyen, sin limitación, grupos halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcoxycarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido.

10 El grupo lipófilo se puede unir covalentemente directa o indirectamente por medio de un enlace al oligonucleótido o precursor del mismo. El enlace covalente puede comprender o no un grupo fosfodiéster. Y el enlace puede ser de varias longitudes. Las longitudes preferidas del enlace son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden determinar experimentalmente.

15 En una realización, el grupo lipófilo está unido covalentemente al extremo 3' de al menos una cadena del oligonucleótido o precursor del mismo.

20 Además, el oligonucleótido o precursor del mismo puede ser acoplado a un soporte sólido. Por "acoplado" se quiere decir que el oligonucleótido o precursor del mismo está covalentemente o no covalentemente, directa o indirectamente, unido al soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, obleas de silicio, soporte de polímero sintético, tal como nanopartículas de poliestireno, polipropileno, poliglicidilmetacrilato, poliestireno sustituido (por ejemplo, poliestireno aminado o carboxilado, poli(acrilamidas, poliamidas, cloruros de polivinilo, etc.), vidrio, agarosa, nitrocelulosa, nailón y gelatina. El soporte sólido puede mejorar la estabilidad y la actividad del oligonucleótido, especialmente de los oligonucleótidos cortos de menos de 16 nucleótidos de longitud.

Conjugados de oligonucleótidos

25 La presente divulgación proporciona también un conjugado de oligonucleótidos que es capaz de inducir una respuesta antivírica, en particular, la producción de IFN tipo I, que comprende un oligonucleótido y un antígeno conjugado con el oligonucleótido. El antígeno se conjuga con el oligonucleótido en una posición distinta de su extremo 5' que lleva el 5' trifosfato. En algunas realizaciones, el antígeno produce un efecto de vacuna.

30 El antígeno se selecciona preferiblemente de antígenos relacionados con una enfermedad/trastorno, por ejemplo, un cáncer. El antígeno puede ser una proteína, un polipéptido, un péptido, un carbohidrato, o una combinación de los mismos.

35 El oligonucleótido se puede unir covalentemente al antígeno, o se asocia de otra manera operativamente con el antígeno. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "asociado operativamente con" se refiere a cualquier asociación que mantenga la actividad de ambos, el oligonucleótido y el antígeno. Los ejemplos no limitantes de tales asociaciones operativas incluyen ser parte del mismo liposoma o de otro de dichos vehículos o reactivos de administración. En realizaciones en las que el agente oligonucleótido está unido covalentemente al antígeno, tal enlace covalente preferiblemente está en cualquier posición sobre el oligonucleótido que no interfiera con la capacidad del oligonucleótido de inducir una respuesta antivírica.

Composición farmacéutica

40 La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más de los oligonucleótidos descritos anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término complementario es bien entendido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, A es complementario a T, G es complementario a C, 5'-AG-3' es complementario a 5'-CT-3'.

45 El grado de complementariedad entre dos secuencias de nucleótidos es el porcentaje de bases complementarias en la región de solapamiento de las dos secuencias de nucleótidos. El grado de complementariedad se puede determinar manualmente o automáticamente por diversos medios tales como BLAST. Por ejemplo, ATCG tiene 100 % de complementariedad con CGAT y CGATGG, y 75 % de complementariedad con CGTT y CGTTGG. Además, el grado de complementariedad entre un oligonucleótido o polinucleótido de RNA y cualquiera de las secuencias presentes en las bases de datos públicas (por ejemplo, EMBL, GeneBank) puede ser determinado por el programa BLAST.

50 En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además un agente que facilita la administración del oligonucleótido a una célula, en particular, al citosol de la célula.

En una realización, el agente de administración es un agente de complejación que forma un complejo con el oligonucleótido o el precursor del mismo y facilita la administración del oligonucleótido o precursor del mismo a las células. En una realización, el agente de complejación es un polímero, preferiblemente un polímero catiónico. En

- una realización preferida, el agente de complejación es un lípido catiónico. En otra realización preferida, el agente de complejación es polietiliminina (PEI) (K. Wu *et al.*, *Brain Research* 1008 (2): 284-287 (May 22, 2004); B. Urban-Klein *et al.* *Gene Therapy* 12(5): 461-466 (2005)). Ejemplos adicionales de agente de complejación incluyen, pero no se limitan a, derivados de colágeno (Y. Minakuchi *et al.* *Nucleic Acids Research* 32(13):e109 (2004)), y microesferas biodegradables tales como liposomas (M. Sioud, D. Sorensen, *Biochem Biophys Res Commun* 312(4): 1220-1225 (2003); PY Chien *et al.* *Cancer Gene Therapy* 12(3): 321-328 (2005)), virosomas (J de Jonge *et al.* *Gene Therapy*, 13: 400- 411 (2006)), SNALPs (JJ Rossi, *Gene Therapy* 13: 583-584 (2006)), SICOMATRIX® (CSL Limited) (I. D. Davis *et al.* *PNAS* 101 (29): 10697-10702 (July 20, 2004); MJ Pearse, D. Drane, *Adv Drug Deliv Rev* 57(3):465-474 (Jan 10, 2005)), y microesferas de copolímero de poli (D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) (A. Khan *et al.* *J Drug Target* 12(6): 393-404 (2004)).
- La polietiliminina (PEI) puede ser lineal o ramificada. En una realización preferida, PEI es jetPEI™ *in vivo* que es una PEI lineal desarrollada por PolyPlus-transfección para la administración eficaz y reproducible de oligonucleótidos aniónicos con baja toxicidad *in vivo*. Las vías de administración preferidas *in vivo* incluyen, pero no se limitan a las vías, intravenosa, intracerebral e intraperitoneal.
- Los virosomas son envolturas víricas reconstituidas que se preparan a partir de virus con membrana de envoltura, en particular, virus de la gripe, por solubilización de la membrana vírica con un detergente adecuado, separación de las nucleocápsidas por ultracentrifugación y reconstitución de la envoltura vírica por medio de la extracción del detergente. Típicamente, los virosomas contienen lípidos víricos y glucoproteínas víricas (tales como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) en el caso de virosomas de la gripe), se asemejan a las partículas de virus nativas en tamaño y morfología y retienen la especificidad del objetivo y la actividad fusogénica de las partículas víricas nativas.
- Las SNALP indican partículas estables de ácido nucleico-lípido y contienen una bicapa lipídica compuesta de una mezcla de lípidos catiónicos y fusogénicos recubiertos con polietilenglicol difusible (PEG). Las SNALP están en el intervalo de tamaño de diámetro de 120 nanómetros, protegen al ácido nucleico incluido de las nucleasas séricas y permiten la absorción endosómica celular y la posterior liberación citoplasmática del ácido nucleico.
- ISCOMATRIX® está hecho de saponina, colesterol y fosfolípidos en condiciones definidas y forma estructuras tipo jaula típicamente de 40 nm de diámetro. ISCOMATRIX® tiene la capacidad dual de facilitar la administración de la carga (por ejemplo, antígeno) y estimular el sistema inmunitario, tanto la respuesta inmunitaria celular como la humoral.
- En otra realización, el agente de administración es un virus, preferiblemente un virus de replicación deficiente. En una realización, el oligonucleótido descrito en la invención está contenido en una cápsula vírica.
- Los virus adecuados incluyen, pero no se limitan a, polimixovirus que se dirigen a los epitelios del tracto respiratorio superior y otras células, el virus de la hepatitis B que se dirige a las células del hígado, el virus de la gripe que se dirige a las células epiteliales y otras células, los adenovirus que se dirigen a una serie de diferentes tipos de células, los virus del papiloma que se dirigen a las células epiteliales y escamosas, el virus del herpes que se dirige a las neuronas, los retrovirus tales como el VIH que se dirige a las células T CD4⁺ y células dendríticas y otras células, y el virus Vaccinia Ankara modificado que se dirige a una variedad de células. Los virus pueden ser seleccionados en función de su especificidad de objetivo.
- En una realización, el virus es un virus oncolítico. Los virus oncolíticos se dirigen a las células tumorales y causan la lisis de las células tumorales infectadas. Ejemplos de virus oncolíticos incluyen, pero no se limitan a, virus naturales de la enfermedad de Newcastle producida naturalmente (A. Phuangsab *et al.* *Cancer Lett.* 172: 27-36 (2001)), cepas atenuadas de reovirus (MC Coffey *et al.* *Science* 282: 1332-1334 (1998)) y virus de la estomatitis vesicular (VSV) (DF Stojdl *et al.* *Nat Med.* 6: 821-825 (2000)), mutantes de ingeniería genética de virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), adenovirus, virus de la viruela y virus del sarampión (Chiocca EA *Nat Rev Cancer* 2: 938-950 (2002); Russell SJ *Cancer gene Ther* 9: 961-966 (2002); HJ Zen, DL Bartlett *Cancer gene Ther* 9: 1001-1012 (2002)).
- Además de ser administrado por un agente de administración, el oligonucleótido o precursor del mismo puede ser administrado a las células por medio de medios físicos tales como la electroporación, administración por ondas de choque (Tschoep K *et al.*, *J Mol Med* 2001; 79: 306-13), transfección desencadenada por ultrasonidos, y administración por pistola de genes con partículas de oro.
- La composición farmacéutica puede comprender además otro agente tal como un agente que estabiliza el oligonucleótido, en particular, oligonucleótido de RNA, por ejemplo, una proteína que forma complejo con el agente oligonucleótido para formar una iRNP. Aun otros agentes incluyen quelantes, por ejemplo, EDTA (por ejemplo, para eliminar los cationes divalentes tales como Mg²⁺), sales, inhibidores de RNasa (por ejemplo, un inhibidor de RNasa de amplia especificidad tal como RNAsin) y así sucesivamente.
- Una composición formulada puede asumir una variedad de estados. En algunos ejemplos, la composición es al menos parcialmente cristalina, uniformemente cristalina, y/o anhidra (por ejemplo, menos de 80, 50, 30, 20, o 10 % de agua). En otro ejemplo, el agente oligonucleótido está en una fase acuosa, por ejemplo, en una solución que incluye agua, siendo esta forma la forma preferida para la administración mediante inhalación.

La fase acuosa o las composiciones cristalinas se pueden incorporar a un vehículo de administración, por ejemplo, un liposoma (en particular para la fase acuosa), o una partícula (por ejemplo, una micropartícula que puede ser apropiada para una composición cristalina). Generalmente, la composición de oligonucleótidos se formula en una forma que sea compatible con el método de administración pretendido.

- 5 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a ellas, las vías oral o parenteral, incluyendo la administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, por vías respiratorias (aerosol), ocular, rectal, vaginal, y tópica (incluyendo bucal y sublingual). En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas se administran por perfusión o inyección intravenosa o intraparenteral. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar también
10 intraparenquimalmente, intratecalmente, y/o por inyección estereotáctica.

Para la administración oral, el oligonucleótido se proporcionará generalmente en forma de comprimidos o cápsulas, como un polvo o gránulos, o como una solución o suspensión acuosa.

- 15 Los comprimidos para uso oral pueden incluir los ingredientes activos mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y de calcio, fosfato de sodio y de calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, será generalmente estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de
20 glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

Las cápsulas para uso oral incluyen cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido, y cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

- 25 Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, las composiciones farmacéuticas generalmente se proporcionarán en soluciones o suspensiones acuosas estériles, tamponadas a un pH e isotonicidad apropiados. Los vehículos acuosos adecuados incluyen solución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. Las suspensiones acuosas según la invención pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y goma de tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y de n-propilo.

- 30 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también formulaciones encapsuladas para proteger el oligonucleótido contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilen-vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova
35 Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) también se pueden utilizar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 4.522.811; en la publicación PCT WO 91/06309; y en la publicación de patente europea EP-A-43075.
40

En general, una dosis adecuada de un oligonucleótido estará en el intervalo de 0,001 a 500 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor al día (por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 1 miligramo por kilogramo a
45 aproximadamente 75 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 10 microgramos por kilogramo a aproximadamente 50 miligramos por kilogramo, o de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo). La composición farmacéutica se puede administrar una vez al día, o el oligonucleótido se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis a intervalos apropiados a lo largo del día. En ese caso, el oligonucleótido contenido en cada subdosis debe ser
50 correspondientemente más pequeño con el fin de lograr la dosis diaria total. La unidad de dosificación también se puede componer para administración durante varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona una liberación sostenida del agente durante un período de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en la técnica. En esta realización, la unidad de dosificación contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

- 55 Los expertos apreciarán que ciertos factores pueden influir en la dosis y en el tiempo requerido para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a la gravedad de la enfermedad/trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades/trastornos presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos. Las estimaciones de las dosis eficaces y las semividas *in vivo* para el oligonucleótido

individual se pueden hacer utilizando metodologías convencionales o sobre la base de los ensayos *in vivo* utilizando un modelo animal apropiado.

5 La toxicidad y la eficacia terapéutica del oligonucleótido y de la composición farmacéutica se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y los terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren agentes oligonucleótidos que presenten altos índices terapéuticos.

10 Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. Las dosificaciones de las composiciones están preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente oligonucleótido para uso en la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos animales para 15 alcanzar un intervalo de concentración circulante en plasma del agente oligonucleótido que incluye la IC50 (es decir, la concentración del agente oligonucleótido de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía de líquidos de alta resolución.

20 El médico dispensador puede ajustar la cantidad y el momento de la administración de la composición farmacéutica en base a los resultados observados utilizando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en la presente memoria.

25 La composición farmacéutica se puede utilizar para generar una gran cantidad de IFN tipo I, en particular, IFN- α , IL-18 y/o IL-1 β , *in vitro* y/o *in vivo*. El IFN tipo I, en particular, IFN- α , IL-18 y/o IL-1 β , se puede generar en altas cantidades a partir de diferentes fuentes celulares, incluyendo tanto las células inmunitarias como las no inmunitarias, de diferentes especies de vertebrados.

La composición farmacéutica se puede usar para prevenir y/o tratar una enfermedad y/o un trastorno en un animal vertebrado, en particular, un mamífero, en la práctica médica y/o veterinaria. La enfermedad y/o trastorno es un tumor.

30 Preparación combinada

La presente divulgación proporciona una preparación combinada que comprende un oligonucleótido y un agente farmacéuticamente activo, en donde el oligonucleótido y el agente son para administración simultánea, separada o secuencial.

35 Los agentes farmacéuticamente activos incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos de RNA inmunoestimulantes, oligonucleótidos de DNA inmunoestimulantes, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, antibióticos, factores antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, agentes antivíricos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antiparasitarios, anticuerpos y agentes de silenciamiento génico.

40 La preparación combinada puede comprender uno o más agentes farmacéuticamente activos. Los uno o más agentes farmacéuticamente activos pueden ser de la misma o diferente categoría como se ha ejemplificado anteriormente.

En una realización, la preparación combinada comprende un oligonucleótido y un agente inmunoestimulante, en donde el oligonucleótido y el agente son para administración simultánea, separada o secuencial. En una realización, la preparación combinada comprende además un agente antivírico y/o antitumoral.

45 En otra realización, la preparación combinada comprende un oligonucleótido y un agente antivírico y/o antibacteriano y/o antitumoral, en donde el oligonucleótido y el agente son para administración simultánea, separada o secuencial. En una realización, la preparación combinada comprende además un agente inmunoestimulante.

El oligonucleótido y el agente farmacéuticamente activo pueden estar comprendidos en la misma composición o en composiciones separadas. Las composiciones separadas se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente.

50 La preparación combinada puede comprender además ácido retinoico y/o IFN tipo I. Se sabe que el ácido retinoico y/o el IFN tipo I regulan por incremento la expresión de RIG-I en la mayoría de tipos de células, incluyendo por ejemplo células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, células inmunitarias y células tumorales.

Un agente inmunoestimulante es un agente, tal como una molécula o una composición, que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. Los agentes inmunoestimulantes incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos de RNA

- 5 inmuoestimulantes tales como los que son capaces de inducir IFN- α o IL-12 (Heil F *et al.* 2004, Science 303: 1526-1529; Sioud M *et al.* 2005, J Mol Biol 348: 1079-1090; Homung V *et al.* 2005, Nat Med. 11: 263-270; Judge AD *et al.*, 2005, Nat Biotechnol 2005, 23: 457-462; Sugiyama *et al.* 2005, J Immunol 174: 2273-2279; Gitlin L *et al.* 2006, PNAS 103 (22): 8459-8464; Solicitudes de patente europea números 05020020.3 y 05020019.5) (por ejemplo, poli(I:C) y oligonucleótidos de DNA inmuoestimulantes tales como un oligonucleótido de DNA que contiene CpG o que no contiene CpG capaz de inducir IFN- α (véase, por ejemplo, los documentos WO 01/22990, WO 03/101375), citocinas tales como IFN tipo I e IL-12, quimiocinas tales como IP-10, MIP1- α , MCP, RANTES, IL-8, y factores de crecimiento tales como IL-3, GM-CSF, G-CSF, M-CSF.
- 10 En una realización, el agente inmuoestimulante es capaz de inducir una respuesta antivírica, tal como la producción de IFN tipo I, MIP1-a, MCP, RANTES, IL-8 e IL-6.
- Un agente antivírico es un agente que es útil en la prevención y en el tratamiento de una infección vírica. Los agentes antivíricos incluyen, pero no se limitan a los análogos de nucleósidos (tales como aciclovir, ganciclovir, ribavirina, lamivudina, etc.), inhibidores de proteasa (tales como ritonavir etc), agentes citotóxicos (tales como taxoles, carboplatinos, ciclofosfamida, metotrexato, azatiprina, 5-fluorouracilo, etc.)
- 15 En otra realización, el agente inmuoestimulante es capaz de inducir una respuesta antibacteriana, tal como la producción de IFN tipo I y/o tipo II.
- Un agente antibacteriano es un agente que es útil en la prevención y en el tratamiento de una infección bacteriana, en particular, infección bacteriana intracelular. Los agentes antibacterianos incluyen, pero no se limitan a, aminoglucósidos, carbapenemos, cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, monobactámicos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas.
- 20 Un agente antitumoral es un agente que es útil en la prevención y el tratamiento de tumores o cáncer. Los agentes antitumorales incluyen, pero no se limitan a agentes quimioterapéuticos (tales como cisplatino, doxorubicina, taxoles, carboplatinos, ciclofosfamida, metotrexato, azatiprina, 5-fluorouracilo, etc.), factores antiangiogénicos (tales como vasostatina y anticuerpo anti-VEGF), y otros agentes anticáncer, tales como Herceptin[®], Rituxan[®], Gleevec[®], e Iressa[®].
- 25 Un agente de silenciamiento génico es un agente que es capaz de la regulación por disminución de la expresión de un gen. El gen puede codificar una proteína, un rRNA, un tRNA, o un miRNA. Ejemplos de un agente de silenciamiento génico incluyen, pero no se limitan a, un RNA antisentido, una molécula de RNAi (tal como siRNA, shRNA, miRNA), y un antagomir (que es un RNA de cadena sencilla conjugado con colesterol que es complementario a un miRNA).
- 30 En una realización preferida, la preparación combinada comprende además un agente de administración de oligonucleótido como se ha descrito previamente. En otras realizaciones preferidas, el oligonucleótido puede ser administrado por medios físicos como se ha descrito previamente.
- Presentación farmacéutica
- 35 La presente divulgación proporciona una presentación farmacéutica que comprende la composición farmacéutica o la preparación combinada de la divulgación y una instrucción para el uso.
- Uso del oligonucleótido para inducir la apoptosis
- La presente invención proporciona el uso del oligonucleótido descrito en las reivindicaciones para la preparación de una composición farmacéutica para inducir la apoptosis en un animal vertebrado, en particular, en un mamífero.
- 40 La apoptosis es inducida en las células tumorales.
- La inducción de la apoptosis puede ser terapéuticamente beneficiosa para individuos que tienen enfermedades/trastornos causados por un exceso de proliferación y/o apoptosis comprometida de células, por ejemplo, un tumor.
- Uso del oligonucleótido para inducir una respuesta antitumoral
- 45 La presente divulgación proporciona el uso del oligonucleótido para la preparación de una composición farmacéutica para inducir una respuesta antitumoral en un animal vertebrado, en particular, un mamífero.
- El tumor puede ser benigno o maligno.
- La respuesta antitumoral comprende la inducción de IFN tipo I y/o de la apoptosis de células tumorales.
- 50 En una realización preferida, el oligonucleótido de RNA es un oligonucleótido de RNA de cadena sencilla que no contiene ninguna secuencia que sea capaz de formar alguna estructura intramolecular o intermolecular de cadena

doble consigo misma en condiciones fisiológicas, en particular, condiciones fisiológicas dentro de una célula, y la secuencia de nucleótidos del RNA de cadena sencilla es complementaria de un RNA específico de tumor.

El RNA específico de tumor puede ser un mRNA de un antígeno específico de tumor. El RNA específico de tumor puede ser un miRNA.

- 5 El grado de complementariedad es preferiblemente al menos 50 %, 60 %, 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, aún más preferiblemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y lo más preferiblemente 100 %.

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

- 10 En una realización, el oligonucleótido de ssRNA y su cadena complementaria se administran por separado a las células, preferiblemente de una manera específica de la célula diana.

- 15 En otra realización, un oligonucleótido de RNA de cadena sencilla que comprende una o más modificaciones seleccionadas de pseudouridina, 2-tiouridina, 2'-flúor-dNTP, NTP 2'-O-metilado, en particular, 2'-flúor-dCTP, 2'-flúor-dUTP, CTP 2'-O-metilado, UTP 2'-O-metilado y que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria de un oligonucleótido de RNA descrito en la presente divulgación, se puede usar para inactivar el oligonucleótido de RNA y para interrumpir la respuesta antitumoral.

Uso del oligonucleótido para tratar enfermedades/trastornos

- 20 La presente invención proporciona el uso del oligonucleótido descrito en las reivindicaciones para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar una enfermedad y/o trastorno en un animal vertebrado, en particular, un mamífero, en la práctica médica y/o veterinaria.

La enfermedad y/o trastorno es un tumor.

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

- 25 Los cánceres incluyen, pero no se limitan a cáncer de tracto biliar, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, mielomas, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcoma, cáncer de piel, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer renal.

- 30 En ciertas realizaciones, los cánceres se seleccionan de leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, leucemia de células T cutánea, leucemia mieloide crónica, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de células de vejiga, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma hepatocelular, basalioma, carcinoma de colon, displasia del cuello uterino, y sarcoma de Kaposi (relacionado con el SIDA y no relacionado con el SIDA).

- 35 En una realización, la composición farmacéutica es una vacuna tumoral. El oligonucleótido puede inducir la apoptosis de células tumorales mediante la unión a RIG-I, inducir la producción de IFN tipo I, IL-18 y/o IL-1 β por las células tumorales, activar directamente y/o indirectamente las células efectoras de inmunidad innata tales como las células NK, células NKT y células T $\gamma\delta$, y/o directamente y/o indirectamente inactivar las células T supresoras, llevando de este modo a la inhibición y/o destrucción del crecimiento de las células tumorales.

- 40 Las células tumorales que han sido estimuladas con un ligando de RIG-I, tal como el oligonucleótido, se pueden usar también como una vacuna tumoral.

- 45 En una realización preferida, el oligonucleótido de RNA es un oligonucleótido de RNA de cadena sencilla que no contiene ninguna secuencia que sea capaz de formar alguna estructura intramolecular o intermolecular de cadena doble consigo misma en condiciones fisiológicas, en particular, condiciones fisiológicas dentro de una célula, y la secuencia de nucleótidos del RNA de cadena sencilla es complementaria de un RNA relacionado con una enfermedad/trastorno.

En una realización, el RNA relacionado con una enfermedad/trastorno es un mRNA de un gen relacionado con la enfermedad/trastorno. En otra realización, el RNA relacionado con una enfermedad/trastorno es un miRNA. El RNA relacionado con una enfermedad/trastorno puede ser un RNA celular endógeno, un RNA vírico, un RNA procedente de un microorganismo u organismo invasor tal como una bacteria, un hongo, o un parásito.

- 50 El grado de complementariedad es preferiblemente al menos 50 %, 60 %, 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, aún más preferiblemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y lo más preferiblemente 100 %.

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

5 En una realización, un oligonucleótido de RNA de cadena sencilla que comprende una o más modificaciones seleccionadas de pseudouridina, 2-tiouridina, 2'-flúor-dNTP, NTP 2'-O-metilado, en particular, 2'-flúor-dCTP, 2'-flúor-dUTP, CTP 2'-O-metilado, UTP 2'-O-metilado y que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria de un oligonucleótido de ssRNA, se puede usar para inactivar el oligonucleótido de RNA y para interrumpir la inducción de IFN tipo I.

10 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido se utiliza en combinación con uno o agentes farmacéuticamente activos tales como agentes inmunoestimulantes, agentes antivíricos, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes antiparasitarios, agentes antitumorales, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos y agentes de silenciamiento génico. Los más de uno agentes farmacéuticamente activos pueden ser de la misma categoría o diferente.

En realizaciones preferidas, el oligonucleótido se utiliza en combinación con una vacuna antivírica o una vacuna antibacteriana o una vacuna antitumoral, en donde la vacuna puede ser profiláctica y/o terapéutica.

15 En otras realizaciones, la composición farmacéutica es para uso en combinación con uno o más tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades y/o trastornos tales como infección, tumor, esclerosis múltiple, e inmunodeficiencia. Por ejemplo, los tratamientos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia neoadyuvante, termoablación, y crioablación.

20 En una realización adicional, el oligonucleótido se utiliza en combinación con ácido retinoico y/o IFN tipo I. Se sabe que el ácido retinoico y/o el IFN tipo I regulan por incremento la expresión de RIG-I en la mayoría de tipos de células, incluyendo por ejemplo células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, células inmunitarias y células tumorales.

25 En una realización, la composición farmacéutica comprende además un agente de administración como se ha descrito previamente. El oligonucleótido se puede administrar también por medios físicos como se ha descrito previamente. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además otro agente tal como un agente que estabiliza el oligonucleótido como se ha descrito previamente.

La composición farmacéutica se puede formular para administración oral, nasal, ocular, parenteral (incluyendo intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, y subcutánea), rectal, vaginal o tópica (incluyendo bucal y sublingual).

30 En una realización preferida, la composición farmacéutica es para uso profiláctico local (por ejemplo, mucosa, piel) o uso sistémico. Por ejemplo, se puede usar una preparación para pulverización (es decir, aerosol) para fortalecer la capacidad antivírica de la mucosa nasal y pulmonar.

Los animales vertebrados incluyen, pero no se limitan a, peces, anfibios, aves y mamíferos.

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

35 Uso del oligonucleótido como un adyuvante

La presente invención proporciona el uso del oligonucleótido o precursor del mismo descritos en la invención o de un RNA bacteriano en combinación con al menos un antígeno para la preparación de una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria frente al menos un antígeno en un animal vertebrado, en particular, un mamífero.

40 El al menos un antígeno puede ser una proteína, un polipéptido, un péptido, un carbohidrato, un ácido nucleico, o una combinación de los mismos.

El al menos un antígeno es preferiblemente un antígeno asociado con una enfermedad/trastorno, frente al cual la generación de una respuesta inmunitaria es beneficiosa para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad/trastorno.

45 El oligonucleótido o precursor del mismo o el RNA bacteriano se pueden unir covalentemente o complejar no covalentemente con el al menos un antígeno. En una realización, el oligonucleótido se une covalentemente con el al menos un antígeno. En otra realización, tanto el oligonucleótido que es aniónico como el antígeno proteínico o peptídico que se vuelve aniónico por la extensión N-terminal o C-terminal de residuos de ácido glutámico se complejan con polímeros catiónicos. En aún otra realización, los fosfotioatos que se incorporan al oligonucleótido para aumentar la resistencia a la nucleasa se complejan con residuos de cisteína añadidos al N-terminal de la proteína o péptido antigénico. En una realización adicional, el al menos un antígeno puede ser codificado por un vector, en particular, un vector vírico, que comprende también el oligonucleótido. Todavía en una realización
50 adicional, el al menos un antígeno puede ser una parte de un virosoma que encapsula el oligonucleótido.

El oligonucleótido y el al menos un antígeno también pueden estar comprendidos en composiciones separadas que se administran simultáneamente.

- 5 En una realización, la vacuna comprende además un agente de administración como se ha descrito previamente. El oligonucleótido se puede administrar también por medios físicos como se ha descrito previamente. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además otro agente tal como un agente que estabiliza el oligonucleótido como se ha descrito previamente.

Los animales vertebrados incluyen, pero no se limitan a, peces, anfibios, aves y mamíferos.

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

- 10 Método para preparar un oligonucleótido capaz de inducir una respuesta antivírica y/o antibacteriana y/o antitumoral
- Se describe también un método para preparar un oligonucleótido capaz de inducir una respuesta antivírica y/o antibacteriana, que comprende las etapas de:

introducir en un oligonucleótido al menos un grupo 5' fosfato sin caperuza; y

- 15 introducir en el oligonucleótido una secuencia de nucleótido capaz de formar una estructura de cadena doble dentro de una célula.

- 20 El oligonucleótido puede ser de cadena sencilla, de cadena sencilla que comprende una secuencia capaz de formar una estructura de cadena doble, o de cadena doble. La estructura de cadena doble se puede formar dentro de una célula por el propio oligonucleótido bien intermolecularmente o intramolecularmente o bien entre un oligonucleótido de cadena sencilla y una molécula de RNA de la célula, tal como un mRNA o miRNA, que comprende una secuencia complementaria al oligonucleótido. El grado de complementariedad es preferiblemente al menos 50 %, 60 %, 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, aún más preferiblemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y lo más preferiblemente 100 %. El grado de complementariedad puede ser determinado por un experto utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como BLAST. En ciertas realizaciones, el número de pares de bases dentro de la estructura de cadena doble es de al menos 6, 7, 8, 9, preferiblemente al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, más preferiblemente al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, aún más preferiblemente al menos 22, 23, 24, 25. Los pares de bases incluyen tanto pares de bases de Waston-Crick como pares de bases de balanceo. Los pares de bases de Waston-Crick incluyen A-T, C-G, A-U; los pares de bases de balanceo incluyen G-U, I-U, I-A, I-C.

- 25 Se pueden incorporar una o más de las siguientes etapas en el método para preparar un oligonucleótido capaz de inducir una respuesta antivírica y/o antibacteriana para mejorar además más la actividad del oligonucleótido que induce la respuesta antivírica y/o antibacteriana:

preparar un oligonucleótido que tiene adenosina (A) en el extremo 5';

- 35 preparar un oligonucleótido que tiene una secuencia seleccionada de AAGU, AAAG, AUGG, AUUA, AACG, AUGA, AGUU, AUUG, AACA, AGAA, AGCA, AACU, AUCG, AGGA, AUCA, AUGC, AGUA, AAGC, AACG, AGGU, AAAC, AUGU, ACUG, ACGA, ACAG, AAGG, ACAU, ACGC, AAAU, ACGG, AUUC, AGUG, ACAA, AUCC, AGUC en el extremo 5'; y

incorporar inosina (I) al oligonucleótido.

En una realización preferida, la respuesta antivírica o la respuesta antibacteriana comprende la producción de IFN tipo I, en particular, la producción de IFN- α , la producción de IFN tipo II, la producción de IL-18, y/o la producción de IL-1 β .

- 40 Método para preparar un oligonucleótido libre de actividad inductora de la respuesta antivírica y de actividad inductora de la respuesta antibacteriana

Se describe también un método para preparar un oligonucleótido libre de cualquier actividad inductora de respuesta antivírica y actividad inductora de respuesta antibacteriana, que comprende una o más de las siguientes etapas:

eliminar todos los grupos 5' fosfato del oligonucleótido;

- 45 agregar caperuza a todos los 5' monofosfato, difosfato o trifosfato del oligonucleótido;

eliminar cualquier secuencia de nucleótido capaz de formar una estructura de cadena doble dentro de una célula a partir del oligonucleótido; y

incorporar al oligonucleótido, nucleótidos modificados tales como pseudouridina, 2-tiouridina, 2'-flúor-dNTPs - NTPs 2'-O-metilados, preferiblemente 2'-flúor-dCTP, 2'-flúor-dUTP, CTP 2'-O-metilado, UTP 2'-O-metilado.

La secuencia de nucleótidos capaz de formar la estructura de cadena doble dentro de una célula incluye a aquellos que permiten la formación de una estructura de cadena doble dentro del mismo oligonucleótido (es decir, intramolecular), entre dos de los mismos oligonucleótidos (es decir, intermolecular), o entre un oligonucleótido y un RNA (por ejemplo, mRNA, miRNA) en una célula diana.

- 5 En una realización preferida, la respuesta antivírica o la respuesta antibacteriana comprende la producción de IFN tipo I, en particular producción de IFN- α , la producción de IFN tipo II, producción de IL-18, y/o producción de IL-1 β .

La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Material y métodos

10 Ejemplos 1-10

Cultivo de células

Se prepararon PBMC humanas a partir de sangre entera donada por donantes jóvenes sanos mediante centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Biochrom, Berlin, Germany). Se aislaron las PDC mediante microesferas MACS utilizando el kit de aislamiento de células dendríticas con Ag de células dendríticas de la sangre (BDCA)-4 de Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Germany). En resumen, se marcaron las PDC con Ab anti-BDCA-4 acoplado a microperlas paramagnéticas coloidales y se pasaron por medio de una columna de separación magnética dos veces (columna LS, después, columna MS; Miltenyi Biotec). La pureza de las PDC aisladas (células de linaje negativo, MHC-II-positivo y CD123-positivo) estaba por encima de 95 %. Antes del aislamiento de los monocitos, se agotaron las PDC mediante MACS (columna LD; Miltenyi Biotec) y después se aislaron los monocitos usando el kit II de aislamiento de monocitos (Miltenyi Biotec). Se generaron células dendríticas convencionales derivadas de la médula ósea murina incubando las células de la médula ósea reunidas en presencia de GM-CSF murino (10 ng/ml; R & D Systems, Minneapolis, MN). Después de 7 días, estos cultivos contenían típicamente más de 90 % de cDC (CD11c+, CD11b+, B220-). La viabilidad estaba por encima de 95 %, como se determinó por exclusión con azul de tripano. Todas las células, excepto las PDC (2,5*10⁶ células/ml), se cultivaron a una densidad de 2*10⁶ células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Germany) complementado con 10 % (v/v) de FCS (Biochrom), L-glutamina 1,5 mM, 100 U/ml de penicilina, y 100 μ g/ml de estreptomycin (todos de Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Los cultivos de PDC se complementaron adicionalmente con 10 ng/ml de IL-3 (R & D Systems). Las células HEK 293 (riñón embrionario humano) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Biochrom) complementado con 10 % (v/v) de FCS (Biochrom), L-glutamina 1,5 mM, 100 U/ml de penicilina, y 100 μ g/ml de estreptomycin (todos de Sigma-Aldrich). Las células Vero (riñón de mono verde africano) y las células HEK 293T (riñón embrionario humano) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con antibióticos y 5 % o 10 % de suero de ternera fetal, respectivamente. Las células BSR se propagaron en medio mínimo esencial de Glasgow complementado con 10 % de suero de ternera recién nacida, caldo de fosfato, aminoácidos y antibióticos.

35 Ratones

Los ratones deficientes en TLR7, RIG-I y MDA5 han sido descritos previamente (Hemmi H *et al.* Nat. Immunol. 3:196, Feb, 2002; Kato H *et al.*, Immunity 23:19, Jul, 2005; Kato H *et al.* Nature 441 (7089):101-105, Apr 9, 2006). Se compraron ratones hembras C57BL/6 de tipo natural de Harlan-Winkelmann (Borchen, Germany). Los ratones tenían 6-12 semanas de edad al inicio de los experimentos. Los estudios en animales fueron aprobados por la agencia reguladora local (Regierung von Oberbayern, Munich, Germany).

40 ELISA

Se evaluó el IFN- α humano en los sobrenadantes de cultivo celular utilizando el conjunto del módulo de IFN- α (Bender MedSystems, Graz, Austria). El ELISA para IP-10 murino era de Biosource (Solingen, Germany), el ELISA para IFN- α murino era de PBL Biomedical Laboratories (Piscataway, USA). Todos los procedimientos de ELISA se realizaron, según las recomendaciones del fabricante. El IFN- α murino se midió según el siguiente protocolo: se utilizó suero monoclonal de rata anti-IFN- α de ratón (clon RMMA-1) como el Ab de captura, y suero policlonal de conejo anti IFN- α de ratón para la detección (ambos de PBL Biomedical Laboratories) junto con anti-IgG de conejo, en asno conjugada con HRP como el reactivo secundario (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Se utilizó rIFN-A de ratón (PBL Biomedical Laboratories) como el estándar (concentración de IFN- α en UI/ ml).

50 RNAs

Se compraron oligonucleótidos de RNA sintetizados químicamente de Eurogentec (Leiden, Belgium). Los RNA transcritos *in vitro* se sintetizaron utilizando el kit de construcción de siRNA Silencer (Ambion, Huntingdon, UK) o según el siguiente protocolo: Utilizando oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla con solapamiento parcial, se construyó un molde de DNA de cadena doble utilizando Exo Klenow (Fermentas). El transcrito de 2500 nucleótidos (Fig. 1) se generó utilizando el molde de control del Kit Opti mRNA (Curevac, Tubingen, Germany). Se construyeron

5 moldes de más de 40 pb por medio de PCR utilizando el pBluescript KS como un molde (para una lista detallada de todos los moldes de transcripción *in vitro* véase la tabla 1). Los moldes obtenidos contenían un promotor de consenso de la RNA polimerasa T7 seguido por la secuencia de interés a ser transcrita. Se incubaron 20 pmol del molde de DNA con 30 U de RNA polimerasa T7, 40 U de inhibidor de RNasa, 0,3 U de pirofosfatasa inorgánica de levadura en un tampón que contiene Tris-HCl 40 mM pH 8,0, DTT 10 mM, espermidina-HCl 2 mM (Sigma) y MgCl₂ 20 mM. El RNA con caperuza se transcribió utilizando el Kit Opti mRNA (Curevac). Para transcribir los RNA modificados en nucleósidos, se reemplazó la uridina-5'-trifosfato por pseudouridina-5'-trifosfato o por 2-tiouridina-5'-trifosfato (ambas de Trilink, San Diego, USA) durante la reacción de transcripción *in vitro*. Para la incorporación de UTP 2'-O-metilado (Trilink), se utilizó polimerasa T7 R&DNA™ (Eipcentre, Madison, USA). Esta polimerasa tiene mutaciones del sitio activo de una sola base que permiten la incorporación de los NTP con 2'-sustituyentes tales como 2'-O-metilo. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo durante la noche a 37 °C. El molde de DNA se sometió a digestión utilizando DNasa I (Fermentas) y, posteriormente, los RNA se purificaron utilizando el kit de aislamiento de RNA de alta pureza de Roche (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) con las siguientes modificaciones: El tampón de unión era tiocianato de guanidina 2,0 M en etanol al 70 % y el tampón de lavado fue sustituido por NaCl 100 mM, EDTA 4,5 mM, Tris HCl 10 mM en etanol al 70 %. Después de elución, el exceso de sales y los NTP se eliminaron haciendo pasar los RNA por medio de una columna Mini Quick Spin™ Oligo Column (Roche). El tamaño y la integridad del RNA se comprobó mediante electroforesis en gel.

Tabla 1

A: Oligonucleótidos de DNA para la generación de moldes de transcripción *in vitro*:

SEQ. ID. No.	Nombre	Secuencia	Cadena corresp.
84	AF6.5-35n	5'- CAGTAATACGACTCACTATTAGGGAAGCGGGCA-3'	1
82	GF6.5-35n	5'-CAGTAATACGACTCACTATAGGGGAAGCGGGCA-3'	1
101	RNA9.2s-0A	5'-TTGAAGGACAGGTTAAGCTAATAGTGAGTCG-3'	2
80	RNA9.2s-1G	5'-ATTGAAGGACAGGTTAAGCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
97	RNA9.2s-5A	5'-GGTAATTGAAGGACAGGTTAATAGTGAGTCG-3'	2
92	tri-09-mer	5'-GGGATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
96	tri-12-mer	5'-GGGTTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
90	tri-15-mer	5'-GGGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
93	tri-18-mer	5'-GGGCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'	3

20

91	tri-21-mer	5'-GGGACCCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
94	tri-24-mer	5'-GGGCTGACCCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
89	tri-27-mer	5'-GGGAAGCTGACCCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
73	tri-G-AC-U-Bio	5'-AAATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCCTGTCTC-3'	5
74	tri-GFPa	5'-AAGATGAACTTCAGGGTCAGCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
75	tri-GFPs	5'-AAGCTGACCCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
102	tri-Poly A	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTCTC-3'	5
95	tri-Poly C	5'-GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCCTGTCTC-3'	5
85	tri-Poly G	5'-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTGTCTC-3'	5
71	tri-Poly T	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCTGTCTC-3'	5
72	tri-singleG-24mer	5'-AAAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
78	tri-27+2s	5'-AAGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
76	tri-27+2a	5'-AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACTATAGTGAGTCGTA-3'	2
98	tri-27+0s	5'-GGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTAATAGTGAGTCG-3'	3
77	tri-27+0a	5'-AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCTATAGTGAGTCGTA-3'	3
202	RV leader RNA	5'-ACATTTTGGCTTTGCAATTGACAATGTCTGTTTTTCTTTGATCTGGTTGTTAAGCGTTATAGTGAGTCGATTACGCG-3'	4

Cadenas correspondientes:

SEQ. ID. No.	Nombre	Secuencia
100	1	5'-TGATCGGCTATGGCTGGCCGCATGCCCGCTTCC-3'
83	2	5'-CAGTAATACGACTCACTATA-3'
99	3	5'-TAATACGACTCACTATA-3'
203	4	5'-AATTCGCGTAATACGACTCACTATA-3'
-	5	Cebador promotor Ambion T7

5

B: Cebador de PCR para la generación de moldes de transcripción *in vitro* utilizando pBKS como el molde de PCR

Cebador directo:

SEQ. ID. No.	Nombre	Secuencia
204	pBKS T7 prom.	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCGA-3'

Cebador reverso:

SEQ. ID. No.	Nombre	Secuencia
81	pBKS 27-mer	5'-CACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTAT-3'
88	pBKS 57-mer	5'-CGGGGGATCCACTAGTTCT-3'
86	pBKS 105-mer	5'-CCTCGAGGTCGACGGTATC-3'
87	pBKS 204-mer	5'-CGGATAACAATTTACACAGGA-3'
79	pBKS 302-mer	5'-AGTGAGCGCAACGCAATTA-3'

Extractos celulares

- 5 Se prepararon lisados celulares según Meister *et al.* (G. Meister *et al.*, Mol Cell 15, 185 (Jul 23, 2004)) con modificaciones menores. Se transfectaron células HEK 293 utilizando polietilenimina de alto peso molecular (25 kDa) (PEI; Sigma, 40.872-7). A una confluencia del 80-90 %, se transfectaron las células con una relación PEI:DNA de 1,5:1. 24-36 horas después de la transfección se recogieron las células y el sedimento celular se resuspendió en cinco volúmenes de sedimento de KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, ditiotritol 0,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,9), PMSF 0,5 mM y se incubó durante diez minutos en hielo. Posteriormente se lavaron las células y el sedimento celular se resuspendió en dos volúmenes de sedimento del tampón descrito anteriormente y se homogeneizó por trituración. Los núcleos de las células se retiraron del lisado de células por centrifugación a 2000 g durante diez minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos de microcentrífuga y se aclaró adicionalmente por centrifugación a 2000 g durante diez minutos y centrifugación adicional durante 30 minutos a 20.000 g para obtener el extracto citoplasmático. La concentración de KCl del extracto se elevó posteriormente a 100 mM por adición de KCl 2 M y se añadió glicerol hasta un porcentaje del 10 %. Para la purificación de los complejos de RIG-IC marcados con FLAG, se incubaron los extractos citoplásmicos en perlas de agarosa FLAG M2 (Sigma). Las perlas de agarosa FLAG M2 se lavaron una vez con glicina 0,1 M (pH 3,5) y se equilibraron por lavado con Tris-HCl 1 M (pH 8,0). Después se resuspendieron las perlas en tampón C (KCl 0,1 M, MgCl₂ 5 mM, 10 % de glicerol, 10 % de Tween 20, β-mercaptoetanol 10 mM, PMSF 0,2 mM, y Tris-HCl 20 mM [pH 8,0]) y se incubaron con extractos citoplásmáticos durante cuatro horas a 4 °C con rotación. Se recogieron las perlas y se lavaron dos veces en tampón de lavado (NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 50 mM [pH 7,5]) complementado con 0,1 % de NP40. Se eluyeron entonces los complejos unidos por afinidad agitando las perlas en 3x péptido FLAG a 0,2 µg/ml (Sigma) en tampón de lavado durante dos horas a 10 °C y después de la centrifugación se recogió el eluato.

25 Estudios de unión a ligando

- El lisado de células enteras o 25 µl de eluato de RIG-IC se incubó con 0,375 µg de RNA biotinilado en presencia de 40 U de inhibidor RNasa (Fermentas), PMSF 0,5 mM en un volumen final de 100 µl en tampón de lavado durante dos horas a 4 °C con rotación. Se añadieron al lisado 50 µl de perlas recubiertas con estreptavidina (Pierce, Rockford, USA; 20347) durante otra hora a temperatura ambiente con rotación. Se lavaron entonces las perlas cuatro veces con tampón de lavado complementado con 0,1 % de NP40. Se lisaron el sobrenadante y las perlas en tampón de Laemli para su posterior análisis de inmunotransferencia.

Transferencia Western

- Para la transferencia Western, se separaron muestras mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham-Biosciences, UK) mediante electrotransferencia semi-seca. Como anticuerpo primario, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Flag (Sigma). Como anticuerpo secundario, se utilizó anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Amersham-Biosciences). Los anticuerpos unidos se visualizaron por el sistema de quimioluminiscencia potenciada (ECL) según el protocolo del fabricante (Amersham-Biosciences).

Ensayos de reportero

- 12-16 horas antes de la transfección, se sembraron células HEK 293 en placas de 48 pocillos. A una confluencia del 80 %, se transfectaron las células HEK 293 utilizando PEI con 300 ng de un plásmido reportero (pIFNβ-luc), 500 ng de un plásmido de normalización (que expresa la β-galactosidasa del virus del sarcoma de Rous) y los plásmidos de expresión indicados dando un total de 1,5 µg de DNA/pocillo. 24 horas después de la transfección se aspiró el medio de cultivo y se lavaron las células una vez en 0,5 ml de PBS que contenía EDTA 10 mM. Después se lisaron las células en 50 µl de tampón de lisis de luciferasa (10 % de glicerol, 1 % de Triton-X, EDTA 2 mM, TrisHCl 25 mM [pH 7,8], DTT 2 mM). Se mezclaron 20 µl de cada muestra con 20 µl de reactivo de detección de luciferasa (Promega) y

se analizaron para la actividad de luciferasa con un luminómetro de microplacas (LUMIstar, BMGLabtechnologies). Para medir la actividad de beta-galactosidasa, se incubaron 10 µl de lisado con 100 µl de solución 1 (1 % de Galacton-Plus [TROPIX], 0,1 % de MgCl₂ 0,1 M, 20 % de fosfato 0,5 M [pH 8], 78,9 % de H₂O) durante 20 minutos y después se añadieron 50 µl de solución 2 (20 % de NaOH 1 M, 10 % de Emerald [TROPIX], 70 % de H₂O). Los valores de actividad de luciferasa se normalizaron frente a la actividad beta-galactosidasa del mismo extracto. Los ensayos de reportero para los experimentos que implican una infección vírica (figura 5) se realizaron de la siguiente manera: 12 a 18 horas antes de la transfección, se sembraron células HEK 293T o Vero en placas de 24 pocillos. A una confluencia del 80 %, se transfectaron las células utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) con 400 ng de un plásmido reportero que codifica la luciferasa de renilla (p125-Luc) y 2 ng de un plásmido que codifica la luciferasa de renilla controlada por CMV (PRL-CMV, Promega) para la normalización junto con 400 ng de vector vacío de plásmidos que expresan RIG cuando esté indicado. 6 horas después de la transfección de DNA, las células se infectaron o se transfectaron con las cantidades indicadas de RNA usando PEI. 48 horas después de la transfección de DNA se prepararon los extractos celulares y se ensayaron en el sistema reportero de luciferasa dual (Promega). La actividad de luciferasa se midió en un luminómetro (Berthold) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

15 Plásmidos

El pIFN-beta-Luc fue proporcionado amablemente por T. Maniatis. RIG-I CARD2 fue proporcionado amablemente por S. Rothenfusser. Los p125-Luc, RIG-I completo, RIG-IC, RIG-I K270A y el vector de control vacío fueron proporcionados amablemente por T. Fujita (M. Yoneyama *et al.*, Nat Immunol 5, 730 (Jul, 2004)). La RIG-I ΔHelicasa_C (AS 655-734) fue construida a partir de RIG-I completo por medio de un bucle por la PCR usando el siguiente par de cebadores de PCR: 5'-ACTGAGTTTAGGATTTCTTCAATCC-3', 5'-GGTAGCAAGTGCTTCCTTCTGA-3'. El pSC6-T7-NEO fue proporcionado amablemente por M. Billeter F. (Radecke *et al.*, Embo J 14, 5773 (Dec 1, 1995)). El D812N T7 fue construido a partir de pSC6-T7-NEO por medio de mutagénesis dirigida al sitio utilizando el siguiente par de cebadores de PCR: 5'-GCACTGATTACGCCTCCTTCGGTACC-3', 5'-GGTACCGAAGGAGCGTGAATCAGTGC-3'. Las RIG-I ΔHelicasa_C y RNA T7 D812N se confirmaron por secuenciación.

Stocks de virus

Se utilizó RV SAD L16 recombinante (Schnell MJ *et al.*, 1994, EMBO J. 13 (18): 4195-4203) como RV natural. La clonación de cDNA, recuperación de virus SAD ΔPLP recombinante, que codifica P desde la posición del gen más promotora/distal, y la propagación del virus, han sido descritas previamente (K. Brzozka, *et al.*, Journal of Virology 79, 7673 (Jun, 2005)).

Para el aislamiento del RNA total a partir de células no infectadas o de células infectadas con RV a una MOI de 1 durante 2 días, se utilizó el minikit RNeasy (QIAGEN, Hilden, Germany) según las instrucciones del fabricante. Para el aislamiento de partículas RNA de RV, se sedimentaron los viriones a partir de sobrenadantes libres de células por ultracentrifugación en SW32Ti durante 2 horas a 4 °C y 27.000 rpm. Se aisló el RNA de los sedimentos con el minikit RNeasy.

Ejemplos 11-16

Medios y reactivos

Se utilizó RPMI 1640 (Biochrom) complementado con 10 % (v/v) de FCS inactivado por calor (Invitrogen Life Technologies), L-glutamina 3 mM, HEPES 0,01 M, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina (todos de Sigma-Aldrich) y medio de Eagle modificado de Dulbecco (PAN, Aidenbach, Germany) complementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), L-glutamina 3 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina. Los CpG-ODN (Coley Pharmaceutical Group) muestran letras minúsculas, en el enlace de fosforotioato (PT) y letras mayúsculas, en el enlace de fosfodiéster (PD) en 3' de la base; CpG-A-ODN 2216 (5'-ggGGGACGATCGTCgggggG-3'), CpG-B ODN 1826 (5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3'). El ácido poliinosínico:policitidílico (poli(I:C)) se adquirió de Sigma-Aldrich. Para el agotamiento de las células NK y las células T CD8, se utilizaron el mAb TMβ1 específico de la cadena β del receptor IL-2 y el mAb RmCD8-2 como se ha descrito (donado amablemente por Ralph Mocikat, GSF-Institut für Molekulare Immunologie, Munich, Germany). El IFNβ murino recombinante se compró en Europa Bioproducts LTD. El jetPEI™ *in vivo* (# 201-50) se compró en Biomol GmbH (Hamburgo, Germany).

RNAs

Se compraron oligonucleótidos de RNA sintetizados químicamente de Eurogentec (Leiden, Belgium) o de MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany) (para una lista detallada de todos los oligonucleótidos de RNA sintetizados químicamente véase la Tabla 3). Los RNA transcritos *in vitro* se sintetizaron según las instrucciones del fabricante utilizando el kit de transcripción megashort script (Ambion, Huntingdon, UK) (para una lista detallada de todos los moldes de transcripción *in vitro* véase la Tabla 4). Los moldes obtenidos contenían un promotor de consenso de la RNA polimerasa T7 seguido por la secuencia de interés a ser transcrita. Para la generación de RNA de cadena doble transcrito *in vitro*, se transcribieron los moldes de DNA de las cadenas sentido y antisentido durante 6 horas en reacciones separadas. Se añadió una G extra tanto a las cadenas sentido como a las antisentido con el fin de transcribir con la RNA polimerasa T7. Las reacciones se mezclaron a continuación y la reacción combinada se

incubó durante la noche a 37 °C. El molde de DNA se sometió a digestión utilizando DNAsa-I (Ambion) y, posteriormente, se purificaron los RNA utilizando extracción con fenol:cloroformo y precipitación con alcohol. Después de la elución, se eliminaron las sales y los NTP en exceso haciendo pasar los RNA por medio de una columna Mini Quick Spin™ Oligo Column (Roche). La integridad de los RNA se comprobó mediante electroforesis en gel.

Células

Los cultivos mixtos inducidos por el ligando Flt3 (Flt3-L) de células dendríticas murinas mieloides y plasmacitoides se cultivaron como se ha descrito (3). Las DC plasmacitoides procedentes de los cultivos de médula ósea inducidos por ligando FLT-3 se clasificaron con microperlas B220 (Miltenyi Biotec). Se generaron células dendríticas convencionales (cDCs) mediante la incubación de células de médula ósea agrupadas en la presencia de GM-CSF murino (10 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN). Después de 7 días, estos cultivos contenían típicamente más de 80 % de cDC (CD11c+, CD11b+, B220-). Para algunos experimentos, se aislaron células B de los bazos de ratones naturales por MACS utilizando el kit de aislamiento de células B de ratón y microperlas CD19 (Miltenyi Biotec). Se clasificaron las células NK sin tocar y las células T CD 8 de los bazos utilizando el kit de aislamiento de células NK y de aislamiento de células T CD8 (Miltenyi Biotec). La viabilidad de todas las células era superior al 95 %, como se determinó por la exclusión con azul de tripano y la pureza era > 90 % según el análisis por FACS. Se cultivaron células primarias murinas en RPMI (PAN, Aidenbach, Germany) complementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), L-glutamina 4 mM y mercaptoetanol 10⁻⁵ M. Las células B16 murinas (H-2b) fueron donadas amablemente por Thomas Tüting y se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (PAN, Aidenbach, Germany) complementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

Cultivo de células

Todas las células se cultivaron a una densidad de 2 × 10⁶ células/ml y se sembraron en placas de 24 pocillos de fondo plano, respectivamente. Si no se indica otra cosa, las células se incubaron durante 24 horas con 3 µg/ml de CpG-B-DN 1826 y/o de CpG-ODN 2216, R848 1 µM. Los RNA se transfectaron con lipofectamina 2000 según el protocolo del fabricante (Invitrogen). Si no se indica otra cosa, se transfectaron 200 ng de ácido nucleico con 0,5 µl de lipofectamina. Después de 24 h se recogieron los sobrenadantes para análisis de la secreción de citocinas por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y se recogieron las células para análisis por citometría de flujo.

Medida de citocinas

Se determinaron por ELISA las concentraciones de IFN-γ y IL-12p40 murinos en los sobrenadantes de cultivo y en los sueros, según las instrucciones del fabricante (BD PharMingen, San Diego, CA). Se analizó el IFN-α murino usando el kit de ELISA para IFN-α de ratón (PBL Biomedical Laboratories, PBL#42100-2, New Brunswick, NJ). Para algunos experimentos, se midió el IFN-α murino según el siguiente protocolo: se utilizó suero monoclonal de rata anti-IFN-α de ratón (clon RMMA-1) como el Ab de captura, y suero policlonal de conejo anti-IFN-α de ratón para la detección (ambos de PBL Biomedical Laboratories) junto con anti-IgG de conejo en asno conjugada con HRP como el reactivo secundario (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Se utilizó IFN-α recombinante de ratón (PBL Biomedical Laboratories) como el estándar (concentración de IFN-α en UI/ml).

Ensayo de transfección y reportero

Para monitorizar la activación transitoria de IFN-β por siRNA 5' trifosfato se sembraron células B16 murinas en placas de 24 pocillos. A una confluencia del 70 %, se transfectaron las células B16 utilizando PEI con 200 ng de un plásmido reportero (pIFNβ-luc DAM/DCM), 200 ng de un plásmido de normalización (que expresa Renilla-Luc) y los plásmidos de expresión indicados dando un total de 1,5 µg de DNA/pocillo. Se transfectaron las células B16 utilizando polietilenimina de alto peso molecular (25 kDa) (PEI; Sigma, 40.872-7) con una relación PEI:DNA de 1,5:1. En algunos experimentos se utilizó lipofectamina 2000 (Invitrogen) para la cotransfección de los siRNA sintéticos con los plásmidos de expresión indicados según el protocolo del fabricante. 16 horas después de la transfección se aspiró el medio de cultivo, se lavaron las células una vez en 0,5 ml de PBS y después se estimularon con diferentes ligandos durante los períodos de tiempo indicados. Se recogió el sobrenadante y se lavaron las células de nuevo en 0,5 ml de PBS que contiene EDTA 10 mM. Después se lisaron las células en 100 µl de tampón de lisis Promega (Promega, # 1531). Se mezclaron 20 µl de cada muestra con 20 µl de reactivo de detección de luciferasa (Luciferase Assay Kit, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Germany) y se analizaron para la actividad de luciferasa con un luminómetro de microplacas (LUMIstar, BMGLabtechnologies). Para medir la actividad de luciferasa de renilla, se incubaron 20 µl de lisado con 20 µl de sustrato de renilla (Coelenterazina (Promega, # 2001). Los valores de actividad de luciferasa se normalizaron frente a la actividad de renilla, del mismo extracto.

Plásmidos

Los plásmidos reporteros IFN-β-Luc, PPME-myc NS3-4A (NS3-4A) naturales, PPME-myc MutNS3-4A (NS3-4A*; que contiene una mutación inactivante de Serin 139 a Ala) fueron amablemente proporcionados por T. Maniatis and J. Chen. Los RIG-I completo, RIG-IC, RIG-I K270A y el vector de control vacío fueron amablemente proporcionados

por T. Fujita (Yoneyama M *et al.*, (2004) Nat Immunol 5 (7): 730-737). El vector de eficiencia de la transfección renilla-luciferasa (phRLTK) se adquirió de Promega.

Transferencia Western

5 Para la transferencia Western, se separaron muestras por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham-Biosciences, UK) mediante electrotransferencia semi-seca. Como anticuerpo primario, se utilizaron anticuerpo policlonal anti-RIG-I de rata (donado amablemente por el Dr. Kremer) anticuerpo policlonal anti-Bcl-2 de conejo (Santa Cruz, sc-7382) y anticuerpo anti-caspasa-1 de conejo (Santa Cruz, sc-7148). Como anticuerpo secundario, se utilizaron anticuerpo anti-ratón o anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (Amersham-Biosciences). Los anticuerpos unidos se visualizaron por el sistema de quimioluminiscencia potenciada (ECL) según el protocolo del fabricante (Amersham- Biosciences).

Citometría de flujo

15 En los puntos de tiempo indicados, se realizó la tinción de antígeno de superficie como se ha descrito previamente. Los anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia (mAbs) frente a B220, CD11c, NK1.1, CD4, CD8, CD69, CD86 y los anticuerpos de control de isotipo apropiado, se compraron de BD Pharmingen (Heidelberg, Germany). Los datos de citometría de flujo se adquirieron sobre un Becton Dickinson FACSCalibur equipado con 2 láseres (excitación a longitud de onda de 488 nm y 635 nm). Se analizaron los datos utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Para determinar la expresión de Bcl-2 de las células de melanoma B16 en pulmones metastásicos se prepararon suspensiones de células individuales procedentes de metástasis de pulmón de ratones deficientes en IFNAR. Se fijaron y permeabilizaron las células utilizando PFA (paraformaldehído) al 2 % y saponina y se incubaron con un Ab TRP-1 de conejo específico no conjugado (donado amablemente por Thomas Tüting) durante 20 min en hielo. Después, se lavaron las células y se incubaron con Ab de cabra anti-conejo con FITC (Santa Cruz; sc-2012) durante 20 min. De nuevo se lavaron las células y se añadió a las células Bcl-2-Ab conjugado con PE (Santa Cruz, sc-7382-PE). Después de 20 min de incubación, se analizaron las células por citometría de flujo.

25 Cuantificación de las células apoptóticas y muertas

Las células adherentes y sobrenadantes se analizaron por tinción con anexina-V marcada con FITC (Roche) y yoduro de propidio (BD Biosciences). La tinción con anexina-V se realizó según las instrucciones del fabricante. El yoduro de propidio se añadió hasta una concentración final de 0,5 mg/ml y las células se analizaron por citometría de flujo y el software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

30 Microscopia confocal

35 Se inyectaron ratones C57BL/6 por vía intravenosa con RNA marcado con FITC (100 µg) complejo con jetPEI (Biomol). Después de 6 h se sacrificaron los ratones y se analizaron los órganos deseados para la absorción de los complejos de RNA. En resumen, se transfirieron secciones de los pulmones metastásicos o de los pulmones no enfermos a portaobjetos de microscopio y se fijaron en acetona durante 10 min. Se realizó una contratinción nuclear utilizando TOPRO-3 (Molecular Probes). Las etapas de lavado se realizaron en solución salina tamponada con Tris y las células se montaron en medio de montaje Vectarshield (Vector Laboratories). Se analizaron entonces las células utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Germany) equipado con láseres de argón de 488 nm y de helio-neón de 633 nm.

Ratones

40 Se establecieron ratones deficientes en RIG-I, MDA-5, TLR7 como se ha descrito (Kato *et al.*, (2006) Nature 441:101; Akira S *et al.*, (2004) C R Biol. 327(6):581-9). Los ratones deficientes en IFNAR fueron donados amablemente por Ulrich Kalinke. Los ratones C57BL/6 hembras se compraron a Harlan-Winkelmann (Borchen, Germany). Los ratones tenían 6-12 semanas de edad al comienzo de los experimentos. Los estudios en animales fueron aprobados por la agencia reguladora local (Regierung von Oberbayem, Munich, Germany).

45 Estudios en ratones

50 Para los estudios *in vivo*, se inyectaron ratones C57BL/6 con 200 µl que contenían ácidos nucleicos con complejación previa con jetPEI según el protocolo del fabricante. En resumen, se mezclaron 10 µl de jetPEI *in vivo* con 50 µg de ácidos nucleicos en una relación N:P de 10/1 en solución de glucosa al 5 % y se incubaron durante 15 min. Posteriormente, se inyectaron los complejos en la vena retro-orbital. Se recogió el suero después de 6 h a menos que se indique otra cosa. Se obtuvo la sangre entera por cortes en la cola a los puntos de tiempo indicados. Se preparó el suero a partir de la sangre entera por coagulación durante 30 min a 37 °C y posterior centrifugación y se almacenó a -20 °C. Los niveles de citocinas fueron determinados por ELISA.

Injerto de melanoma B16 en los pulmones y reducción de las células T CD8 y de las células NK *in vivo*

Para la inducción de metástasis de pulmón se inyectaron 4×10^5 células de melanoma B16 en la vena caudal de los ratones indicados. Los días 3, 6 y 9 se inyectaron los ratones con 200 μ l que contenían ácidos nucleicos (50 μ g cada uno) con complejación previa con jetPEI como se ha descrito. Posteriormente, se inyectaron los complejos en la vena retro-orbital. 14 días después del enfrentamiento se contó el número de metástasis de melanoma macroscópicamente visibles en la superficie de los pulmones con la ayuda de un microscopio de disección o, en el caso de carga masiva de tumor, se determinó el peso del pulmón. La reducción de las células NK y células T CD8 se realizó como se ha descrito {Adam, 2005 # 49; Mocikat, 2003 # 50}. En resumen, se administró mAb TM β 1 intraperitonealmente 4 días (1 mg) antes y 2 días (0,2 mg) y 14 días (0,1 mg) después del enfrentamiento tumoral. Para neutralizar las células T CD8, se inyectó el mAb RmCD8-2 por vía intraperitoneal uno (0,5 mg) y cuatro días (0,1 mg) antes y 4 (0,1 mg) y 14 días (0,1 mg) después de la inoculación del tumor. Los experimentos se realizaron en grupos de cuatro a cinco ratones y se repitieron dos a cuatro veces.

Análisis histopatológicos

Se obtuvieron muestras de pulmones cuando se sacrificaron los ratones. Las muestras de tejido se fijaron en etanol absoluto y se embebieron en parafina. Se detectó la apoptosis por el método de marcado final de corte de dUTP mediado por transferasa (TUNEL) según las instrucciones del fabricante (Boehringer Roche, Mannheim, Germany). Brevemente, se incubaron secciones desparafinadas y rehidratadas durante 1 h a 37 °C con mezcla de las colas que contenía 1x de tampón de cola, CoCl_2 1 mM, 1 μ l de 10x mezcla de marcaje de DNA DIG y 200 unidades de transferasa terminal (agua bidestilada añadida hasta un volumen total de 50 μ l). Después del lavado en solución salina tamponada con tris, se incubaron las secciones durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (diluido 1: 250 en suero de ternera fetal al 10 %). La reacción se visualizó con nitro azul de tetrazolio/fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo.

Ejemplo 1. El RNA transcrito *in vitro* estimula la producción de IFN- α en los monocitos primarios humanos.

La producción de IFN- α en el sistema inmunitario humano se cree que está limitada en gran medida a las PDC. La producción de IFN- α en los monocitos primarios humanos no se ha publicado hasta ahora. Como se ha demostrado en estudios anteriores (V. Hornung *et al.*, J Immunol 168, 4531 (May 1, 2002); I. B. Bekeredjian-Ding *et al.*, J Immunol 174, 4043 (Apr 1, 2005)), los monocitos expresan TLR2, TLR4, TLR6 y TLR8 pero no TLR3, TLR7 o TLR9, y producen IL-6 en respuesta a los ligandos de TLR2/6, TLR4 y TLR8 pero no a los ligandos de TLR3, TLR7 o TLR9 (I. B. Bekeredjian-Ding *et al.*, J Immunol 174, 4043 (Apr 1, 2005)). Los monocitos no produjeron IFN- α después de estimulación con todos los ligandos de TLR ensayados incluyendo CpG-A ODN 2216 (A. Krug *et al.*, Eur J Immunol 31, 2154 (Jul, 2001)) y R848, de los cuales ambos inducen el IFN- α en las PDC (Fig. 1 y datos no presentados). Se mantiene la hipótesis de que los patrones de motivos o secuencias de RNA pueden existir en las moléculas de RNA largas que inducen el IFN- α en los monocitos.

La transcripción *in vitro* se utilizó para generar moléculas largas de RNA de cadena sencilla ya que la síntesis química es impracticable para generar RNA de cadena sencilla con más de 100 nucleótidos. Los transcritos de RNA se transfectaron a los monocitos y a las PDC y la producción de IFN- α se evaluó por ELISA.

Los presentes inventores encontraron que una molécula larga de RNA de 2500 nucleótidos, pero no el ligando de TLR9 CpG-A ODN 2216 ni el ligando de TLR7/8 R848, estimularon una fuerte respuesta de IFN- α en los monocitos humanos primarios (Fig. 1A).

Los moldes que se utilizaron para generar el conjunto de moléculas de RNA de cadena sencilla de diferentes longitudes (27-302 nucleótidos) eran idénticos en el extremo 5', mientras que el extremo 3' fue acortado gradualmente. Como consecuencia, este conjunto de moléculas de RNA de cadena sencilla era idéntico en la secuencia del extremo 5'. La inducción de IFN- α en los monocitos se observó también cuando se utilizaron moléculas de RNA transcrito *in vitro* de diferente longitud (de 27 nucleótidos a 302 nucleótidos) (Figura 1B).

A continuación, se ensayó si la longitud de la secuencia en 3' tenía un impacto sobre la actividad de inducción de IFN- α del RNA 5' fosfato. Los oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato que varían de 27 a 9 nucleótidos fueron generados por el acortamiento gradual (en etapas de tres nucleótidos) de un oligonucleótido de 27-meros desde el extremo 3'. Mientras que los oligonucleótidos de RNA de 27, 24 y 21 nucleótidos de longitud eran potentes inductores de IFN- α en los monocitos, se observó una fuerte caída de la actividad para las secuencias más cortas (Fig. 1C). Esto sugiere que el RNA transcrito *in vitro* tenía que tener una longitud mínima de 21 bases para inducir el IFN- α en los monocitos.

Puesto que los resultados presentados en la Fig. 1B se pueden interpretar que sugieren que la secuencia en 3' puede influir en la actividad de inducción de IFN- α del RNA 5' trifosfato, se generaron oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato de 31-meros (es decir, 31 nucleótidos de largo) en los que la secuencia en 3' (21 nucleótidos) era un homopolímero poli G (tri-poli G), un poli A (tri-poli A), un poli C (tri-poli C) o un poli U (tri-poli U). Los diez bases en el extremo 5' eran idénticas para estos oligonucleótidos. Los cuatro oligonucleótidos de RNA resultaron ser igualmente potentes en términos de inducción del IFN- α en los monocitos (Fig. 1D).

Estos resultados indicaron que se requiere una longitud mínima para que el RNA 5' trifosfato sea reconocido. Aunque estos resultados sugieren que la secuencia 3' de oligonucleótidos de RNA transcrito *in vitro* no tenía ningún

fuerte impacto sobre la actividad de inducción de IFN- α , los datos con moléculas de RNA más grandes (Fig. 1B) indicaron una posible influencia de la formación de la estructura secundaria.

Por otra parte, estos resultados indicaron que una característica molecular compartida por todas las moléculas de RNA transcrito *in vitro* en lugar de un motivo de secuencia específica es responsable de la inducción de IFN- α en los monocitos.

Ejemplo 2. El resto 5' trifosfato del RNA transcrito *in vitro* es necesario para la inducción de IFN- α en los monocitos primarios humanos.

En general, para la transcripción de RNA *in vitro*, se utiliza el bacteriófago de la RNA polimerasa T7 dependiente de DNA. A diferencia del RNA sintético o del mRNA eucariota, el RNA generado por la RNA polimerasa T7 contiene un grupo trifosfato sin caperuza en el extremo 5' de la molécula de RNA. Para estudiar la contribución del 5' trifosfato independiente de la secuencia, se comparó la inducción de IFN- α por una versión sintética y por una versión transcrita *in vitro* de un oligonucleótido 9.2s de ssRNA inmunoestimulante (isRNA9.2s, 19 nucleótidos). El isRNA9.2s había sido identificado como un potente estímulo para la producción de IFN- α en PDC en estudios anteriores (V. Hornung *et al.*, Nat Med 11, 263 (Mar, 2005)).

Solamente la versión de isRNA9.2s transcrito *in vitro* pero no de isRNA9.2s sintético, indujo fuertemente la producción de IFN- α en los monocitos (Fig. 2A panel superior). Esta diferencia en la actividad de inducción de IFN- α no era debida a diferente eficacia de la transfección (Fig. 7). En contraste con los monocitos, las PDC produjeron IFN- α en respuesta tanto a los isRNA9.2s transcritos *in vitro* como a los sintéticos (Fig. 2A panel inferior).

A continuación, se utilizó la transcripción *in vitro* para generar un oligonucleótido de RNA de cadena doble con un colgante de un nucleótido en la posición 5'. Los dos oligonucleótidos de cadena sencilla (tri-GFPs, tri-GFPa) y el oligonucleótido de cadena doble (tri-GFPds) indujeron niveles comparables de IFN- α en los monocitos (Fig. 2B). La escisión del colgante de 5' (incluyendo el 5' trifosfato) del dsRNA (tri-GFPds) por la RNAsa T1, una endorribonucleasa que degrada específicamente el RNA de cadena sencilla en los residuos G, abolió completamente la actividad de inducción de IFN- α (Fig. 2B). Por otra parte, cuando se utilizó fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) para desfosforilar el extremo 5' de los oligonucleótidos de RNA de cadena sencilla transcritos *in vitro*, se observó una abolición completa de la respuesta de IFN- α en los monocitos (Figura 2C). En contraste, las PDC, que se sabe que detectan los oligonucleótidos de RNA de cadena sencilla por medio de TLR7, no mostraron ninguna disminución en la producción de IFN- α cuando se desfosforilaron los oligonucleótidos (Figura 2C).

A diferencia del oligonucleótido con una guanosina-5'-trifosfato, el RNA transcrito *in vitro* generado para contener una guanosina-5'-difosfato, una guanosina-5'-monofosfato o una guanosina-5'-hidroxilo no indujo el IFN- α en los monocitos (Fig. 8).

En conjunto, estos datos indicaron que el 5' trifosfato es responsable de la actividad de inducción de IFN- α del RNA transcrito *in vitro* en los monocitos, y que un 5' trifosfato confiere actividad inductora de IFN- α tanto al RNA de cadena sencilla como al RNA de cadena doble.

Ejemplo 3. La agregación de caperuza de 7-metil-guanosina y las modificaciones de bases específicas de las eucariotas suprimen la inducción de IFN- α por el RNA 5' trifosfato.

En las células eucariotas, la 7' metil-guanosina se une al 5' trifosfato de un transcrito de mRNA naciente por un proceso denominado agregación de caperuza. La agregación de caperuza mejora la estabilidad del RNA eucariota frente a las nucleasas y aumenta la unión de las proteínas ribosómicas al mRNA.

Se examinó la influencia de la agregación de caperuza sobre la actividad de inducción de IFN- α del RNA 5' trifosfato. El RNA con caperuza puede ser generado por medio de la transcripción *in vitro* mediante la inclusión de un análogo sintético de caperuza, N-7 metil GpppG, en la reacción de transcripción *in vitro*. Puesto que tanto N-7 metil GpppG como GTP (típicamente en una mezcla 4:1 de N-7 metil GpppG:GTP) necesitan estar presentes durante la transcripción *in vitro* y ambos son incorporados por la RNA polimerasa T7, aproximadamente el 80 % de todos los transcritos tienen caperuza después de la transcripción *in vitro*. Se encontró que el RNA de diferentes longitudes, transcrito en la presencia del análogo de caperuza sintético, que contenía aproximadamente 20 % de RNA sin caperuza y 80 % de RNA con caperuza, era mucho menos activo en la inducción de la producción de IFN- α en los monocitos en comparación con el RNA transcrito *in vitro* que no tiene caperuza (100 % sin caperuza) (Fig. 3A).

Además de la agregación de caperuza en 5', el RNA eucariota sufre otras varias etapas de maduración postranscripcional que incluyen la modificación de diversos nucleósidos del transcrito de RNA y la metilación de la cadena principal de ribosa en la posición 2'-hidroxilo. A este respecto, se ha demostrado previamente que la incorporación de modificaciones de nucleósidos que son abundantes en los RNA eucariotas maduros, pero no en los RNA procariotas o víricos puede llevar a la supresión completa de una respuesta inflamatoria desencadenada por RNA mediada por el sistema de TLR (K. Kariko, *et al.*, Immunity 23, 165 (Aug, 2005)). Para comprobar si este fenómeno es cierto también para la respuesta de IFN- α desencadenada por RNA 5' trifosfato, se generaron

oligonucleótidos de RNA por medio de la transcripción *in vitro* con varios NTP sustituidos con los respectivos NTP modificados con nucleósidos o con ribosa.

Se observó una disminución significativa en la producción de IFN- α cuando la pseudouridina (Ψ) o la 2-tiouridina (s2U) sustituyeron a la uridina (U) (Fig. 3B). Se obtuvieron resultados análogos cuando se incorporó UTP 2'-O-metilado a los oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato en lugar de UTP (Fig. 3C). De acuerdo con estos resultados, la transfección de RNA procariota que carece de caperuza en 5' y tiene pocas modificaciones en los nucleósidos respectivos y en la ribosa dio como resultado una fuerte respuesta de IFN- α en los monocitos, mientras que el RNA eucariota estaba completamente inactivo en términos de inducción de IFN- α (Fig. 9).

El lipopolisacárido (LPS) solo o en combinación con RNA sintético no contribuyó a la producción de IFN- α en los monocitos (Fig. 9).

Características estructurales como la presencia de un colgante de dos nucleótidos en 3' en un dúplex de RNA 5' trifosfato, cuando tiene lugar en los productos de escisión natural de la endonucleasa Dicer, no interfieren con la actividad inmunoestimulante de los oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato (Fig. 10).

En conjunto, estos resultados indicaron que las modificaciones postranscripcionales encontradas comúnmente en especies de RNA eucariotas maduros suprimen la actividad inmunoestimulante de los oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato, proporcionando de esta manera estructuras moleculares que se pueden emplear para la distinción del RNA propio y del no propio.

Ejemplo 4. La inducción de IFN- α por oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato es independiente de la maduración endosómica.

Entre la familia de los TLR, se sabe que los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 detectan ácidos nucleicos. Una serie de estudios sugieren que el RNA de cadena sencilla se reconoce por medio de TLR7 y TLR8, localizados ambos en la membrana endosómica. Similar a CpG-DNA, el reconocimiento de RNA de cadena sencilla por TLR7/8 puede ser bloqueado por la cloroquina, que inhibe la maduración endosómica. Los presentes inventores encontraron que en las PBMC, concentraciones crecientes de cloroquina inhibieron la inducción de IFN- α por CpG-A, pero no por RNA 5' trifosfato (Fig. 12A); por otra parte, la cloroquina no afectó a la producción de IFN- α inducida por RNA 5' trifosfato en los monocitos aislados (Fig. 12B). El CpG-A es inactivo en los monocitos con y sin cloroquina debido a la falta de TLR9 (Fig. 12B).

En analogía con el sistema humano, las células de médula ósea y las células dendríticas mieloides murinas produjeron grandes cantidades de IFN- α después de la transfección con RNA 5' trifosfato. La inducción de IFN- α y de IP-10 en las células dendríticas mieloides derivadas de la médula ósea de ratones TLR7-/- (Fig. 12C) o de ratones LPS2-/- (no se muestran datos) fue comparable al nivel de inducción de IFN- α en ratones naturales.

En total, estos datos sugieren que el reconocimiento de RNA 5' trifosfato no requiere la maduración endosómica, y que los TLR3, TLR7/8 o TLR9 no están involucrados.

Ejemplo 5. La inducción de IFN tipo I por RNA 5' trifosfato exógeno y endógeno requiere RIG-I pero no MDA5.

En estudios previos, se encontró que el reconocimiento mediado por TLR7 de RNA inmunoestimulante sintético requiere la complejación con un polímero catiónico que permite la administración endosómica y confiere protección contra la degradación por nucleasa, pero no la transfección de RNA en el citosol. En contraste con el isRNA sintético, el RNA 5' trifosfato indujo el IFN- α en los monocitos sólo cuando fue transfectado en el citosol por lípidos catiónicos, mientras que la formación de complejos con péptidos catiónicos no fue suficiente (no se muestran datos). Consistente con estas observaciones, la inducción de IFN- α mediada por RNA 5' trifosfato no requiere ni la maduración endosómica ni TLR7 (Fig. 11) ni TLR3 (no se muestran datos). Estos resultados indicaron que el receptor de RNA 5' trifosfato está localizado en el citosol y no en el compartimiento endosómico.

El RIG-I y MDA-5 son proteínas citoplasmáticas implicadas en el reconocimiento de los virus RNA (H. Kato *et al.*, Nature 441, 101 (Apr 9, 2006)); tanto RIG-I como MDA-5 se cree que están implicados en el reconocimiento de dsRNA. Aunque el RNA 5' trifosfato en la presente invención era activo como RNA de cadena sencilla, sigue sin determinarse si RIG-I o MDA-5 están implicados en el reconocimiento de 5' trifosfato.

A fin de abordar el efecto de mutantes negativos dominantes de RIG-I, se utilizaron en lugar de monocitos, células HEK 293 que expresan la luciferasa reportero bajo el control del promotor de IFN- β . Como era de esperar, las células HEK 293 transfectadas transitoriamente con RIG-I no respondieron a poli(I:C) ni a isRNA sintético (RNA9.2s) (Fig. 4A.). Sin embargo, de forma inesperada, el RNA 5' trifosfato de cadena sencilla (tri-GFPs y tri-GFPa) activó fuertemente la expresión del reportero en células HEK 293 que expresan RIG-I. Sólo las células HEK 293 que expresan RIG-I de longitud completa respondieron a RNA 5' trifosfato; las células HEK293 que expresan RIG-I truncado que carecía del dominio CARD en N terminal o RIG-I 270KA mutante desprovisto de la actividad de ATPasa no lo hicieron.

Para confirmar que RIG-I era necesario para el reconocimiento de RNA 5' trifosfato, se determinó la actividad de RNA 5' trifosfato en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) con RIG-I^{-/-}. Mientras que los MEF naturales produjeron grandes cantidades de IFN-β (Fig. 4B) y de IL-6 (no se muestran datos) en respuesta a la estimulación de RNA 5' trifosfato, no se detectó respuesta en los MEF con RIG-I^{-/-}. (Fig. 4B). La respuesta a la RNA 5' trifosfato en los MEF con MDA-5^{-/-} fue similar a la de los MEF naturales.

En conjunto, estos datos proporcionan la prueba de que RIG-I, pero no MDA-5, es necesario para el reconocimiento de RNA 5' trifosfato y que el reconocimiento de RNA 5' trifosfato no se limita a las células inmunitarias tales como los monocitos primarios.

Se plantea la hipótesis de que puesto que el RNA 5' trifosfato se reconoce por medio de RIG-I, la formación de RNA 5' trifosfato endógeno mediante la sobreexpresión citoplasmática de la RNA polimerasa T7 debería provocar la ruta del IFN tipo I. Para probar esta hipótesis, se empleó un sistema, que ha sido utilizado ampliamente para generar virus RNA recombinante de cadena negativa (NSV) a partir de cDNA transcrito *in vivo* en el contexto de los métodos de genética inversa (F. Radecke *et al.*, *Embo J* 14, 5773 (Dec 1, 1995)). Este sistema permite la transcripción directa de RNA dependiente del molde dentro de una célula por medio de la RNA polimerasa T7 expresada citosólicamente.

De hecho, la coexpresión de RIG-I natural y de RNA polimerasa T7 natural, en ausencia de RNA 5' trifosfato añadido exógenamente, indujo fuertemente una respuesta de IFN tipo I (Fig. 4C). No se detectó ninguna respuesta de IFN tipo I cuando se expresó una combinación de RIG-I natural y una forma mutada de RNA polimerasa T7 (T7 D812N) o una combinación de RIG-I mutante (RIG-IC) y la RNA polimerasa T7 natural.

A altos niveles de expresión, se observó la inducción de IFN tipo I, mediada por la RNA polimerasa T7, independiente del molde (Fig. 4C: sin molde y con X8dT); la presencia de un molde que contiene el promotor de RNA polimerasa T7 fue capaz de mejorar la transcripción dependiente de la inducción de IFN tipo I (Fig. 4C: pBKS). Cuando la RNA polimerasa T7 se expresó a niveles más bajos, se pudo ver una inducción completa de IFN tipo I dependiente del molde (Fig. 4D; 100 ng de RNA polimerasa T7).

Estos resultados demostraron que no solamente el RNA 5' trifosfato añadido exógenamente sino que también el generado endógenamente es reconocido por medio de RIG-I, y confirmaron que los contaminantes en las preparaciones de RNA 5' trifosfato añadido exógenamente no están implicados en la inducción de IFN tipo I.

Ejemplo 6. El RIG-I detecta directamente el RNA trifosfato genómico de un virus RNA de cadena negativa de mamífero.

De modo característico, todos los NSV inician la replicación del RNA vírico de una manera independiente del cebador, dando como resultado la presencia de un resto trifosfato en el extremo 5' del genoma vírico (vRNA) o del antigenoma (cRNA). Además, en caso de NSV con un genoma no segmentado (orden *Mononegavirales*), incluyendo por ejemplo los paramixovirus y rabdovirus, la transcripción de RNA da abundantes cantidades de RNAs 5' trifosfato cortos (aproximadamente 60 nucleótidos), conocidos como los RNA líderes, que están modelados por el extremo 3' del vRNA (S. P. Whelan, *et al.* *Current topics in microbiology and immunology* 283, 61 (2004)). Para evaluar la importancia de los RNAs 5' trifosfato de NSV en el reconocimiento de la infección vírica por RIG-I, se utilizó virus de la rabia (RV), un prototipo de rabdovirus.

El RV natural (SAD L16) codifica un potente antagonista de la inducción de IFN, la fosfoproteína P, y por lo tanto no induce una expresión considerable de IFN después de la infección de las células epiteliales. En contraste, un mutante de RV obtenido por ingeniería genética para expresar P en pequeña cantidad (SAD ΔPLP) es un inductor eficaz de IFN (K. Brzozka, *et al.* *Journal of virology* 79, 7673 (Jun, 2005); K. Brzozka, *et al.* *Journal of virology* 80, 2675 (Mar, 2006)). Para confirmar que RIG-I está implicado en el reconocimiento de la infección por RV, se infectaron células Vero con el RV inductor de IFN, SAD ΔPLP, en ausencia o presencia de RIG-I o RIG-IC (un mutante de RIG-I con truncación negativa dominante) transfectado. La infección por SAD ΔPLP provocó una potente respuesta de IFN que puede ser mejorada aún más por la sobreexpresión de RIG-I y deprimida fuertemente por RIG-IC (Fig. 5A).

Estos resultados indicaron que se requiere RIG-I para el inicio de una respuesta de IFN a la infección por RV, como se ha observado para otros NSV, VSV y Flu (H. Kato *et al.*, *Nature* 441, 101 (Apr 9, 2006)).

Para resolver si el propio RNA de RV o la replicación viral es reconocido por medio de RIG-I, se aisló RNA de las células BSR infectadas por RV y se transfectó posteriormente a células HEK 293T. El RNA de las células infectadas por RV, pero no el RNA de las células no infectadas, indujo una potente respuesta de IFN-β (Fig. 5B). Además, la producción observada de IFN-β se suprimió completamente cuando el RNA aislado se desfosforiló por CIAP antes de la transfección (Fig. 5B), lo que indica que se requiere el grupo 5' trifosfato para el reconocimiento.

El RNA de NSV y de células infectadas por NSV no se considera infeccioso y no permite la iniciación de un ciclo replicativo. El hecho de que el RNA de células infectadas por RV SAD L16 era igualmente potente en términos de inducción de IFN-β que el RNA de células infectadas por RV SAD ΔPLP indicó que se había iniciado poca o ninguna traducción y replicación productiva por medio de la transfección de los respectivos aislados de RNA.

Sin embargo, para descartar completamente que se requiere la replicación de RV para desencadenar una respuesta de IFN tipo I, se aisló RNA de longitud completa a partir de viriones y se evaluó para su capacidad de inducir la expresión de IFN tipo I. La transfección de 200 ng de RNA de RV purificado estimuló eficazmente la inducción de IFN tipo I en las células HEK 293T y la desfosforilación del RNA genómico de RV eliminó completamente la respuesta de IFN. Un transcrito de RNA de cadena sencilla *in vitro* correspondiente al RNA de RV líder de 58 nucleótidos de longitud confirmó el reconocimiento y la inducción potente de IFN tipo I por RNA de cadena sencilla vírico.

En conjunto, estos resultados demostraron que RIG-I reconoce directamente el RNA genómico de RV independiente de la replicación y que este reconocimiento es abolido si el extremo 5' del RNA se desfosforila.

10 Ejemplo 7. El RNA 5' trifosfato se une directamente a RIG-I.

El hecho de que se necesite RIG-I para el reconocimiento de RNA 5' trifosfato no proporciona ninguna prueba de que RIG-I sea el receptor de RNA 5' trifosfato. Para identificar el receptor de RNA 5' trifosfato, se llevaron a cabo ensayos de unión *in vitro* para ensayar la capacidad de RNA 5' trifosfato para eliminar RIG-I o RIG-IC, el dominio de unión de RNA de RIG-I.

15 Se generaron oligonucleótidos de RNA con etiquetas de biotina en el terminal 3' y se incubaron con lisado de células enteras procedentes de células HEK 293 que sobreexpresan RIG-I de longitud completa, RIG-I CARD2 (el segundo CARD de RIG-I) o RIG-I Δ Helicasa_C (RIG-I desprovisto del dominio C-terminal de la superfamilia de helicasas citada). Posteriormente se utilizaron perlas de estreptavidina para eliminar las marcas de biotina de los oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato.

20 Aunque el oligonucleótido 5' trifosfato biotilado (tri-G-CA-U-Bio) era capaz de inmunoprecipitar RIG-I de longitud completa (Fig. 6A, tercer panel, parte media), no fue muy eficaz en la destrucción de versiones truncadas de RIG-I, CARD2 y RIG-I Δ Helicasa_C (Fig. 6A, tercer panel parte izquierda y derecha). El oligonucleótido de RNA de control no biotilado (tri-G-AC-U) no inmunoprecipitó RIG-I. El RIG-IC purificado también fue eliminado de manera eficiente por los oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato (Fig. 6B, segunda fila). Si el grupo 5' trifosfato inicial del oligonucleótido de RNA era eliminado enzimáticamente antes de la incubación con RIG-I, no se observaba ninguna co-precipitación (Fig. 6B, cuarta fila).

Estos resultados indicaron que el RNA 5' trifosfato se une directamente a RIG-I o RIG-IC de longitud completa, es decir, RIG-I es el receptor directo responsable del reconocimiento de RNA 5' trifosfato.

30 Ejemplo 8. Los oligonucleótidos de RNA con 5' adenosina trifosfato son superiores a los oligonucleótidos de RNA con 5' guanosina trifosfato en la inducción de la producción de IFN- α .

El sistema clásico de transcripción *in vitro* hace uso del promotor de consenso de la RNA polimerasa T7 (J. J. Dunn, F. W. Studier, J Mol Biol 166, 477 (Jun 5, 1983)). La transcripción bajo este promotor se inicia por GTP y normalmente requiere dos o más guanosinas consecutivas en el extremo 5' de RNA para una transcripción eficiente. Sin embargo, es posible utilizar un sistema promotor para la RNA polimerasa T7 que se inicia con un 5' ATP (F. Huang *et al.*, Biochemistry 39, 15548 (Dec 19, 2000)). Usando este sistema, se evaluó el papel de la 5' guanosina inicial en la actividad de inducción del IFN tipo I de los oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato. Se utilizó RNA9.2s (RNA9.2s-0A) como un oligonucleótido de referencia ya que empieza con una 5' adenosina.

40 Comparando el RNA9.2s-0A (5' ATP) con RNA9.2s-1G (5' GTP), que está desplazado una base aguas abajo del correspondiente mRNA TLR9 humano, el último mostró una reducción de aproximadamente un 25 % en la inducción de IFN- α (Fig. 12, panel superior). Cuatro bases más aguas abajo del mRNA TLR9 humano, otro oligonucleótido de 19 meros pudo ser transcrito el cual se iniciaba con una 5' adenosina (RNA9.2s-5A). El RNA9.2s-5A es paralelo al RNA9.2-0A en términos de inducción de IFN- α .

45 Un segundo conjunto de experimentos corroboró estos hallazgos: la comparación del oligonucleótido de RNA de 35 meros A Φ 6.5-35n (5' ATP) transcrito *in vitro*, con el G Φ 6.5-35n (5' GTP) reveló una clara superioridad del transcrito iniciado con una adenosina en la inducción de IFN tipo I, a pesar de que estos oligonucleótidos comparten más del 97 % de homología en la secuencia (Fig. 12, panel inferior).

50 En conjunto, estos hallazgos indicaron que los transcritos de RNA iniciados con una 5' adenosina son más potentes en términos de inducción de IFN- α que los iniciados con una 5' guanosina. Otros datos demuestran que de las cuatro bases posibles en el extremo 5', la más alta actividad de inducción del IFN- α se observó cuando estaba A en el extremo 5', seguido por C, U y G (Figura 25).

Ejemplo 9: La actividad de inducción de IFN- α del oligonucleótido de RNA 5'-trifosfato iniciado con adenosina depende de su secuencia 5' nucleotídica.

55 Los oligonucleótidos de RNA trifosfato iniciado con adenosina con todas las posibles permutaciones de bases (A, C, G y U) de la 2^a, 3^a y 4^a posición de la secuencia (5'→3') (Tabla 2) se generaron mediante transcripción *in vitro*. Posteriormente se aislaron los monocitos de tres donantes independientes y se transfectaron con los respectivos

oligonucleótidos de RNA. 36 horas después de la transfección, se analizaron los sobrenadantes para la producción de IFN- α . Los niveles de inducción de IFN- α obtenidos de todos los oligonucleótidos se normalizaron al nivel medio de inducción de todos los oligonucleótidos (= 100 %). Los niveles de inducción normalizados obtenidos de los tres donantes se resumieron como valores medios \pm SEM (Figura 13).

- 5 Por la figura 13 se ve claramente que los oligonucleótidos de RNA transcrito *in vitro* iniciado con adenosina, que tienen idéntica secuencia 3' pero diferentes nucleótidos en la 2^a, 3^a y 4^a posiciones tienen diferentes niveles de actividad inductora de IFN- α . Las secuencias 5' de 4 nucleótidos que confieren la actividad más elevada de inducción de IFN- α incluyen AAGU, AAAG, AUGG, AUUA, AACG, AUGA, AGUU, AUUG, AACA, AGAA, AGCA, AACU, AUCG, AGGA, AUCA, AUGC, AGUA, AAGC, AACC, AGGU, AAAC, AUGU, ACUG, ACGA, ACAG, AAGG, ACAU, ACGC, AAAU, ACGG, AUUC, AGUG, ACAA, AUCC, AGUC.
- 10

Tabla 2

Todo los oligos comparten la misma secuencia excepto la 2^a, 3^a y 4^a posición (5'-ANNNGGGGACACACACACACACACAC-3')

SEQ ID No.	Secuencia	Inducción de IFN- α (*100 %)	
		media	SEM
111	AGGG	0,22	0,05
112	AAUA	0,40	0,07
113	AGAU	0,48	0,04
114	AGAG	0,50	0,06
115	AGCG	0,52	0,01
116	AGAC	0,62	0,10
117	ACUA	0,62	0,05
118	ACUU	0,66	0,01
119	AAUU	0,67	0,03
120	AGCU	0,69	0,01
121	AAAA	0,73	0,09
122	ACCG	0,73	0,03
123	AUAG	0,76	0,07
124	ACCU	0,76	0,01
125	ACGU	0,77	0,02
126	ACCA	0,79	0,01
127	AUAA	0,82	0,13
128	AGCC	0,87	0,04
129	AUAU	0,89	0,03
130	ACCC	0,89	0,01
131	AGGC	0,91	0,02
132	AAUC	0,94	0,05
133	AUCU	0,94	0,03
134	AAGA	0,95	0,19

135	ACAC	0,95	0,08
136	AAUG	0,96	0,07
137	ACUC	0,98	0,04
138	AUUU	0,99	0,06
139	AUAC	0,99	0,07
140	AGUC	1,00	0,08
141	AUCC	1,01	0,07
142	ACAA	1,01	0,08
143	AGUG	1,01	0,12
144	AUUC	1,03	0,07
145	ACGG	1,03	0,05
146	AAAU	1,04	0,19
147	ACGC	1,08	0,07
148	ACAU	1,11	0,09
149	AAGG	1,11	0,22
150	ACAG	1,12	0,01
151	ACGA	1,14	0,02
152	ACUG	1,14	0,08
153	AUGU	1,15	0,17
154	AAAC	1,15	0,09
155	AGGU	1,18	0,11
156	AACC	1,20	0,19
157	AAGC	1,22	0,13
158	AGUA	1,22	0,12
159	AUGC	1,23	0,10
160	AUCA	1,24	0,09
161	AGGA	1,27	0,05
162	AUCG	1,28	0,12
163	AACU	1,29	0,13
164	AGCA	1,29	0,15
165	AGAA	1,29	0,14
166	AACA	1,30	0,19
167	AUUG	1,31	0,11
168	AGUU	1,32	0,15
169	AUGA	1,32	0,01

170	AACG	1,34	0,15
171	AUUA	1,36	0,03
172	AUGG	1,38	0,10
173	AAAG	1,40	0,15
174	AAGU	1,40	0,10

Ejemplo 10: Cancelado

Ejemplo 11. Combinación de funciones inmunoestimulantes potentes con eficiente actividad de silenciamiento génico en una molécula de RNA

- 5 Se identificaron varias secuencias dirigidas a Bcl-2 murino y posteriormente se generaron tres siRNAs sintéticos (anti-Bcl-2.1, anti-Bcl-2.2, anti-Bcl-2.3) dirigidos a diferentes porciones del mRNA Bcl-2 murino (para una lista detallada de todos los oligonucleótidos de RNA sintetizados químicamente véase la Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de RNA sintetizadas químicamente

SEQ. ID. No.	Nombre	Tipo	Secuencia 5'→3
103	Bcl-2 murino 2.1 sentido	RNA	AUGCCUUUGUGGAACUAUA
104	Bcl-2 murino 2.1 antisentido	RNA	UAUAGUCCACAAAGGCAU
105	Bcl-2 murino 2.2 sentido	RNA	GCAUGCGACCUCUGUUUGA
106	Bcl-2 murino 2.2 antisentido	RNA	UCAAACAGAGGUCGCAUGC
107	Bcl-2 murino 2.3 sentido	RNA	GGAUGACUGAGUACCUGAA
108	Bcl-2 murino 2.3 antisentido	RNA	UUCAGGUACUCAGUCAUCC
109	Poli-A	RNA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
175	RIG-I murino sentido	RNA	GAAGCGUCUUCUAAUAAUU
176	RIG-I murino antisentido	RNA	AAUUUUUAGAAGACGCUUC
177	Control	RNA	UUCUCCGAACGUGUCACGU
178	Control antisentido	RNA	ACGUGACACGUUCGGAGAA

- 10 Después de la transfección de los diferentes anti-Bcl-2-siRNAs y un siRNA de control en células de melanoma B16, se determinó la regulación por disminución de Bcl-2 mediante transferencia de Western de los lisados celulares (Fig.15a, panel superior). Diferentes siRNAs mostraron diferentes eficiencias en la regulación por disminución objetivo. El tratamiento de las células de melanoma B16 con una dosis única de anti-Bcl-2.2 (denominado ahora OH-2.2) dio como resultado una regulación por disminución eficiente de la expresión de Bcl-2 48 h después de la transfección en comparación con el siRNA de control (Fig. 15a, panel superior). Esta reducción específica de Bcl-2 ya fue observada después de 18 h, se prolongó durante al menos 72 h y se confirmó por análisis FACS de Bcl-2 intracelular (no se muestran datos).

Posteriormente, el anti-Bcl-2.2 fue transcrito *in vitro* teniendo así 5' trifosfatos (denominado ahora 3p-2.2; para una lista detallada de todos los moldes de transcripción *in vitro* véase la Tabla 4).

- 20 Tabla 4. Moldes de DNA para la transcripción *in vitro*

SEQ. ID. No.	Nombre	Tipo	Secuencia 5'→3
68	Bcl-2 murino 2.2 sentido	DNA	TCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGTCG
69	Bcl-2 murino 2.2 antisentido	DNA	GCATGCGACCTCTGTTTGACTATAGTGAGTCG
70	GA	DNA	TTTTTTTTTTTTCCCCCCCCCTATAGTGAGTCG
179	GC sentido	DNA	GGCGCCCCGCGCGCCCCGCTATAGTGAGTCG
180	GC antisentido	DNA	GCGGGGCGCGGCGGGGCGCCTATAGTGAGTCG

- Se ensayó 3p-2.2 para determinar su capacidad para reducir la expresión de Bcl-2 (Fig. 15a). La transfección de células B16 con siRNA 3p-2.2 también dio como resultado una regulación por disminución de Bcl-2 eficiente. De modo importante, esta reducción específica de Bcl-2 no se observó con un 3p-siRNA (3p-GC) no específico ni con un siRNA de control sintético.
- Utilizando un anticuerpo anti-RIG-I, se determinó a continuación la expresión de RIG-I endógeno en células B16 antes y después de la estimulación por transferencia Western (Fig. 15b). Curiosamente, la expresión de RIG-I en las células B16 fue fuertemente regulada por incremento por IFN-β exógeno (1000 U/ml), y en un grado similar por siRNA 3p-2.2.
- Para investigar el potencial inmunoestimulante del 3p-2.2 transfectado en células B16, se monitorizó la activación del promotor de IFN-β (Fig. 15c). Sorprendentemente, la estimulación de las células B16 con 3p-2.2, pero no con poli(I:C) ni con OH-2.2, aumentó de forma significativa la inducción de un gen reportero (luciferasa de Renilla) dirigido por el promotor de IFN-β (pIFNβ-luc; * P <0,05 entre 3p-2.2, OH-2.2 y poli(I:C)).
- Esto llevó a evaluar más a fondo la contribución de RIG-I y su proteína adaptadora que contiene CARD, Cardif (Kawai T *et al.* (2005) Nat. Immunol. 6 (10): 981-988; Meylan E *et al.* (2005) Nature 437 (7062): 1167-1172; Seth R *et al.* (2005) Cell 122(5): 669-82; Xu L *et al.* (2005) Mol Cell 19(6): 727-40) en células B16.
- Un siRNA sintético dirigido a RIG-I de ratón (véase la Tabla 3) redujo significativamente la activación promotora de IFN-β dependiente de 3p 2.2 (Fig. 15d; * P <0,05 entre siRNA de control (siCO) + 3p-2.2 y siRNA RIG-I (siRIG-I) + 3p-2.2), lo que demuestra un papel claro de RIG-I en la señalización inducida por 3p-2.2.
- NS3-4A es una serina proteasa multifuncional del virus de la hepatitis C (HCV), que es capaz de escindir específicamente y con ello inactivar Cardif (Chen Z *et al.* (2007) J. Virol. 81 (2): 964-76; Meylan E *et al.* (2005) Nature 437 (7062): 1167-1172). La expresión de NS3-4A en células B16 redujo en gran medida la activación promotora de IFN-β por 3p-2.2, mientras que la expresión de la forma inactiva NS3-4A* no tuvo ningún efecto sobre la activación promotora de IFN-β (Fig. 15e; * P <0,05, NS3-4A + 3p-2.2 versus NS3-4A + 3p-2.2).
- Tomados en conjunto, estos resultados indican que las células B16 regulan por incremento RIG-I por estimulación con 3p-2.2 y que RIG-I y Cardif son esenciales para la inmunoestimulación inducida por 3p-2.2 en las células de melanoma B16. Además, se demuestra que 3p-2.2 induce el silenciamiento génico eficiente de Bcl-2 en células de melanoma murino.
- Ejemplo 12. La transfección de 3p-2.2 desencadena directamente la apoptosis independiente de Cardif en las células tumorales, pero no en las células primarias
- Después de la exposición prolongada a 3p-RNA, la evaluación microscópica de células B16 reveló la reducción del número de células en comparación con las células B16 que fueron transfectadas con siRNA de control o con OH-2.2. Se planteó la hipótesis de que un aumento de la muerte celular por la transfección de 3p-2.2 contribuyó a la reducción de las células B16 viables.
- Para delinear los mecanismos responsables de la muerte celular observada, se analizaron las células B16 en cuanto a un fenotipo apoptótico por tinción con anexina-V y yoduro de propidio. 24 horas después de la transfección, se observó un aumento significativo en el número de células apoptóticas con 3p-2.2 (14 %) en comparación con el siRNA de control (1,06 %) (Fig. 16a). En todos los experimentos realizados, aproximadamente el 15 % (15,62 % ± 1,01; % media ± SEM) de las células B16 tratadas con 3p-2.2 fueron positivas para anexina-V; el número de células apoptóticas fue aproximadamente 4 veces menor en las células tratadas con los siRNA de control (Fig. 16b; 2,93 % ± 1,12). El tratamiento con OH-2.2 también aumentó el número de células apoptóticas (5,63 % ± 0,66), sin embargo en una medida significativamente menor que el 3p- 2,2 (Fig. 16b).
- Se llevaron a cabo experimentos similares utilizando 3p-RNA no específico de una diana en B16, así como en otras líneas celulares de melanoma y se obtuvieron resultados similares, lo que indica que el 3p-RNA induce la muerte celular independientemente del silenciamiento génico mediado por siRNA (no se muestran datos).

Para identificar las rutas intracelulares relevantes para la muerte celular observada, se expresaron en primer lugar NS3-4A y la forma inactiva NS3-4A* en células B16 y se analizaron en cuanto a la apoptosis por tinción con anexina V y yoduro de propidio (Fig. 16c). En estos experimentos, no se observaron cambios en la apoptosis después de la transfección adicional de 3p-2.2 (8,3 % \pm 0,5 con la forma inactiva y 7,3 % \pm 0,67 con la forma activa), lo que indica que la apoptosis inducida por 3p-RNA es independiente de Cardif.

Estudios recientes informaron, además, que los virus dependientes de RIG-I y los RNA transcritos *in vitro* activan la caspasa-1, un componente importante de la inflammasoma (Kanneganti TD *et al.* (2006) Nature 440 (7081): 233-6). También se ha sugerido que la caspasa-1 participa en los procesos de apoptosis (Cuesta N (2007) J Immunol 178 (6): 3602-11; Henry T *et al.* 2007 J Exp Med 204 (5): 987-94). Por lo tanto, se analizó la activación de la caspasa-1 en las células B16 utilizando transferencia Western. En estos experimentos, se observó un aumento de la escisión de la procaspasa-1 a la subunidad activa p10 cuando se transfectaron las células con 3p-2.2 y poli(I:C) (Fig. 16d). Sin embargo, utilizando dos siRNA funcionales dirigidos a caspasa-1 no se pudo detectar ningún cambio en la apoptosis (no se presentan los datos), lo que sugiere que la caspasa-1 no está implicada en la apoptosis mediada por 3p-2.2.

A continuación, se abordó la cuestión de si la muerte celular mediada por 3p-2.2 estaba restringida a las células tumorales. Se analizaron células primarias humanas, PBMCs, para la apoptosis por tinción con anexina-V y yoduro de propidio después de estimulación con 3p-2.2, siRNA de control y OH-2.2. Curiosamente, no se observó ninguna inducción de la apoptosis por 3p-2.2 en las PBMC humanas (Fig. 16d). Por otra parte, la tinción de los fibroblastos humanos y de los queratinocitos humanos con anexina-V no reveló ningún aumento en la muerte celular después de la transfección con 3p-2.2 (no se muestran datos). Tomados en conjunto, estos resultados indican que 3p-2.2 induce la apoptosis en las células de melanoma pero no en las células primarias.

Ejemplo 13. La producción de IFN- α por 3p-2.2 requiere TLR7 en las pDCs y RIG-I en las cDCs

Estudios recientes demostraron que la inducción tanto de IFN- α como de IFN- β en las células dendríticas convencionales (cDCs) tras la exposición a diversos virus RNA, incluyendo el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus Sendai (SeV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV), es regulada por RIG-I (Kato H *et al.* (2005) Immunity 23 (1): 19-28). En contraste, las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) utilizan preferiblemente TLR7, pero no RIG-I, para el reconocimiento de virus tales como el NDV, llevando a la inducción de los IFN tipo I.

Se examinó la respuesta de IFN de las cDC naturales, y las cDC deficientes en RIG-I, TLR7, y MDA5, después de la estimulación con 3p-2.2, por ELISA (Fig. 17a, b, c). Como era de esperar, la producción de IFN- α , por las cDC estimuladas por 3p-2.2, de ratones deficientes en RIG-I estaba completamente anulada (Fig. 17a). La producción de IFN- α por cDCs estimuladas por 3p-2.2 de ratones deficientes en MDA5 (Fig. 17b; tipo natural frente a MDA5^{-/-}: 2509 \pm 96 versus 2333 \pm 178; pg/ml \pm SEM) y de ratones deficientes en TLR7 (Fig. 17c; tipo natural frente a TLR7^{-/-}: 771 \pm 324 versus 881 \pm 355; U/ml \pm SEM) era en gran medida normal. Estos resultados indican que la inducción de IFN- α por 3p-2.2 es regulada por RIG-I en las cDCs.

Se purificaron entonces las pDC procedentes de DCs derivadas de BM inducidas por Flt3-L (Flt3-L-DCs) de ratones naturales y de ratones deficientes en TLR7 utilizando perlas magnéticas y se determinó la secreción de IFN- α . Las pDC naturales produjeron IFN- α en respuesta a 3p-2.2 (Fig. 17d). En contraste, las pDC deficientes en TLR7 mostraron una producción defectuosa de IFN- α en respuesta a 3p-2.2 (Fig. 17d).

Se observó también la inducción de IFN- α en los macrófagos peritoneales (no se muestran datos).

A continuación, se examinó la sensibilidad de diferentes subconjuntos de células inmunitarias purificadas frente a 3p-2.2. En comparación con las cDC y las pDC, las células B, células NK y células T CD8 respondieron débilmente a la estimulación con 3p-2.2 con una baja producción de IFN- α (cDCs 2357 \pm 437; pDCs 3036 \pm 354; células NK 94 \pm 2,07, células B y células T CD8 0; U/ml \pm SEM).

Estas observaciones indican que las cDC y las pDC explotan principalmente el sistema RIG-I y el sistema TLR para reconocer 3p-2.2. Sin embargo, las células del sistema inmunitario adaptativo no responden a 3p-RNA en un grado significativo con la producción de IFN- α .

Ejemplo 14: El 3p-2.2 complejo lleva a la activación inmunitaria sistémica *in vivo*

Para hacerse una idea de la importancia biológica de las respuestas mediadas por 3p-2.2 *in vivo*, se enfrentaron ratones con 3p-2.2 complejo a jetPEITM y se midieron las citocinas séricas incluyendo IFN- α , IL-12p40 e IFN- γ (Fig. 18a, b, c). Después de 6 h, el 3p-2.2 indujo niveles significativamente más altos de IFN- α que CpG 1826 o OH-2.2 (Fig. 18a; P^{**} <0,01 entre 3p-2.2 y OH-2.2, CpG 1826, jetPEITM y PBS). Tanto 3p-2.2 como OH-2.2 indujeron una producción significativa de IL-12p40 (Fig. 18b; P^{**} <0,01 entre 3p-2.2 y jetPEITM y PBS). Además, 3p-2.2 indujo un alto nivel de producción de IFN- γ *in vivo* (Fig. 18c; P^{**} <0,01 entre 3p-2.2 y OH-2.2; P* <0,05 entre 3p-2.2 y jetPEITM y PBS).

A continuación se examinaron los niveles de citocinas en suero en ratones deficientes en TLR7 después de la administración de 3p-2.2. La producción de IFN- α (Fig. 18d), IL-12p40 (Fig. 18e), e IFN- γ (Fig. 18f) se redujo sólo en

parte en los ratones deficientes en TLR7 después de la transfección con 3p-2.2 en comparación con los ratones naturales (IFN- α : tipo natural frente a TLR7^{-/-}, 885 \pm 89 versus 406 \pm 181; IL-12p40: 5635 \pm 1662 versus 2609 \pm 973; IFN- γ : 1881 \pm 259 versus 1599 \pm 259). En contraste, la producción de IFN- α , IL-12p40 e IFN- γ se vio gravemente afectada en los ratones deficientes en TLR7 después de la estimulación con OH-2.2 (IFN- α : tipo natural frente a TLR7^{-/-}, 207 \pm 100 versus 0; IL-12p40: 1444 \pm 19 versus 553 \pm 147; IFN- γ : 926 \pm 30 versus 107 \pm 35). Adicionalmente, la administración intravenosa de 3p-2.2 en los ratones naturales mejoró la producción de citocinas en suero de una forma dependiente de la dosis (Fig. 19a).

Para caracterizar adicionalmente el potencial inmunoestimulante de 3p-2.2 *in vivo*, se sacrificaron ratones naturales 48 h después de la inyección de 3p-2.2, se aislaron las células del bazo y se analizó la expresión en superficie de moléculas coestimulantes en distintos subconjuntos de células inmunitarias por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 19b y 19c, el 3p-2.2 no sólo activó las células dendríticas mieloides y plasmacitoides como se refleja por el aumento de la expresión de CD69 y de CD86 de una manera dependiente de la dosis, sino que también reguló por incremento la expresión de CD69 en las células NK, células T CD4+ y T CD8+ *in vivo*.

A continuación, se examinó el curso temporal de la producción de IFN- α inducida por 3p-2.2 y OH-2.2 *in vivo*. De manera consistente con los datos previos *in vivo*, el 3p-2.2 indujo cantidades más altas de IFN- α que su homólogo sintético OH-2.2. 48 horas después de la estimulación, los perfiles de citocinas después de la administración de 3p-2.2 o OH-2.2 reflejó leucopenia moderada (Fig. 20b) y trombocitopenia (Fig. 20c). La trombocitopenia era más evidente en los ratones tratados con CpG que en los ratones tratados con 3p-2.2 ($P^{**} < 0,01$ entre el recuento de plaquetas de 3p-2.2 y CpG).

En conjunto, estas observaciones indican que el 3p-2.2 activa potentemente distintos subconjuntos de células inmunitarias y aumenta la producción de citocinas en suero de una manera dependiente de la dosis y de una manera independiente de TLR7 *in vivo*.

Ejemplo 15. La administración de 3p-2.2 encapsulado da como resultado la reducción de las metástasis pulmonares de melanoma B16 inducidas experimentalmente

Se evaluó la actividad antitumoral de 3p-2.2 frente a metástasis pulmonares de melanoma B16 *in vivo*. Grupos de cinco ratones se enfrentaron intravenosamente en primer lugar con células de melanoma B16 y posteriormente se trataron con poliA, OH-2.2, 3p-GC o 3p-2.2 según el programa representado en la Figura 21a. PoliA (una molécula no estimulante de RNA de 19 meros; Tabla 3) complejado con jetPEITM sirvió como control negativo. CpG 1826 complejado con jetPEITM sirvió como control positivo. El día 14, se sacrificaron los ratones, y se extirparon los pulmones. Después se contaron las metástasis pulmonares utilizando un microscopio de disección o, en caso de carga tumoral masiva, se pesaron para determinar la masa de tumor.

Los ratones tratados con OH-2.2 mostraron una reducción no significativa de las metástasis pulmonares comparados con el grupo de control tratado con poliA (Fig. 21b). Es importante destacar que, el tratamiento con 3p-2.2 llevó a la reducción de las metástasis pulmonares en un porcentaje significativo de ratones en comparación con los grupos tratados con OH-2.2 y con poliA ($P^{**} < 0,01$ entre 3p-2.2 y poliA, OH-2.2). Como era de esperar, CpG 1826 fue capaz de promover una reducción significativa de las metástasis pulmonares, pero en un grado menor que 3p-2.2. Curiosamente, la administración de 3p-GC, un RNA 5' trifosfato de cadena doble no específico que no contiene ninguna uridina (véase la Tabla 4), también redujo la metástasis de pulmón, pero en un grado significativamente menor que 3p-2.2 ($P^{**} < 0,01$ entre 3p-2.2 y 3p-GC).

Estos datos dieron a entender que, además de en la inmunoestimulación, el 3p-2.2 media en la actividad antitumoral directa *in vivo*.

Recientemente, se ha demostrado que la aplicación intraperitoneal de siRNAs complejados con PEI favorece la absorción en las células tumorales que han sido implantadas lejos del sitio de inyección (Aigner A *et al.* (2006) J Biomed Biotechnol 2006 (4): 71659; Grzelinski M *et al.* (2006) Hum Gene Ther 17(7): 751-66; Urban-Klein B *et al.* (2005) Gene Ther 2005 Mar; 12(5): 461-6)

Se ha intentado examinar la absorción celular de siRNA complejado con jetPEITM después de la administración intravenosa mediante microscopía confocal. Se inyectaron células B16 por vía intravenosa a ratones C57BL/6 y 14 días después de la inoculación del tumor, se inyectó una dosis única de siRNA marcado con FITC (100 μ g) retroorbitalmente. Después de 6 h, se sacrificaron los ratones y se extirparon varios tejidos, incluyendo los pulmones. Como era de esperar, en el caso de los siRNA no complejados, no se observó ninguna absorción en los pulmones de los ratones sanos ni en los ratones con metástasis pulmonares, lo que indica una degradación rápida y completa del siRNA marcado con FITC (Fig.21c, panel superior, -PEI). En contraste, después de complejación con PEI, se detectó siRNA intacto en altas cantidades en varios tejidos incluyendo el hígado y el bazo (no se presentan datos). Se detectaron cantidades considerables de siRNA marcado con FITC en los pulmones de los ratones sanos, pero en un grado menor en las metástasis pulmonares de los ratones enfermos. (Fig.21c, panel inferior, +PEI).

Tomados en conjunto, las metástasis de melanoma B16 se redujeron significativamente en todos los ratones que recibieron 3p-2.2, pero no en los ratones tratados con OH-2.2. Además, la absorción directa de siRNA marcado con

FITC en las células tumorales *in vivo* apunta a efectos antitumorales directos de 3p-2.2 aparte de la inmunoestimulación.

Ejemplo 16. Mecanismos responsables de la reducción de la metástasis de melanoma B16 por 3p-2.2

5 Para investigar adicionalmente los mecanismos responsables de la reducción de las metástasis de melanoma B16 *in vivo*, se enfrentaron ratones naturales, ratones deficientes en TLR7 y ratones deficientes en IFNAR (receptor de IFN tipo I) por vía intravenosa con células B16 y se trataron estos ratones con poliA, 3p-2.2 o poli(I:C). Se observó reducción de las metástasis de melanoma B16 por 3p-2.2 en los ratones deficientes en TLR7 en un grado comparable a los ratones de control naturales (Fig. 22a, b). En contraste, la actividad antitumoral de 3p-2.2 disminuyó en los ratones deficientes en IFNAR (Fig. 22c), lo que da a entender una participación significativa de los IFN tipo I en la respuesta antitumoral mediada por 3p-2.2.

10 A continuación, se examinó el papel de las células NK y de las células T CD8 en la respuesta antitumoral inducida por 3p-2.2. La reducción de metástasis mediada por 3p-2.2 se anulaba cuando las células NK se redujeron utilizando TMβ1-mAb (Fig. 22d). Por lo tanto, la depresión de tumores mediada por 3p-2.2 se basa en gran medida en las células NK efectoras. En contraste, el número de metástasis pulmonares no cambió significativamente por el tratamiento de los ratones con mAb anti-CD8 (mAb RmCD8-2), lo que sugiere que la depresión tumoral mediada por las células T CD8+ es mínima en este modelo.

15 Para evaluar la actividad antitumoral directa de 3p-2.2 *in vivo*, se analizó la expresión de Bcl-2 en metástasis de pulmón de ratones deficientes en IFNAR mediante análisis por FACS y se realizaron tinciones TUNEL en los pulmones de los ratones que habían sido tratados con 3p-2.2, CpG y poliA. Como se ve en la Figura 22e, el tratamiento con 3p-2.2, pero no con poli(I:C), dio lugar a una regulación por disminución no significativa de la expresión de Bcl-2 en la metástasis de melanoma B16. Además, 3p-2.2, pero no poliA, y en menor medida CpG, condujeron a una considerable cantidad de apoptosis entre las células tumorales (Fig. 23).

20 Tomadas en conjunto, estas observaciones indican que el 3p-2.2 reduce las metástasis pulmonares de una manera dependiente de las células NK y dependiente de IFNAR. Además, la regulación por disminución de Bcl-2 inducida por 3p-2.2 y el aumento de las células tumorales apoptóticas en metástasis de pulmón también apuntan a efectos antitumorales directos de 3p-2.2 *in vivo*.

Ejemplo 17. Inhibición de la replicación del HBV por estimulación de RIG-I con RNA 5'-trifosfatado *in vitro* e *in vivo*

30 Se demuestra aquí que los 3p-siRNAs de 24 nucleótidos de longitud (Tabla 5) indujeron una respuesta anti-IFN-α vírico por medio del reconocimiento por RIG-I, lo que lleva a una reducción de los marcadores de replicación específicos de HBV *in vitro* e *in vivo*.

Tabla 5

SEQ. ID. No.	Nombre	Posición	Secuencia
181	HBV 1.1	3103-3125 (conservado)	sentido 5'-UUUCACCUCUGCCUAAUCA UU-3'
182			antisentido 3'-UU AAAGUGGAGACGGAAUAGU-5'
183			cDNA TT TTTCACCTCTGCCTAATCA TC
184	HBV 1.2	2971-2993 (no conservado)	sentido 5'-CGACCUUGAGGCAUACUUC UU-3'
185			antisentido 3'-UU GCUGGAACUCCGUAUGAAG-5'
186			cDNA AC CGACCTTGAGGCATACTTC AA
187	HBV 1.3	2239-2261 (no conservado)	sentido 5'-CUAUUAACAGGCCUUAUGA UU-3'
188			antisentido 3'-UU GAUAAUUGUCCGGAUACU
189			cDNA TC CTATTAACAGGCCTATTGA TG
190		2326-2348 (no conservado)	sentido 5'-CUGCGUUGAUGCCUUUGUA UU-3'
191			antisentido 3'-UU GACGCAACUACGGAACAUC-5'
192			cDNA TC CTGCGTTGATGCCTTTGTA TG
193	HCV control		sentido 5'-CUGAUAGGGUGCUUGCGAGUUC-3'
194			antisentido 3'-GACUAUCCCACGAACGCUCAAG-5'

35 Se transfectaron 120 nM de los 3p-siRNAs a células HepG2-H1.3 y a hepatocitos humanos primarios que permiten la replicación de HBV 3 días después de la infección de HBV a una MOI de 100. Los efectos de los 3p-siRNAs sobre los marcadores de replicación de HBV se analizaron los días 3 y 6 después de la transfección en comparación con células no tratadas.

En las células HepG2-H1.3 infectadas, se indujo la expresión de IFN tipo I y de 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (2'-5'-OAS) el día 3 post-transfección. La progenie de HBV disminuyó más del 95 % el día 6 post-transfección. Los niveles

de HBeAg se redujeron en aproximadamente un 40 %, los niveles de HBsAg en aproximadamente un 50 %. Se obtuvieron los mismos resultados con hepatocitos humanos infectados con HBV.

5 Cuando se inyectó 3p-siRNA intravenosamente a ratones transgénicos HBV1.3 (proporcionados por H Schaller, Heidelberg, Germany), los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) se mantuvieron en el intervalo normal, lo que refleja la ausencia de citotoxicidad de los ligandos de RIG-I. Se indujeron fuertemente INF- α y 2'-5'-OAS después de 3 h, lo que representó muy probablemente una reducción del 60 % del RNA de HBV el día 6 en comparación con los ratones tratados de forma simulada. La viremia de HBV y los niveles de HBeAg fueron aproximadamente 50 %, y los niveles de HBsAg se redujeron aproximadamente un 15 % el día 6.

10 Tomados en conjunto, la activación de la RNA helicasa RIG-I con oligonucleótidos de RNA que llevan 5' trifosfato tiene profundos efectos antivíricos sobre el HBV. Preferiblemente, se pueden diseñar siRNA, shRNA o RNA antisentido para dirigirse a la región del genoma HBV que abarca los nucleótidos 2656-3182 para ser utilizados como un agente antivírico. Alternativamente, se pueden dirigir a los nucleótidos 1272-3183 del genoma de HBV.

Ejemplo 18. El contenido de inosina aumenta la actividad de RNA 5' trifosfato

15 La inosina es un nucleósido, que está compuesto de hipoxantina y ribosa. En ciertas circunstancias, la inosina está presente en el RNA en lugar de la adenosina. La ADAR (adenosina desaminasa que actúa sobre RNA) desamina la adenosina a inosina (Palladino MJ *et al.* (2000) Cell 102(4): 437-49). Una importante función de la ADAR es la modificación postranscripcional del mRNA (Gerber AP and Keller W (2001) Trends Biochem Sci 26(6): 376-84). Además de en el citoplasma, la adenosina es desaminada por ADAR en el dsRNA para convertirse en inosina (Bass BL and Weintraub H (1988) Cell 55(6): 1089-98). En el caso de dsRNA vírico, las adeninas pueden ser reemplazadas por inosina, dando como resultado los pares de bases I:U e I:C.

20 Con el fin de analizar la contribución del contenido de inosina a la actividad inductora de IFN- α del RNA 5' trifosfato, se prepararon dos fragmentos diferentes de dsRNA (A y B, ambos derivados de virus Taylor, plásmido pEL39: fragmento A posiciones 4473 a 5006 y 4499 a 5034; fragmento B posiciones 10953 a 519 y 26 a 548) por transcripción *in vitro*. Para este fin, 60 % del contenido de guanosina fue reemplazado por inosina durante la transcripción *in vitro*. Los monocitos humanos producen IFN- α solamente tras la estimulación de los receptores citosólicos pero no de los TLR. Se transfectaron con dsRNA monocitos humanos primarios purificados. Después de 18 horas, se determinó el IFN- α en los sobrenadantes mediante ELISA. Se encontró que la presencia de inosina aumentaba la actividad de ambos fragmentos A y B para inducir el IFN- α en los monocitos humanos (Fig. 24A). Con la inosina, la actividad de ambos fragmentos A y B era más alta que la actividad de poli(I:C).

30 Para los fragmentos de dsRNA de 500 pares de bases, es de esperar que tanto RIG-I como MDA-5 contribuyan a la actividad biológica. Por lo tanto se ha probado la actividad inductora de IFN- α de fragmentos de RNA de cadena doble en células dendríticas de la médula ósea de ratones MDA-5 $^{-/-}$. En las células dendríticas derivadas de ratones MDA-5 $^{-/-}$, la actividad inductora de IFN- α se incrementó más de 4 veces cuando el 60 % de las guanosinas fueron reemplazadas por inosina (Figura 24B). Estos datos proporcionan pruebas claras de que la actividad de estimulación de RIG-I de RNA 5' trifosfato se aumenta fuertemente si el RNA contiene inosina.

Ejemplo 19. El RNA de cadena sencilla que lleva 5' trifosfato no es capaz de inducir la producción de IFN- α , se requiere el de cadena doble.

40 En el RNA generado por transcripción *in vitro*, la longitud y composición de las bases en el extremo 3' no están definidas químicamente. En particular, el extremo 3' se puede plegar hacia atrás y permitir que la polimerasa genere un RNA parcialmente de cadena doble. Con el fin de analizar la contribución del extremo 3' y definir exactamente la contribución de RNA de cadena doble a la actividad inductora de IFN- α del RNA 5' trifosfato, se prepararon RNA 5' trifosfato sintéticos (Tabla 6) como está descrito (Ludwig J (1981) Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung. 16: 131-3). Mediante el uso de tales RNA 5' trifosfato sintéticos, se excluye el alargamiento incontrolado del extremo 3' que da como resultado la formación de la cadena doble.

45 Tabla 6: Oligonucleótidos de RNA de cadena sencilla sintetizados químicamente

3P-A:	A (AC) ₁₀ -UUU	(extremo 5': sólo trifosfato) (SEQ ID No. 195)
(1-3)P-A:	A(AC) ₁₀ -UUU	(extremo 5': predominantemente trifosfato) (SEQ ID No. 196)
(1-3)P-U:	U(AC) ₁₀ -UUU	(extremo 5': predominantemente trifosfato) (SEQ ID No. 197)
(1-3)P-G:	G(AC) ₁₀ -UUU	(extremo 5': predominantemente trifosfato) (SEQ ID No. 198)
50 (1-3)P-C:	C(AC) ₁₀ -UUU	(extremo 5': predominantemente trifosfato) (SEQ ID No. 199)
HO-G:	G(AC) ₁₀ -UUU	(extremo 5': OH) (SEQ ID No. 200)
As:	AAA(GU) ₁₀	(extremo 5': OH) (SEQ ID No. 201)

55 El isRNA9.2 (Hornung V *et al.* (2005) Nat Med 11 (3): 263-70) generado por transcripción *in vitro* se utilizó como control positivo (IVT2-3PRNA). CpG2331 es un ligando de TLR9. Se transfectaron PBMC (400.000 células por pocillo) con oligonucleótidos utilizando lipofectamina (0,5 μ l, 0,2 μ g de oligonucleótido). La hibridación de cadenas

complementarias se realizó calentando 4 µg de RNA total en 20 µl de tampón (al final Tris/HCl 50 mM pH 7,5 NaCl 100 mM) hasta 70 °C seguido de enfriamiento a 40 °C. Se utilizó cloroquina para bloquear el reconocimiento de ácido nucleico mediado por TLR (2,5 µg/ml). Después de 24 horas, se midió el IFN-α (hIFN-α) en los sobrenadantes mediante ELISA.

5 Ninguno de los oligonucleótidos de RNA de cadena sencilla sintetizados químicamente, solamente la secuencia de control transcrita *in vitro* (IVT2-3PRNA), indujo el IFN-α en las PBMC. Sin embargo, cuando se hibridaron con la cadena antisentido correspondiente, todos los oligonucleótidos indujeron IFN-α (Fig. 25). La inducción más fuerte de IFN-α se observó para 3P-A/AS. La misma secuencia en la que la mayor parte pero no todos los oligonucleótidos contenían un grupo trifosfato en el extremo 5' mostró menor actividad. De las cuatro bases posibles en el extremo 5',
 10 la más alta actividad inductora de IFN-α fue vista cuando había una A en el extremo 5', seguida de C, U y G (Fig. 25). El control sin 5' trifosfato (HO-G/AS) no indujo IFN-α. El ligando de TLR9 CpG2331 también indujo IFN-α que era sensible a la cloroquina. La actividad de los oligonucleótidos 5' trifosfato no se redujo por la cloroquina, lo que confirma que la inducción de IFN-α era independiente de los TLR.

15 Estos resultados demuestran que es necesaria la presencia de la cadena antisentido para la actividad inductora de IFN-α de un RNA 5' trifosfato. Cuando se utiliza la transcripción *in vitro* para la generación de oligonucleótidos de RNA 5' trifosfato, no se requiere la adición de una cadena antisentido probablemente debido a la presencia de la estructura de cadena doble en el extremo 3'. Por lo tanto, se puede generar un ligando de RIG-I activo mediante transcripción *in vitro* donde tanto los de cadena "sencilla" como los de cadena doble son activos, o mediante el uso
 20 de un método completamente sintético para generar un RNA 5' trifosfato de cadena sencilla, junto con la cadena complementaria que puede ser sintética o no sintética y que no necesita contener un extremo 5' trifosfato.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Hartmann, Gunther
- 5 <120> Estructura y uso de oligonucleótidos 5' fosfato
- <130> PCT45681FZ121pau
- 10 <150> aún no asignado
<151> adjunto
- <150> EP 06 021 271.9
<151> 10-10- 2006
- 15 <150> EP 06 016 578.4
<151> 08-08-2006
- <160> 204
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 35
<212> DNA
- 25 <213> Artificial
- <220>
<223> Moldes de transcripción *in vitro*
- 30 <400> 1
cagtaatcg actcactatt aaaaagggga cacac 35
- <210> 2
<211> 35
<212> DNA
- 35 <213> Artificial
- <220>
<223> Moldes de transcripción *in vitro*
- 40 <400> 2
cagtaatcg actcactatt aaacagggga cacac 35
- <210> 3
<211> 35
<212> DNA
- 45 <213> Artificial
- <220>
<223> Moldes de transcripción *in vitro*
- 50 <400> 3
cagtaatcg actcactatt aaagagggga cacac 35
- <210> 4
<211> 35
<212> DNA
- 55 <213> Artificial
- 60 <220>
<223> Moldes de transcripción *in vitro*
- <400> 4

	cagtaatacg actcactatt aaatagggga cacac	35
	<210> 5	
	<211> 35	
	<212> DNA	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
10	<400> 5	
	cagtaatacg actcactatt aacaagggga cacac	35
	<210> 6	
	<211> 35	
15	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
20	<400> 6	
	cagtaatacg actcactatt aaccagggga cacac	35
	<210> 7	
25	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 7	
	cagtaatacg actcactatt aacgagggga cacac	35
35	<210> 8	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 8	
45	cagtaatacg actcactatt aactagggga cacac	35
	<210> 9	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 9	
55	cagtaatacg actcactatt aagaagggga cacac	35
	<210> 10	
	<211> 35	
	<212> DNA	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
65	<400> 10	
	cagtaatacg actcactatt aagcagggga cacac	35

5	<210> 11 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
10	<400> 11 cagtaatcg actcactatt aaggaggga cacac	35
15	<210> 12 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 12 cagtaatcg actcactatt aagtaggga cacac	35
25	<210> 13 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial	
30	<220> <223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 13 cagtaatcg actcactatt aataaggga cacac	35
35	<210> 14 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial	
40	<220> <223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
45	<400> 14 cagtaatcg actcactatt aatcaggga cacac	35
50	<210> 15 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 15 cagtaatcg actcactatt aatgaggga cacac	35
55	<210> 16 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial	
60	<220> <223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 16 cagtaatcg actcactatt aataggga cacac	35
65	<210> 17 <211> 35	

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 17
 cagtaatacg actcactatt acaaagggga cacac 35

 10 <210> 18
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 18
 20 cagtaatacg actcactatt acacagggga cacac 35

 <210> 19
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 19
 30 cagtaatacg actcactatt acagagggga cacac 35

 <210> 20
 <211> 35
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 20
 40 cagtaatacg actcactatt acatagggga cacac 35

 <210> 21
 <211> 35
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*
 50
 <400> 21
 cagtaatacg actcactatt accaagggga cacac 35

 <210> 22
 55 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 22
 cagtaatacg actcactatt acccagggga cacac 35

 <210> 23
 65 <211> 35

	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 23		
	cagtaatacg actcactatt accgagggga cacac	35	
10	<210> 24		
	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 24		
20	cagtaatacg actcactatt acctagggga cacac	35	
	<210> 25		
	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 25		
30	cagtaatacg actcactatt acgaagggga cacac	35	
	<210> 26		
	<211> 35		
	<212> DNA		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 26		
40	cagtaatacg actcactatt acgcagggga cacac	35	
	<210> 27		
	<211> 35		
45	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
50	<400> 27		
	cagtaatacg actcactatt acggagggga cacac	35	
	<210> 28		
55	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 28		
	cagtaatacg actcactatt acgtagggga cacac	35	
65	<210> 29		
	<211> 35		

	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 29		
	cagtaatacg actcactatt actaagggga cacac	35	
10	<210> 30		
	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 30		
20	cagtaatacg actcactatt actcagggga cacac	35	
	<210> 31		
	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 31		
30	cagtaatacg actcactatt actgagggga cacac	35	
	<210> 32		
	<211> 35		
	<212> DNA		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 32		
40	cagtaatacg actcactatt acttagggga cacac	35	
	<210> 33		
	<211> 35		
45	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
50	<400> 33		
	cagtaatacg actcactatt agaaagggga cacac	35	
	<210> 34		
55	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>		
	<400> 34		
	cagtaatacg actcactatt agacagggga cacac	35	
65	<210> 35		
	<211> 35		

	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 35	
	cagtaatacg actcactatt agagagggga cacac	35
10	<210> 36	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 36	
20	cagtaatacg actcactatt agatagggga cacac	35
	<210> 37	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 37	
30	cagtaatacg actcactatt agcaagggga cacac	35
	<210> 38	
	<211> 35	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 38	
40	cagtaatacg actcactatt agccagggga cacac	35
	<210> 39	
	<211> 35	
45	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
50	<400> 39	
	cagtaatacg actcactatt agcgagggga cacac	35
	<210> 40	
55	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 40	
	cagtaatacg actcactatt agctagggga cacac	35
65	<210> 41	
	<211> 35	

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 41
 cagtaatacg actcactatt aggaagggga cacac 35

 10 <210> 42
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 42
 20 cagtaatacg actcactatt aggcagggga cacac 35

 <210> 43
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 43
 30 cagtaatacg actcactatt agggagggga cacac 35

 <210> 44
 <211> 35
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 44
 40 cagtaatacg actcactatt aggtagggga cacac 35

 <210> 45
 <211> 35
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*
 50
 <400> 45
 cagtaatacg actcactatt agtaagggga cacac 35

 <210> 46
 55 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 46
 cagtaatacg actcactatt agtcagggga cacac 35

 65 <210> 47
 <211> 35

	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 47	
	cagtaatacg actcactatt agtgagggga cacac	35
10	<210> 48	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 48	
20	cagtaatacg actcactatt agttagggga cacac	35
	<210> 49	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 49	
30	cagtaatacg actcactatt ataaagggga cacac	35
	<210> 50	
	<211> 35	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 50	
40	cagtaatacg actcactatt atacagggga cacac	35
	<210> 51	
	<211> 35	
45	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
50	<400> 51	
	cagtaatacg actcactatt atagagggga cacac	35
	<210> 52	
55	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 52	
	cagtaatacg actcactatt atatagggga cacac	35
65	<210> 53	
	<211> 35	

	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 53	
	cagtaatacg actcactatt atcaagggga cacac	35
10	<210> 54	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 54	
20	cagtaatacg actcactatt atccagggga cacac	35
	<210> 55	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 55	
30	cagtaatacg actcactatt atcgagggga cacac	35
	<210> 56	
	<211> 35	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 56	
40	cagtaatacg actcactatt atctagggga cacac	35
	<210> 57	
	<211> 35	
45	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
50	<400> 57	
	cagtaatacg actcactatt atgaagggga cacac	35
	<210> 58	
55	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 58	
	cagtaatacg actcactatt atgcagggga cacac	35
65	<210> 59	
	<211> 35	

	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 59	
	cagtaatacg actcactatt atggagggga cacac	35
10	<210> 60	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 60	
20	cagtaatacg actcactatt atgtagggga cacac	35
	<210> 61	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 61	
30	cagtaatacg actcactatt attaagggga cacac	35
	<210> 62	
	<211> 35	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 62	
40	cagtaatacg actcactatt attcagggga cacac	35
	<210> 63	
	<211> 35	
45	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
50	<400> 63	
	cagtaatacg actcactatt atggagggga cacac	35
	<210> 64	
55	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Moldes de transcripción <i>in vitro</i>	
	<400> 64	
	cagtaatacg actcactatt atttagggga cacac	35
65	<210> 65	
	<211> 26	

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 65
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtcccc 26

 10 <210> 66
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 66
 20 tatagttcca caaaggcatc tatagtgagt cg 32

 <210> 67
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 67
 30 atgcctttgt ggaactatac tatagtgagt cg 32

 <210> 68
 <211> 32
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 68
 40 tcaaacagag gtcgcatgcc tatagtgagt cg 32

 <210> 69
 <211> 32
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*
 50
 <400> 69
 gcatgcgacc tctgtttgac tatagtgagt cg 32

 <210> 70
 55 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 70
 ttttttttt ttccccccc ccctatagtg agtcg 35

 65 <210> 71
 <211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 71
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa acctgtctc 29

 10 <210> 72
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 72
 20 aaagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtctatagt gagtcgta 38

 <210> 73
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 73
 30 aaatgtgtgt ggtgtgtgtgt gcctgtctc 29

 <210> 74
 <211> 38
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 74
 40 aagatgaact tcagggtcag ccctatagt gagtcgta 38

 <210> 75
 <211> 38
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*
 50
 <400> 75
 aagctgacct tgaagttcat ccctatagt gagtcgta 38

 <210> 76
 <211> 43
 55 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 76
 aagctgacct tgaagttcat ctgcaccact atagtgagtc gta 43

 <210> 77
 <211> 41
 65

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 77
 aagctgaccc tgaagttcat ctgcacctat agtgagtcgt a 41

 10 <210> 78
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 78
 20 aagtggtgca gatgaactc aggtcagct atagtgagtc gta 43

 <210> 79
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 79
 30 agtgagcgca acgcaatta 19

 <210> 80
 <211> 33
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 80
 40 attgaaggac aggttaagct atagtgagtc gta 33

 <210> 81
 <211> 29
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*
 50
 <400> 81
 caccgcggtg gagctccaat tcgccctat 29

 <210> 82
 55 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 82
 cagtaatacg actcactata ggggaagcgg gca 33

 65 <210> 83
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 83
 cagtaatacg actcactatt a 21

 10 <210> 84
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 84
 20 cagtaatacg actcactatt aggaagcgg gca 33

 <210> 85
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 85
 30 ccccccccc ccccccccc cctgtctc 29

 <210> 86
 <211> 19
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 86
 40 cctcgaggtc gacgtatc 19

 <210> 87
 <211> 22
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*
 50
 <400> 87
 cggataacaa ttcacacag ga 22

 <210> 88
 55 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 88
 cgggggatcc actagtct 19

 <210> 89
 65 <211> 41

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 89
 ggaagctga ccctgaagtt catcccctat agtgagtcgt a 41

 10 <210> 90
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 90
 20 ggaagtcca tcccctatag tgagtcgta 29

 <210> 91
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 91
 30 ggaccctga agttcatccc ctatagtgag tcgta 35

 <210> 92
 <211> 23
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 92
 40 gggatcccct atagtgagtc gta 23

 <210> 93
 <211> 32
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*
 50
 <400> 93
 gggctgaagt tcatccccta tagtgagtcg ta 32

 <210> 94
 55 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 94
 gggctgacct tgaagttcat ccctatagt gagtcgta 38

 <210> 95
 65 <211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 95
 gggggggggg gggggggggg gcctgtctc 29

 10 <210> 96
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 96
 20 gggttcatcc cctatagta gtcgta 26

 <210> 97
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 97
 30 ggtaattgaa ggacaggta atagtgagtc g 31

 <210> 98
 <211> 39
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 98
 40 ggtgcagatg aacttcaggg tcagcttaat agtgagtcg 39

 <210> 99
 <211> 17
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*
 50
 <400> 99
 taatacgact cactata 17

 <210> 100
 55 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 100
 tgatcggcta tggctggccg catgcccgcct tcc 33

 65 <210> 101
 <211> 31

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 101
 ttgaaggaca ggtaagcta atagtgagtc g 31

 10 <210> 102
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 102
 20 tttttttt tttttttt tctgtctc 29

 <210> 103
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 103
 30 augccuuugu ggaacuaua 19

 <210> 104
 <211> 19
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 104
 40 uauaguucca caaaggcau 19

 <210> 105
 <211> 19
 45 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*
 50
 <400> 105
 gcaugcgacc ucuguuuga 19

 <210> 106
 55 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 106
 ucaaacagag gucgcaugc 19

 <210> 107
 65 <211> 19

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 107
 ggauGacUGa GUaccUGaa 19

 10 <210> 108
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 108
 20 uucagguacu cagucaucc 19

 <210> 109
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 109
 30 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 19

 <210> 110
 <211> 19
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 110
 40 agcuuaaccu guccuucaa 19

 <210> 111
 <211> 30
 45 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 50
 <400> 111
 agggggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 112
 55 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> oligonucleótido

 <400> 112
 aauagggggac acacacacac acacacacac 30

 65 <210> 113
 <211> 30

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 113
 agauggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 114
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 114
 20 agagggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 115
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 115
 30 agcgggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 116
 <211> 30
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 116
 40 agacggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 117
 <211> 30
 <212> RNA
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 50
 <400> 117
 acuaggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 118
 <211> 30
 <212> RNA
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 60
 <400> 118
 acuuggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 119
 <211> 30
 65

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 119
 aauuggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 120
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 120
 20 agcuggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 121
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 121
 30 aaaaggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 122
 <211> 30
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 122
 40 accgggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 123
 <211> 30
 45 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 50
 <400> 123
 auagggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 124
 <211> 30
 55 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> oligonucleótido

 <400> 124
 accuggggac acacacacac acacacacac 30

 65 <210> 125
 <211> 30

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 125
 acguggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 126
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 126
 20 accaggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 127
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 127
 30 auaaggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 128
 <211> 30
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 128
 40 agccggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 129
 <211> 30
 45 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 50
 <400> 129
 auauggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 130
 <211> 30
 55 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> oligonucleótido

 <400> 130
 acccggggac acacacacac acacacacac 30

 65 <210> 131
 <211> 30

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 131
 agcgggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 132
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 132
 20 aaucgggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 133
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 133
 30 aucugggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 134
 <211> 30
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 134
 40 aagagggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 135
 <211> 30
 <212> RNA
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 50
 <400> 135
 acacgggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 136
 <211> 30
 <212> RNA
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 60
 <400> 136
 aauggggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 137
 <211> 30
 65

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 137
 acucggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 138
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 138
 20 auuuggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 139
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 139
 30 auacggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 140
 <211> 30
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 140
 40 agucggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 141
 <211> 30
 45 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 50
 <400> 141
 auccggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 142
 <211> 30
 55 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> oligonucleótido

 <400> 142
 acaaggggac acacacacac acacacacac 30

 65 <210> 143
 <211> 30

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 143
 agugggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 144
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 144
 20 auucgggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 145
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 145
 30 acgggggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 146
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 146
 40 aaaugggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 147
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 147
 50 acgcgggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 148
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 148
 60 acaugggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 149
 <211> 30
 65

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 149
 aaggggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 150
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 150
 20 acaggggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 151
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 151
 30 acgaggggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 152
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 152
 40 acugggggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 153
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 153
 50 augugggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 154
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 154
 60 aaacgggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 155
 <211> 30
 65

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 155
 aggggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 156
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 156
 20 aaccggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 157
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 157
 30 aagcggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 158
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 158
 40 aguaggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 159
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 159
 50 augcggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 160
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 160
 60 aucaggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 161
 <211> 30
 65

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 161
 aggaggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 162
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 162
 20 aucgggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 163
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 163
 30 aacuggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 164
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 164
 40 agcaggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 165
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido
 50
 <400> 165
 agaaggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 166
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido
 60
 <400> 166
 aacaggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 167
 <211> 30
 65

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 167
 auugggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 168
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 168
 20 aguugggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 169
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 169
 30 augagggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 170
 <211> 30
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 170
 40 aacggggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 171
 <211> 30
 45 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 50
 <400> 171
 auuagggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 172
 <211> 30
 55 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> oligonucleótido

 <400> 172
 augggggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 173
 <211> 30
 65

<212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 173
 aaagggggac acacacacac acacacacac 30

 10 <210> 174
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 174
 20 aaguggggac acacacacac acacacacac 30

 <210> 175
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido SiRNA

 <400> 175
 30 gaagcgucuu cuaauaauu 19

 <210> 176
 <211> 19
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido SiRNA

 <400> 176
 40 aauuauuaga agacgcuuc 19

 <210> 177
 <211> 19
 <212> RNA
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido SiRNA
 50
 <400> 177
 uucuccgaac gugucacgu 19

 <210> 178
 <211> 19
 <212> RNA
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido SiRNA
 60
 <400> 178
 acgugacacg uucggagaa 19

 <210> 179
 <211> 32
 65

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 179
 gccgccccgc cgcgccccgc tatagtgagt cg 32

 10 <210> 180
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Moldes de transcripción *in vitro*

 <400> 180
 20 gccggggcgcg gcggggcgcc tatagtgagt cg 32

 <210> 181
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> secuencia artificial de HBV 1.1 sentido

 <400> 181
 30 uuucaccucu gccuaaucau u 21

 <210> 182
 <211> 21
 <212> RNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia artificial de HBV 1.1 antisentido

 <400> 182
 40 uuaaagugga gacggauuag u 21

 <210> 183
 <211> 23
 45 <212> DNA
 <213> virus de la Hepatitis B

 <400> 183
 50 tttttcacct ctgcctaatc atc 23

 <210> 184
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> secuencia artificial de HBV 1.2 sentido

 <400> 184
 60 cgaccuugag gcuaucuuc u 21

 <210> 185
 <211> 21
 <212> RNA
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial de HBV 1.2 antisentido

5 <400> 185
 uugcuggaac uccguaugaa g 21

10 <210> 186
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Virus de la Hepatitis B

15 <400> 186
 accgaccttg aggcatactt caa 23

20 <210> 187
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> secuencia artificial de HBV 1.3 sentido

30 <400> 187
 cuauuaacag gccuauugau u 21

35 <210> 188
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> secuencia artificial de HBV 1.3 antisentido

45 <400> 188
 uugauaaug uccggauaac u 21

50 <210> 189
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Virus de la Hepatitis B

55 <400> 189
 tcctattaac aggcctattg atg 23

60 <210> 190
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> sentido

70 <400> 190
 cugcguugau gccuuuguau u 21

75 <210> 191
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

80 <220>
 <223> antisentido

85 <400> 191
 uugacgcaac uacggaaca u 21

<210> 192
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Virus de la Hepatitis B
 5
 <400> 192
 tcctgcgttg atgccttgt atg 23
 <210> 193
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> virus de la Hepatitis C
 10
 <400> 193
 cugauagggg ucuugcgagu uc 22
 <210> 194
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Hepatitis C virus
 20
 <400> 194
 gacuauccca cgaacgcuca ag 22
 <210> 195
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido ssRNA
 <400> 195
 aacacacaca cacacacaca cuuu 24
 <210> 196
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido ssRNA
 <400> 196
 aacacacaca cacacacaca cuuu 24
 <210> 197
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido ssRNA
 <400> 197
 uacacacaca cacacacaca cuuu 24
 <210> 198
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido ssRNA
 <400> 198
 uacacacaca cacacacaca cuuu 24
 <210> 199
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> oligonucleótido ssRNA
 <400> 199
 uacacacaca cacacacaca cuuu 24
 <210> 200
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Artificial
 65
 <220>
 <223> oligonucleótido ssRNA
 <400> 200
 uacacacaca cacacacaca cuuu 24

gacacacaca cacacacaca cuuu 24

5 <210> 199
<211> 24
<212> RNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido ssRNA

15 <400> 199
cacacacaca cacacacaca cuuu 24

20 <210> 200
<211> 24
<212> RNA
<213> Artificial

25 <220>
<223> oligonucleótido ssRNA

30 <400> 200
gacacacaca cacacacaca cuuu 24

35 <210> 201
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial

40 <220>
<223> oligonucleótido ssRNA

45 <400> 201
aaaacacaca cacacacaca cac 23

50 <210> 202
<211> 79
<212> DNA
<213> Artificial

55 <220>
<223> Molde de transcripción *in vitro*

60 <400> 202
acatthttgc ttgcaattg acaatgtctg tttttcttt gatctggttg ttaagcgta 60
tagtgagtcg tattacgcg 79

65 <210> 203
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

70 <220>
<223> Molde de transcripción *in vitro*; cadena correspondiente

75 <400> 203
aattcgcgta atacgactca ctata 25

80 <210> 204
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

85 <220>
<223> cebador directo

<400> 204
ggatcctaatac gactcact atagggcga 29

5

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido capaz de inducir la producción de un IFN tipo I, para uso en la inducción de la apoptosis de células tumorales, por medio de la unión a RIG-I en el tratamiento de un tumor en un animal vertebrado,
- 5 en donde el oligonucleótido comprende al menos 1, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 6 ribonucleótidos en el extremo 5',
- en donde el oligonucleótido comprende un grupo trifosfato en el extremo 5', y en donde el grupo trifosfato está libre de cualquier caperuza o modificación,
- en donde el oligonucleótido es de al menos 21 nucleótidos de longitud, y
- en donde el oligonucleótido es un ligando de RIG-I.
- 10 2. El oligonucleótido para uso de la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido es un siRNA.
3. El oligonucleótido para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende además un agente de complejación.
- 15 4. El oligonucleótido para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el oligonucleótido es para uso en combinación con al menos un agente seleccionado de un agente inmunoestimulante, un agente antivírico, un agente antibacteriano, un agente antitumoral, y/o una terapia antitumoral.
5. El oligonucleótido para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el animal vertebrado es un mamífero, pez anfibio o ave.
6. El oligonucleótido para uso de la reivindicación 5, en donde el mamífero es un ser humano, una rata, ratones, gato, perro, caballo, oveja, ganado, vaca, cerdo, conejo o un primate no humano.
- 20 7. El oligonucleótido para uso de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en donde el mamífero es un ser humano.

A

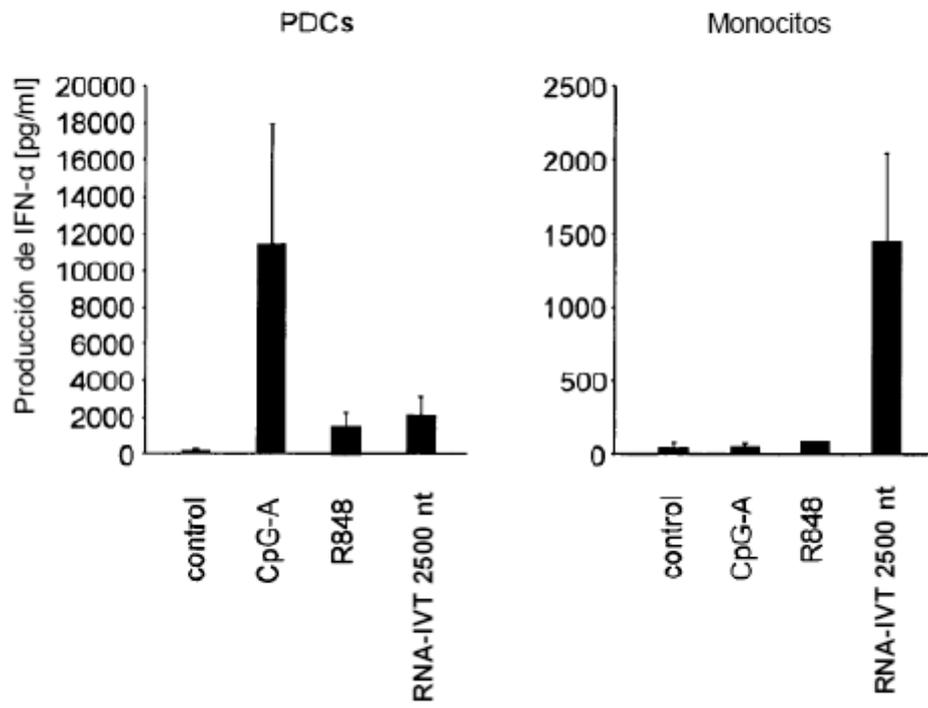


Figura 1

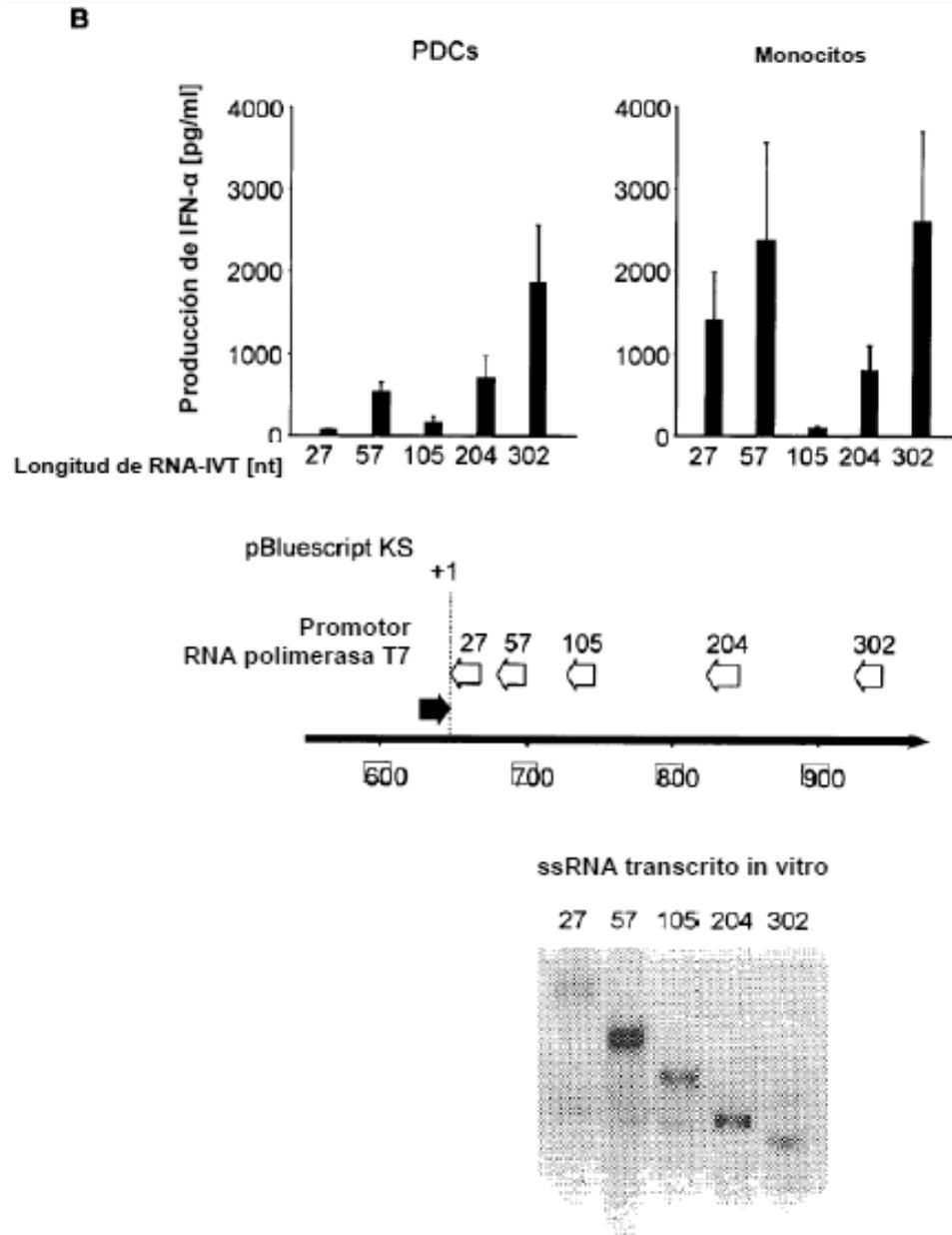


Figura 1

C

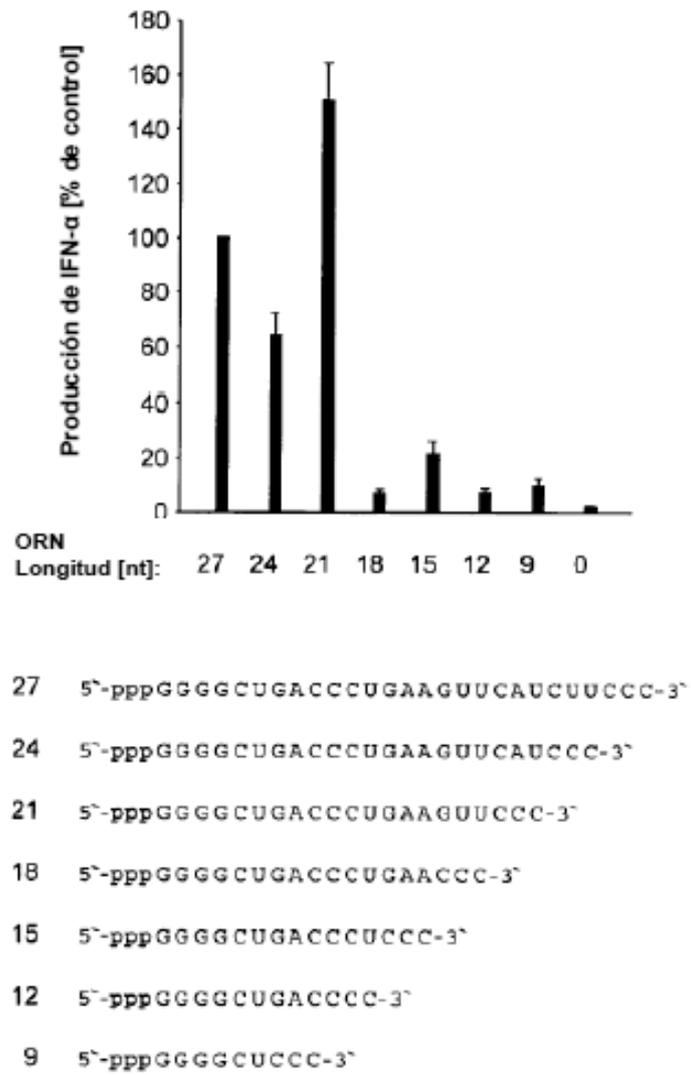


Figura 1

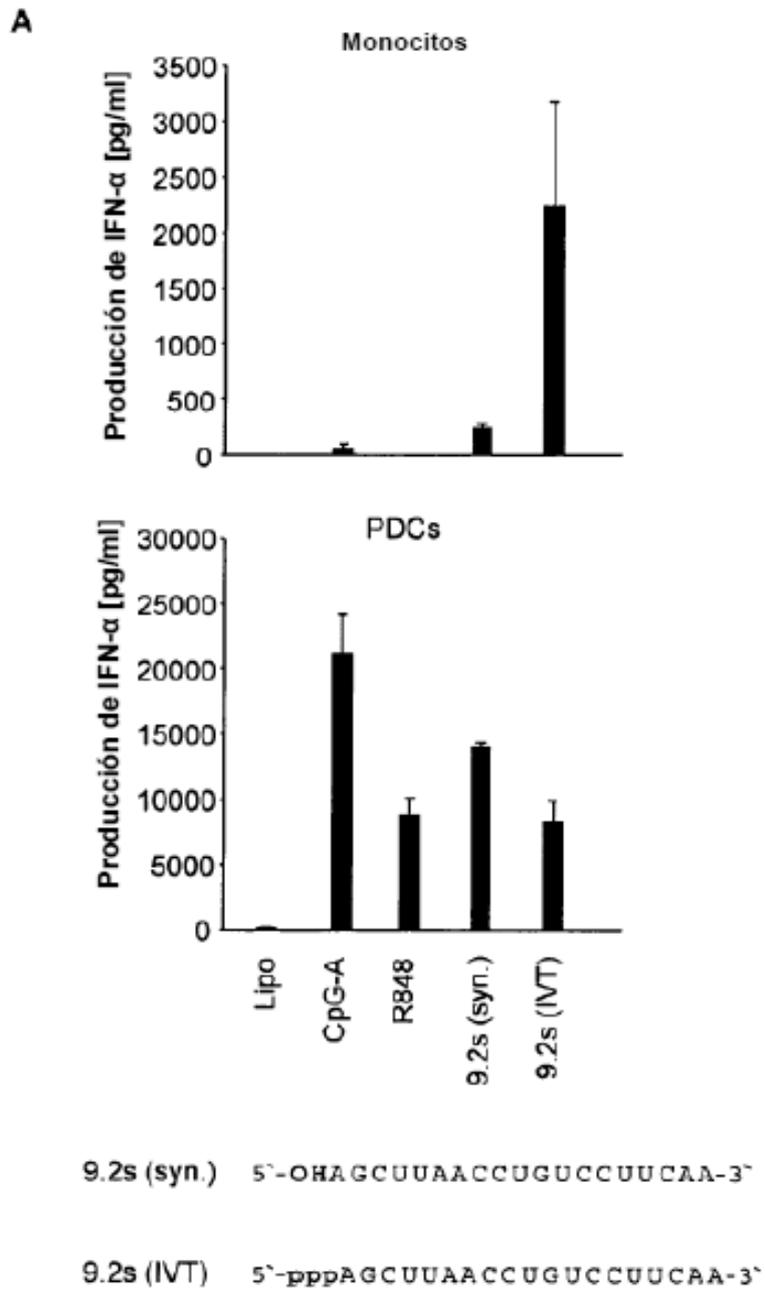


Figura 2

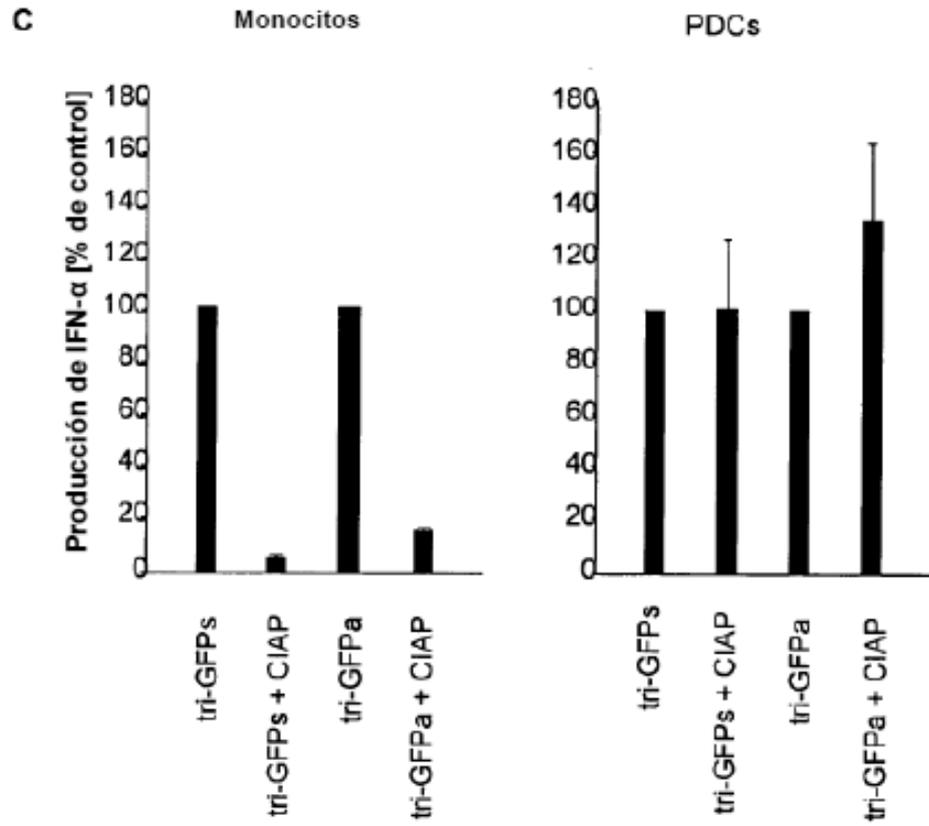


Figura 2

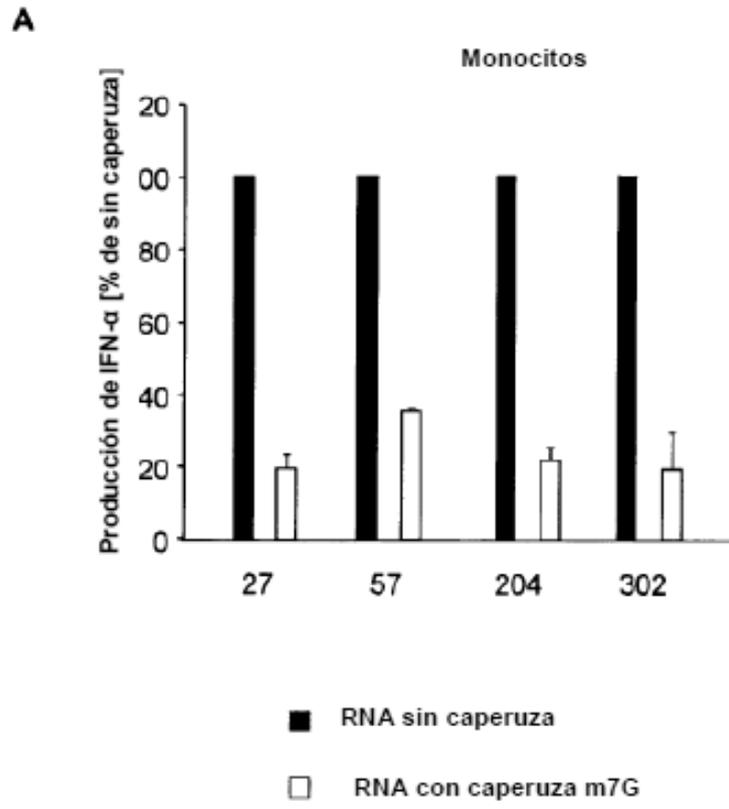


Figura 3

B

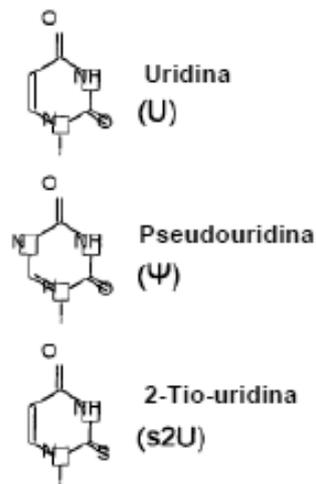
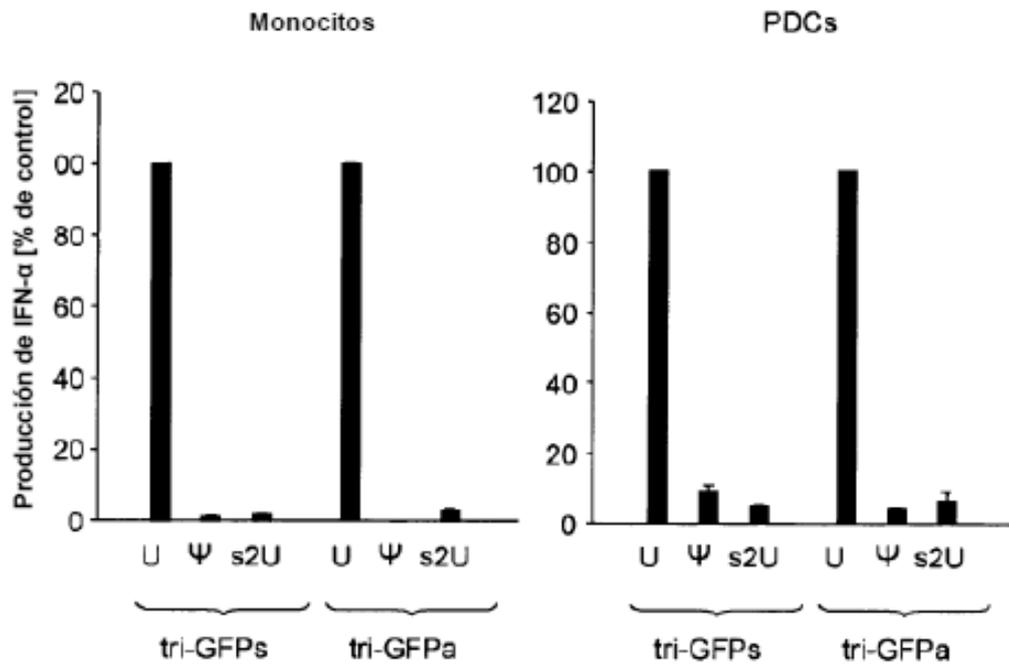


Figura 3

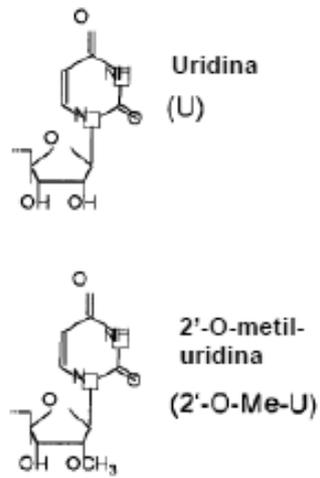
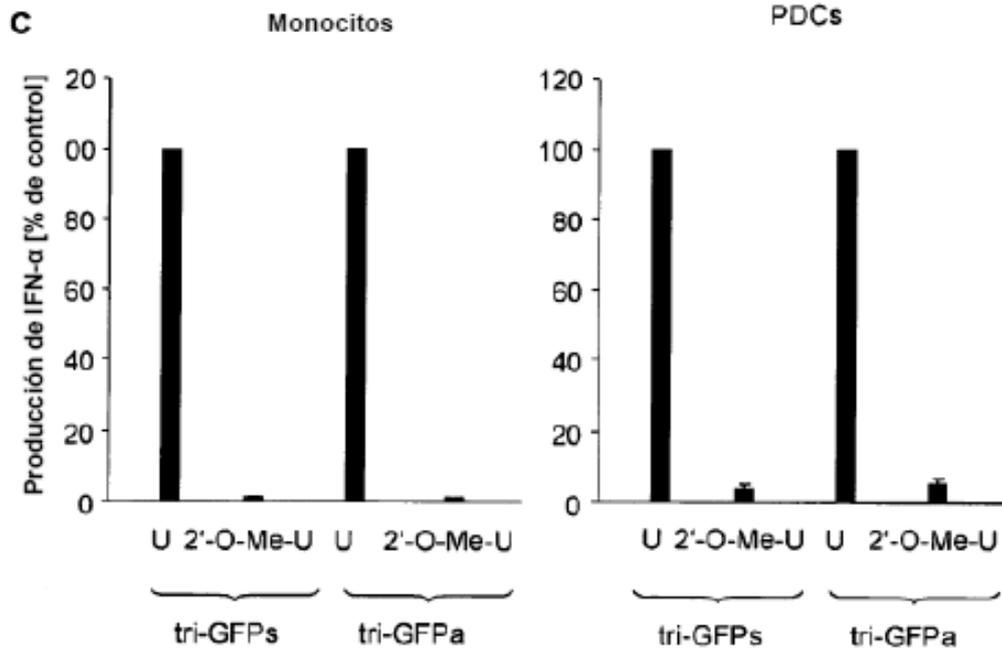


Figura 3

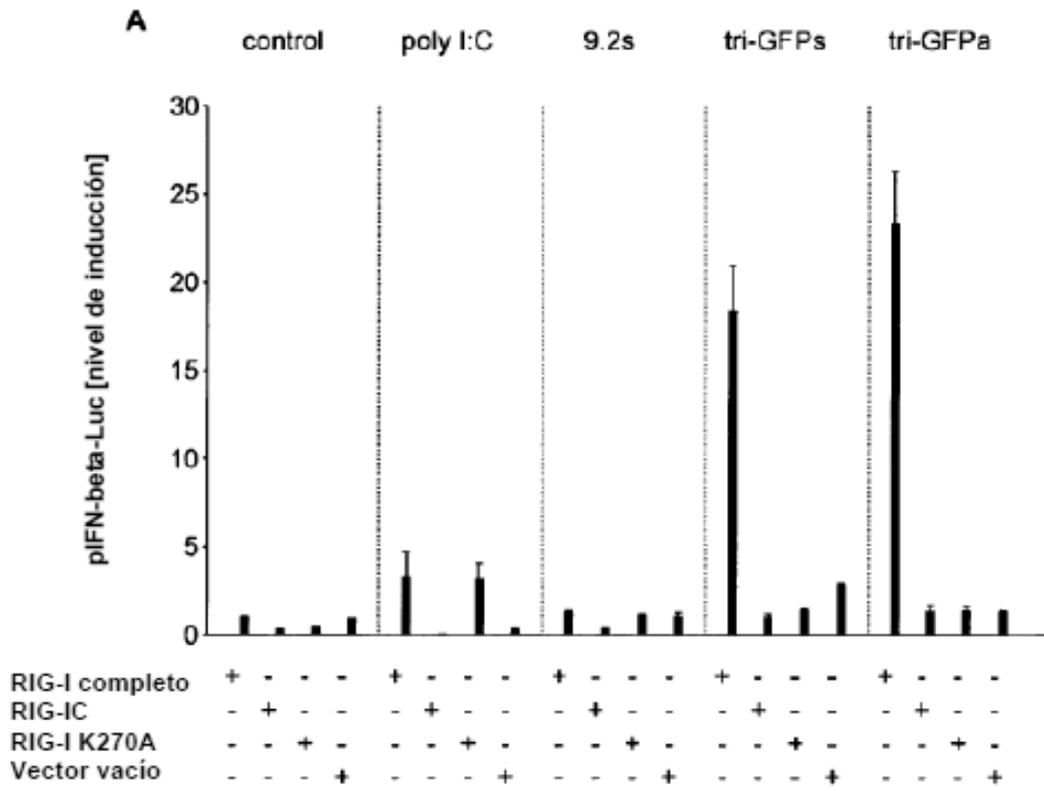


Figura 4

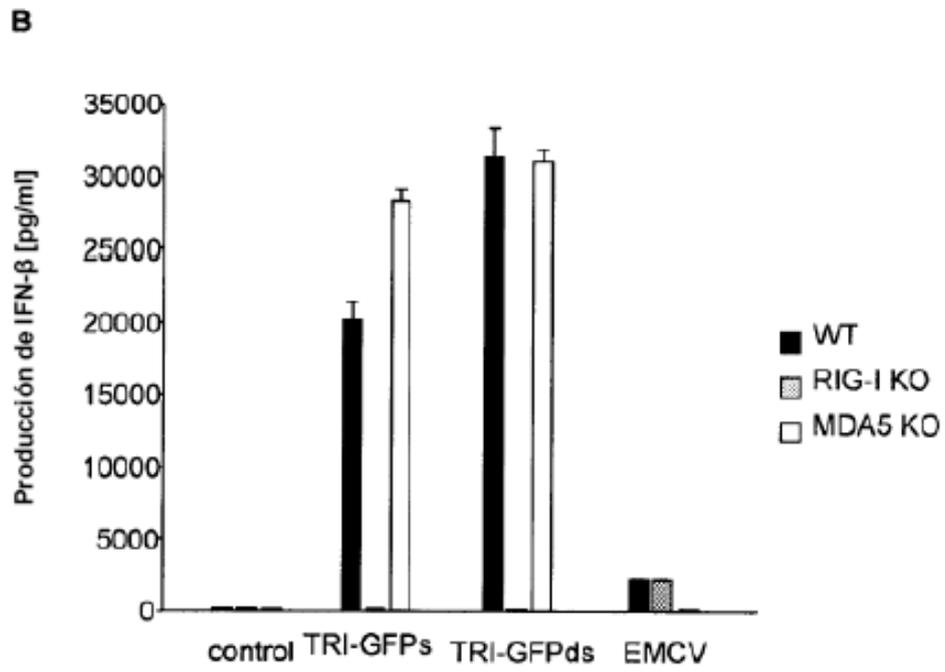


Figura 4

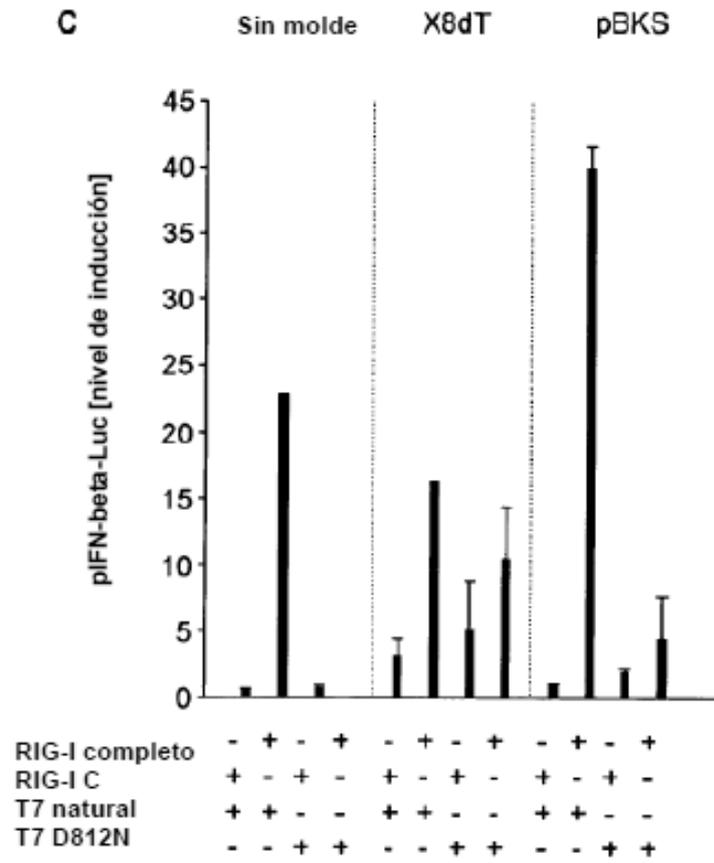


Figura 4

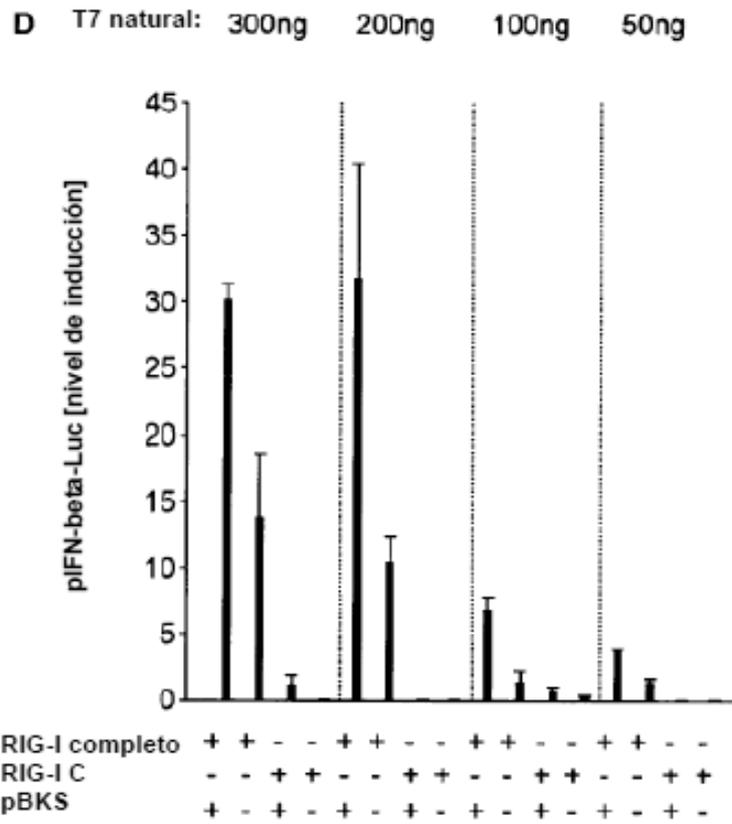


Figura 4

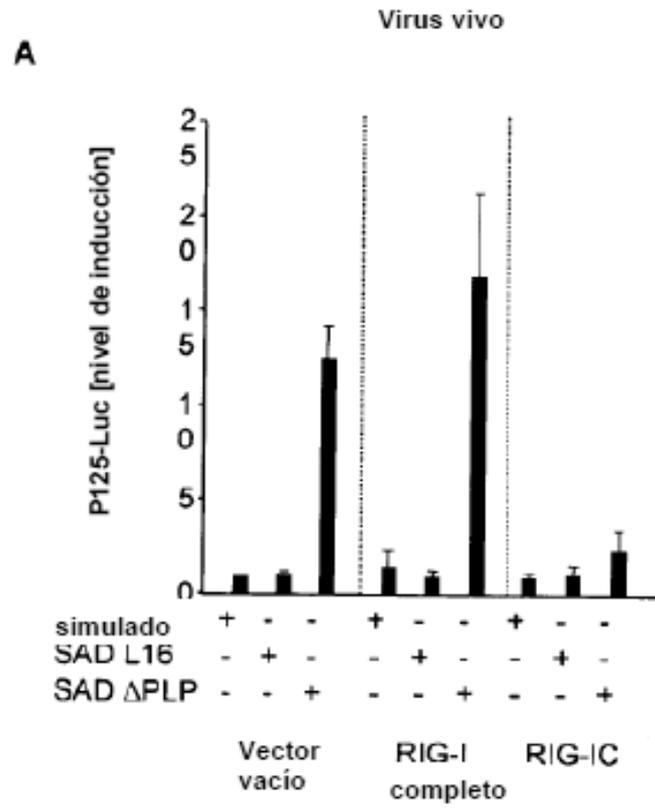


Figura 5

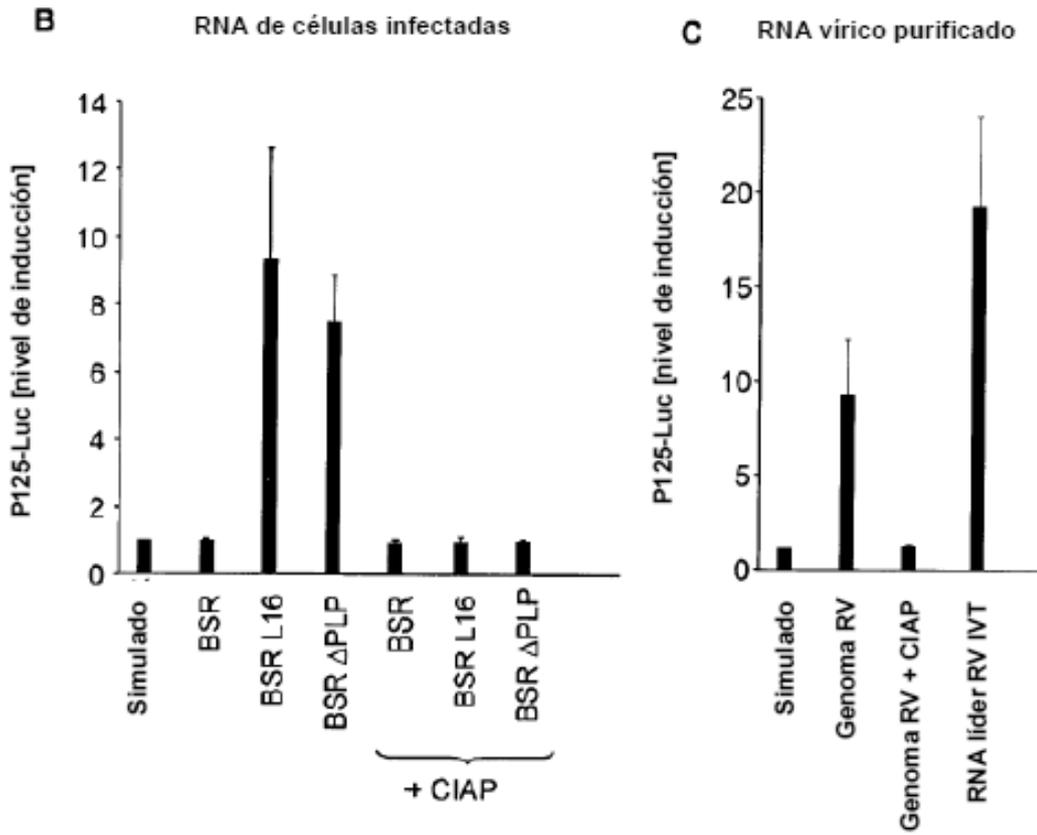


Figura 5

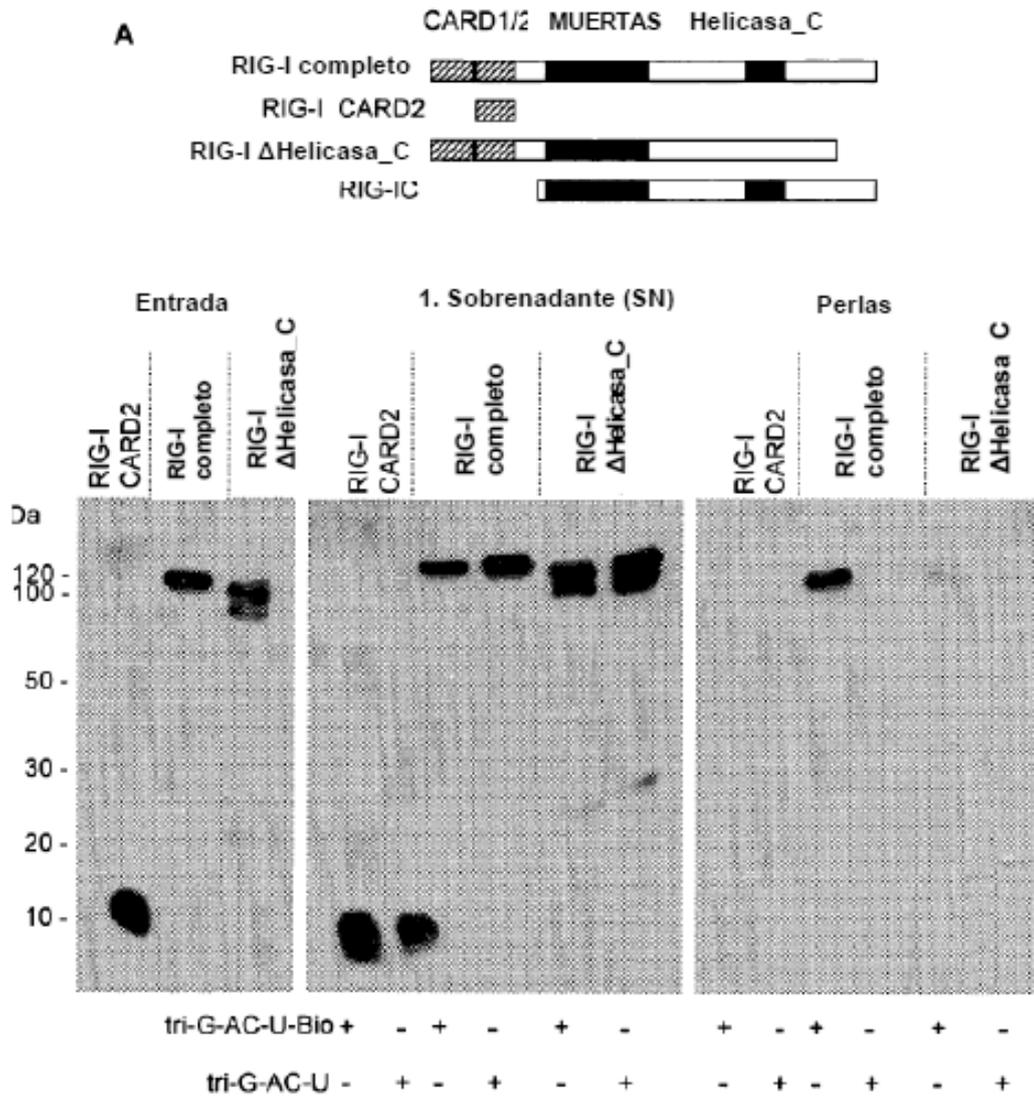


Figura 6

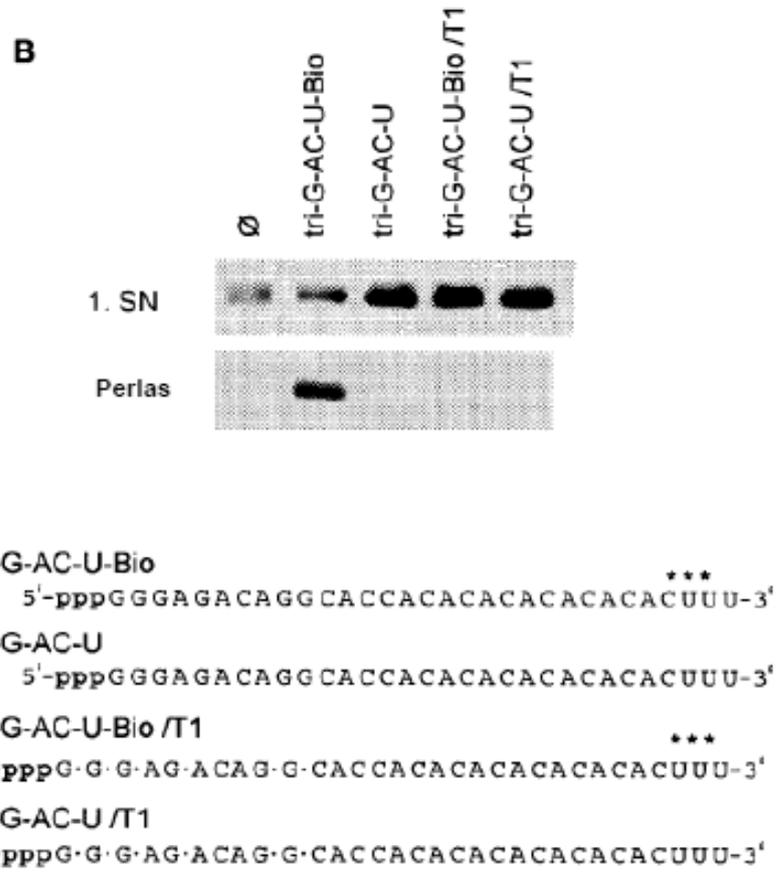


Figura 6

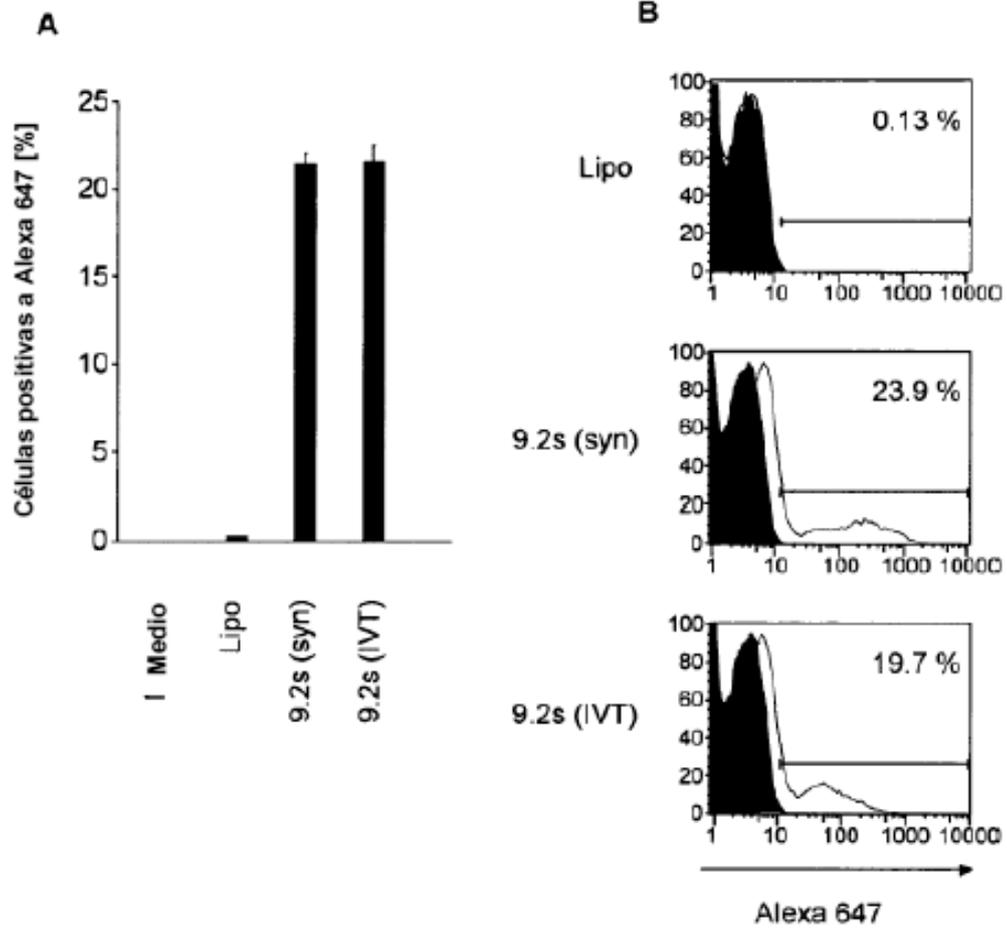


Figura 7

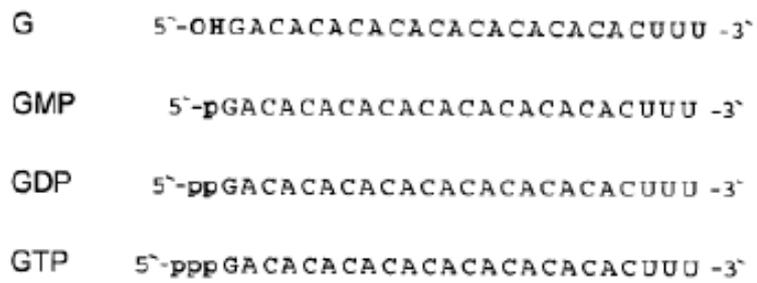
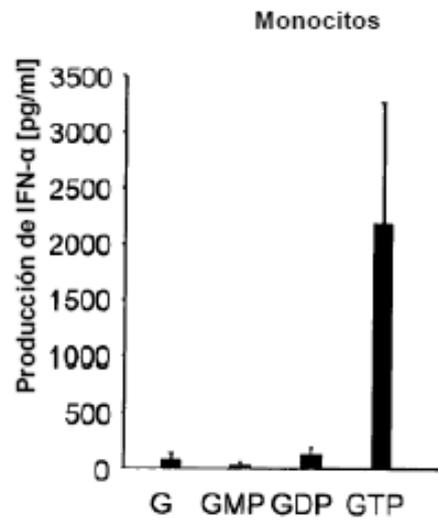


Figura 8

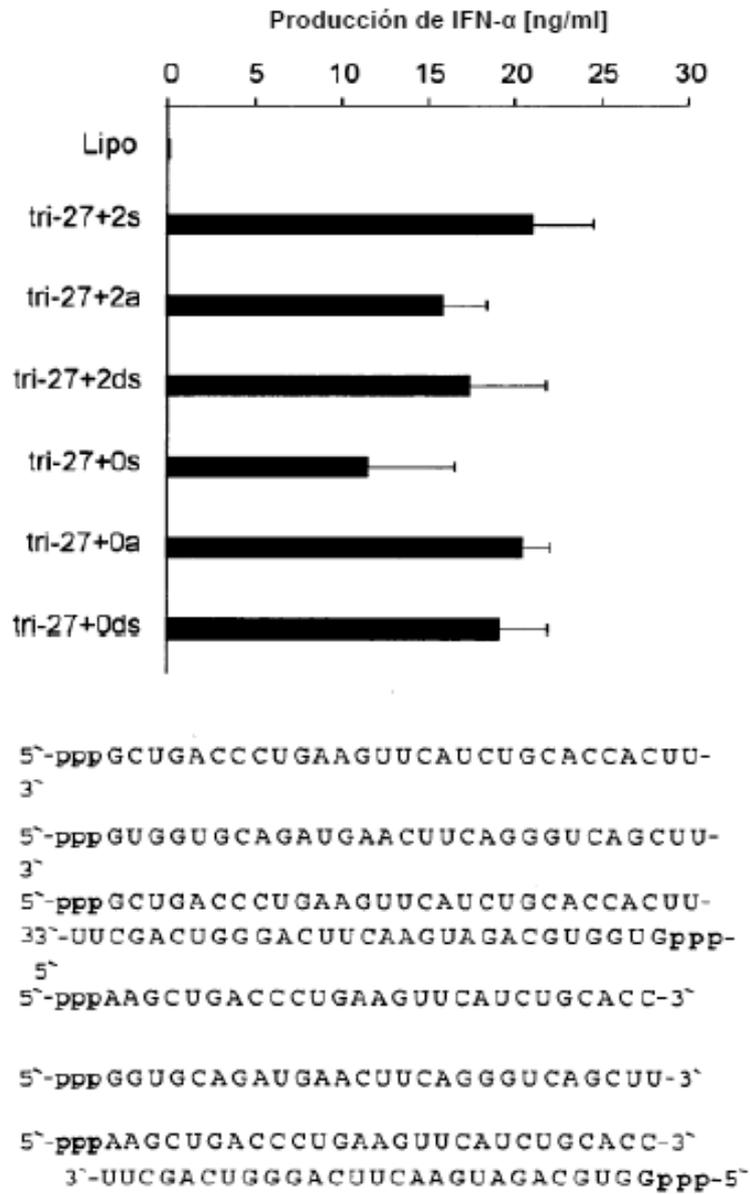


Figura 10

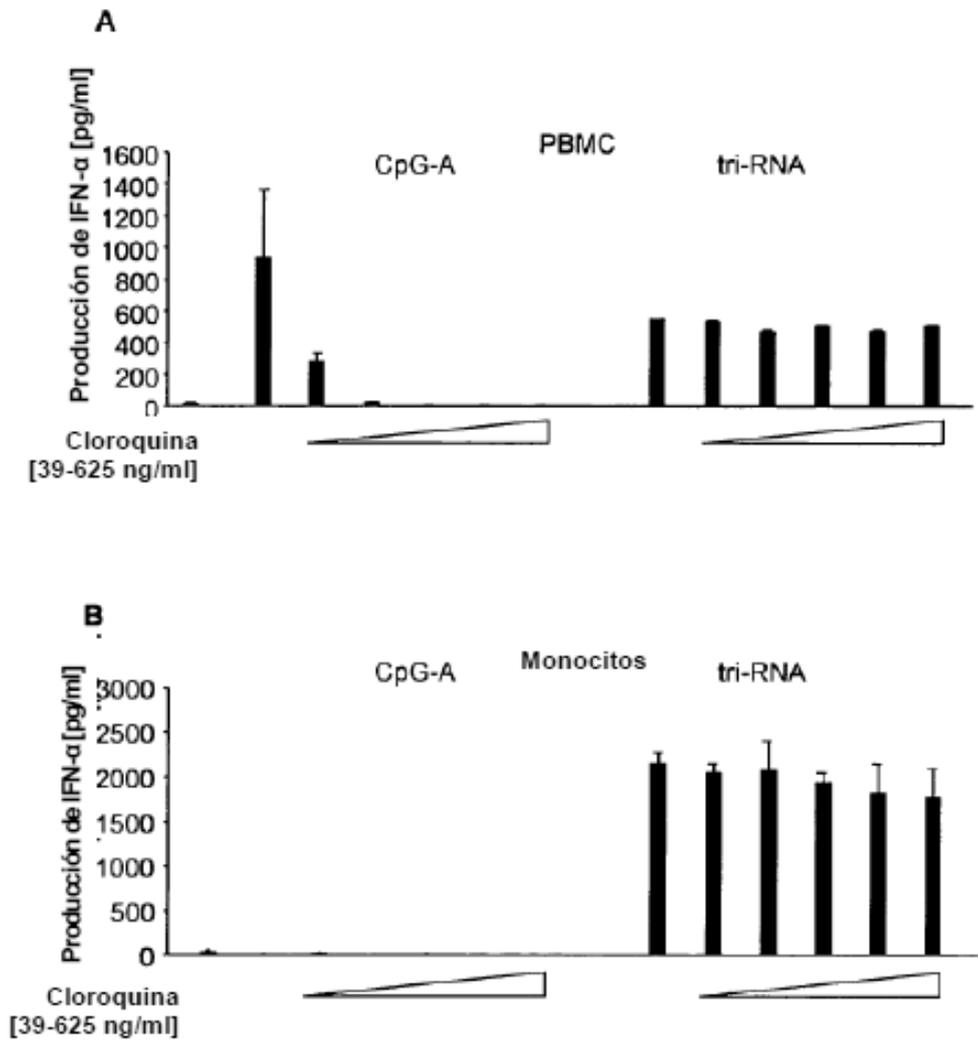


Figura 11

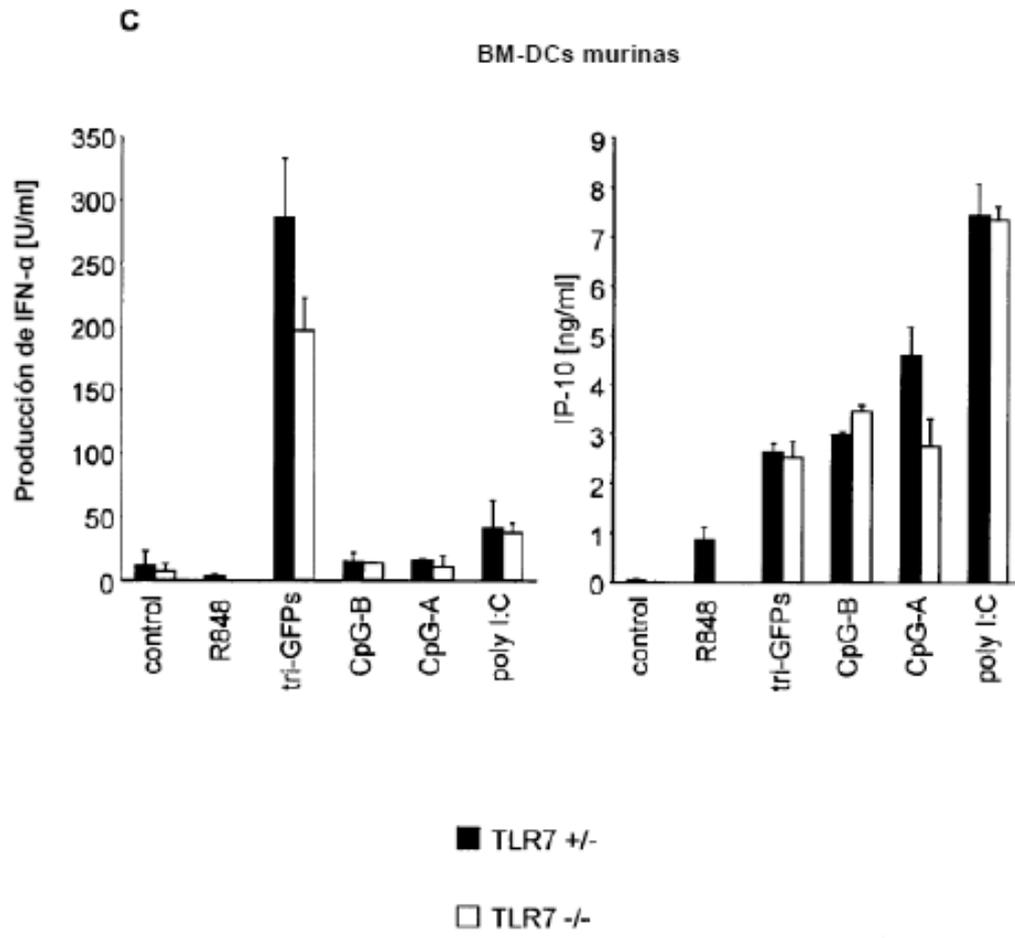


Figura 11

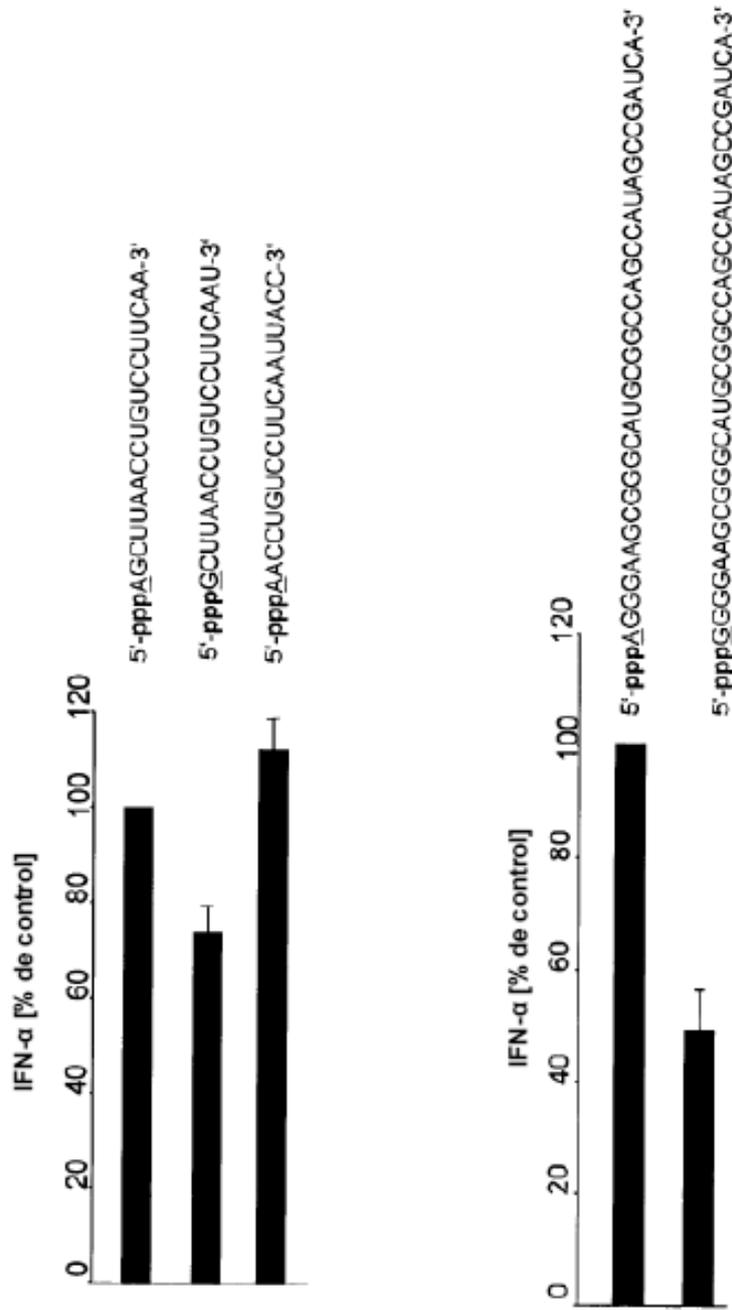


Figura 12

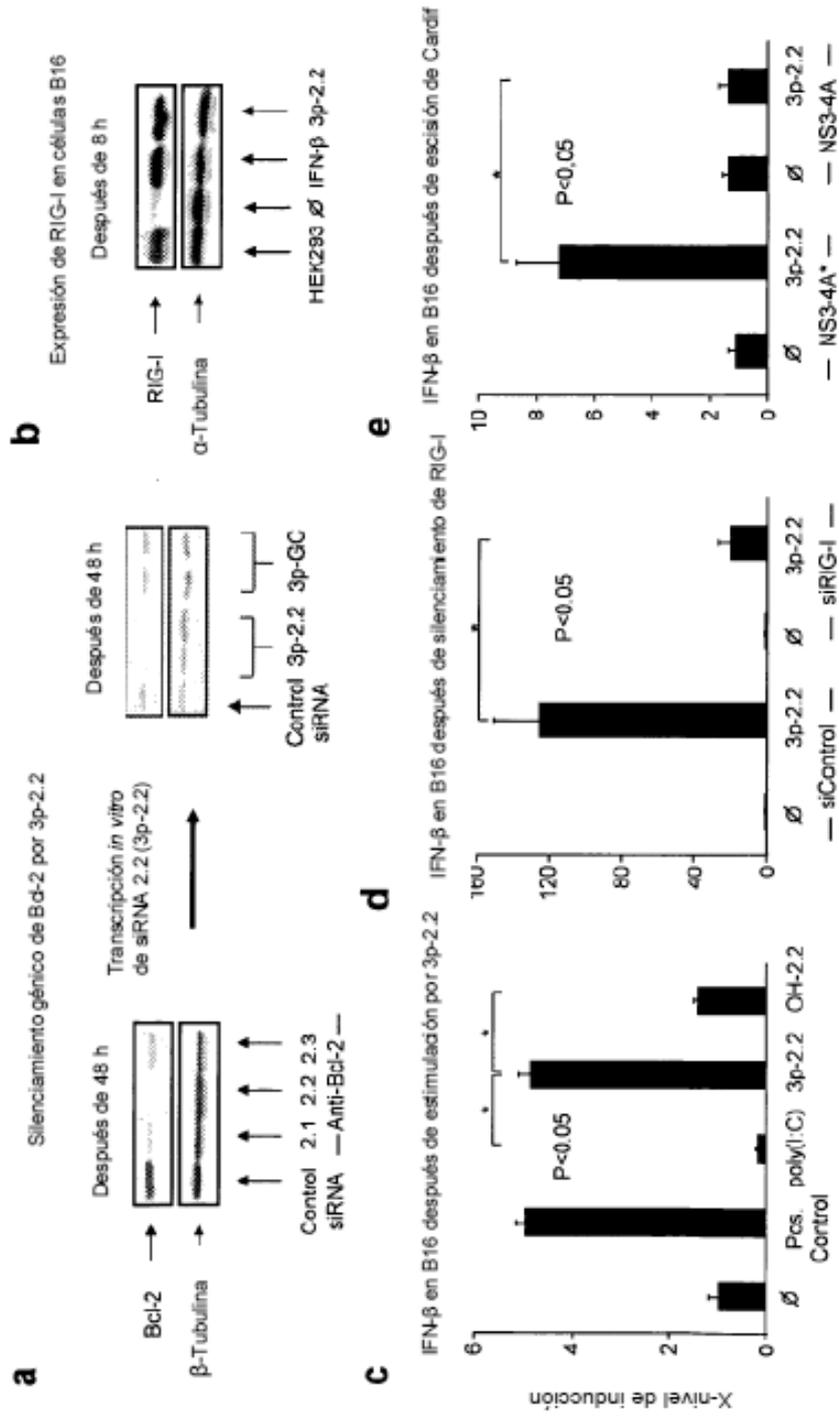


Figura 15

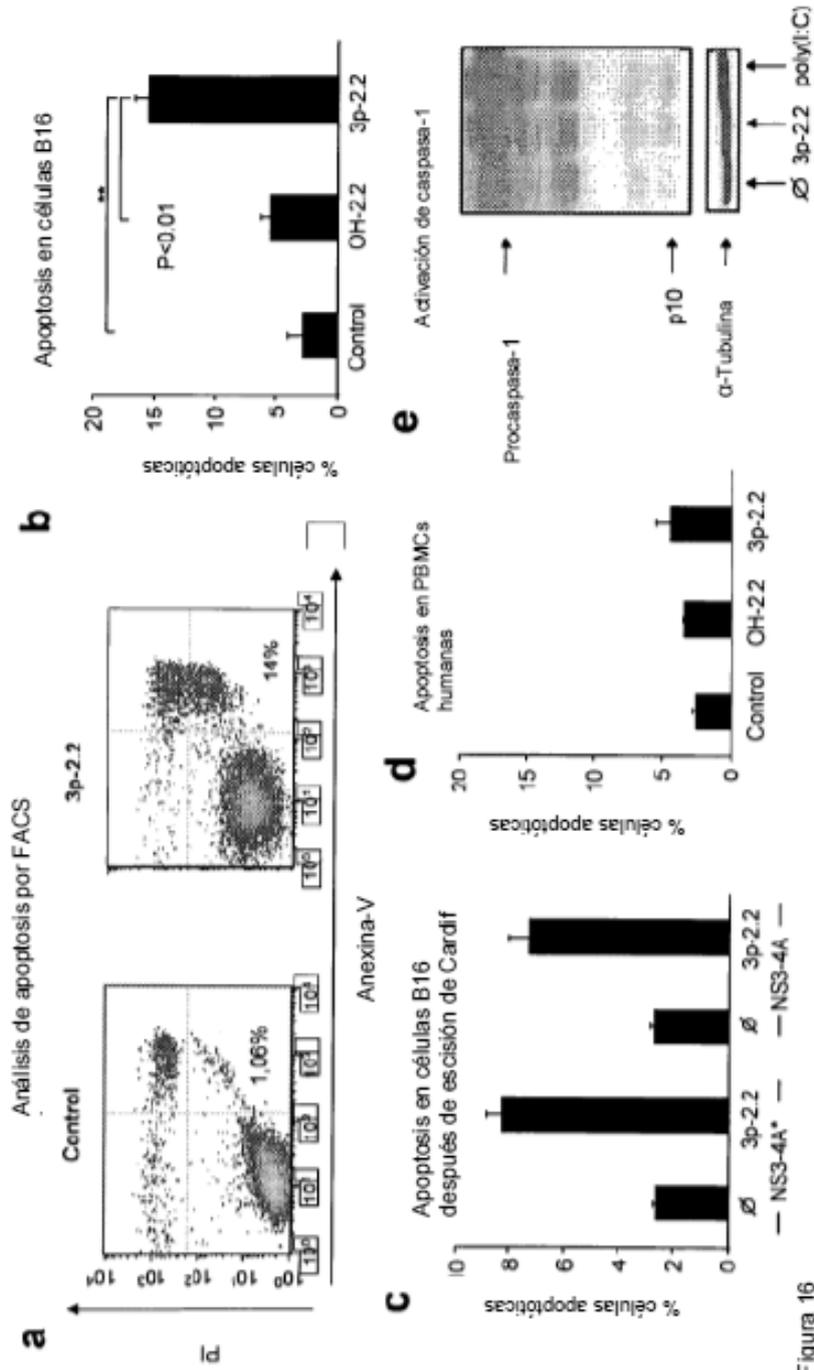


Figura 16

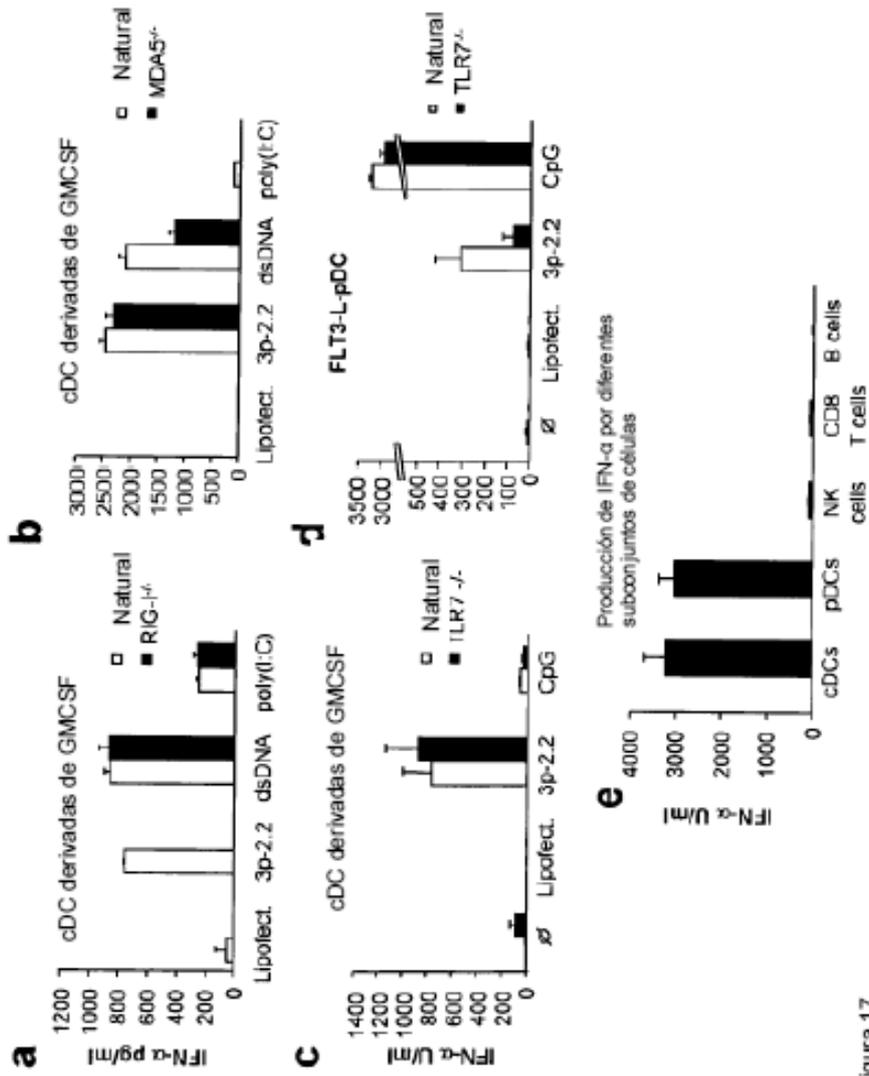


Figura 17

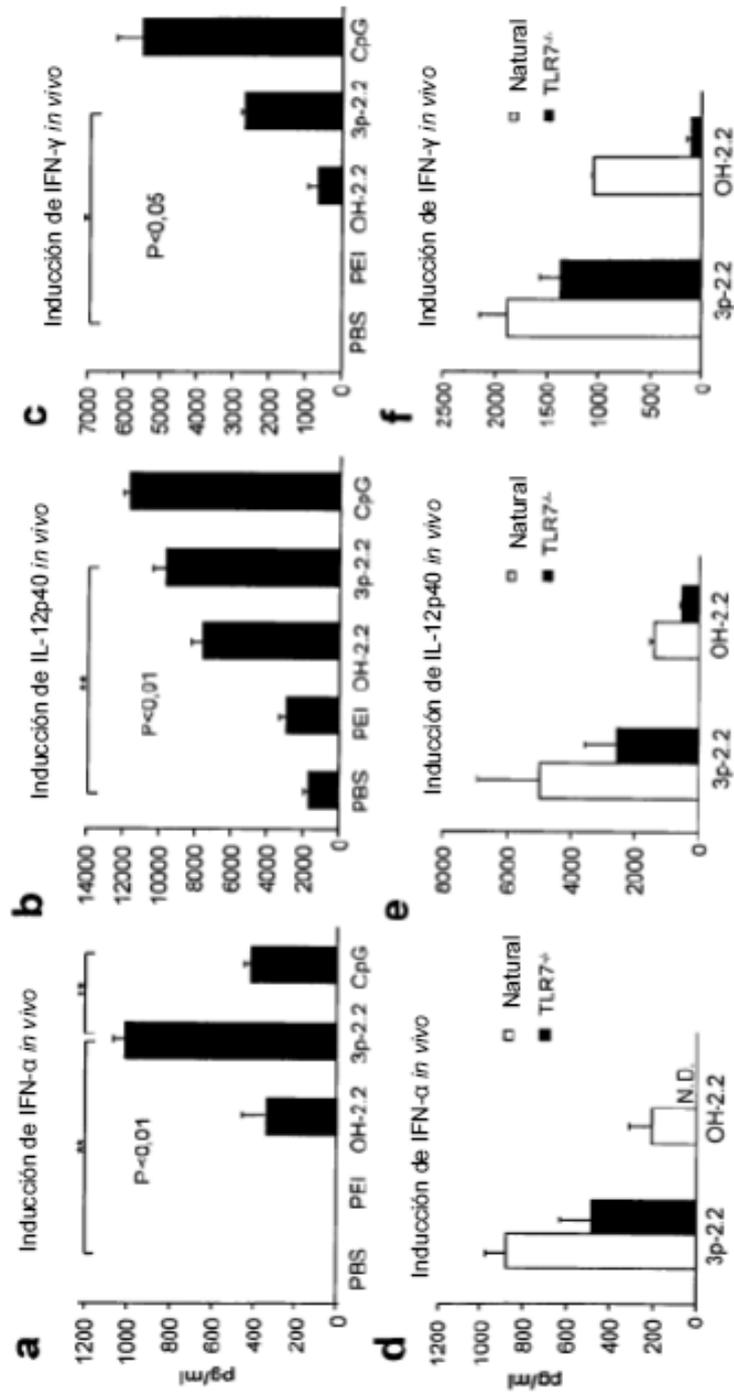


Figura 18

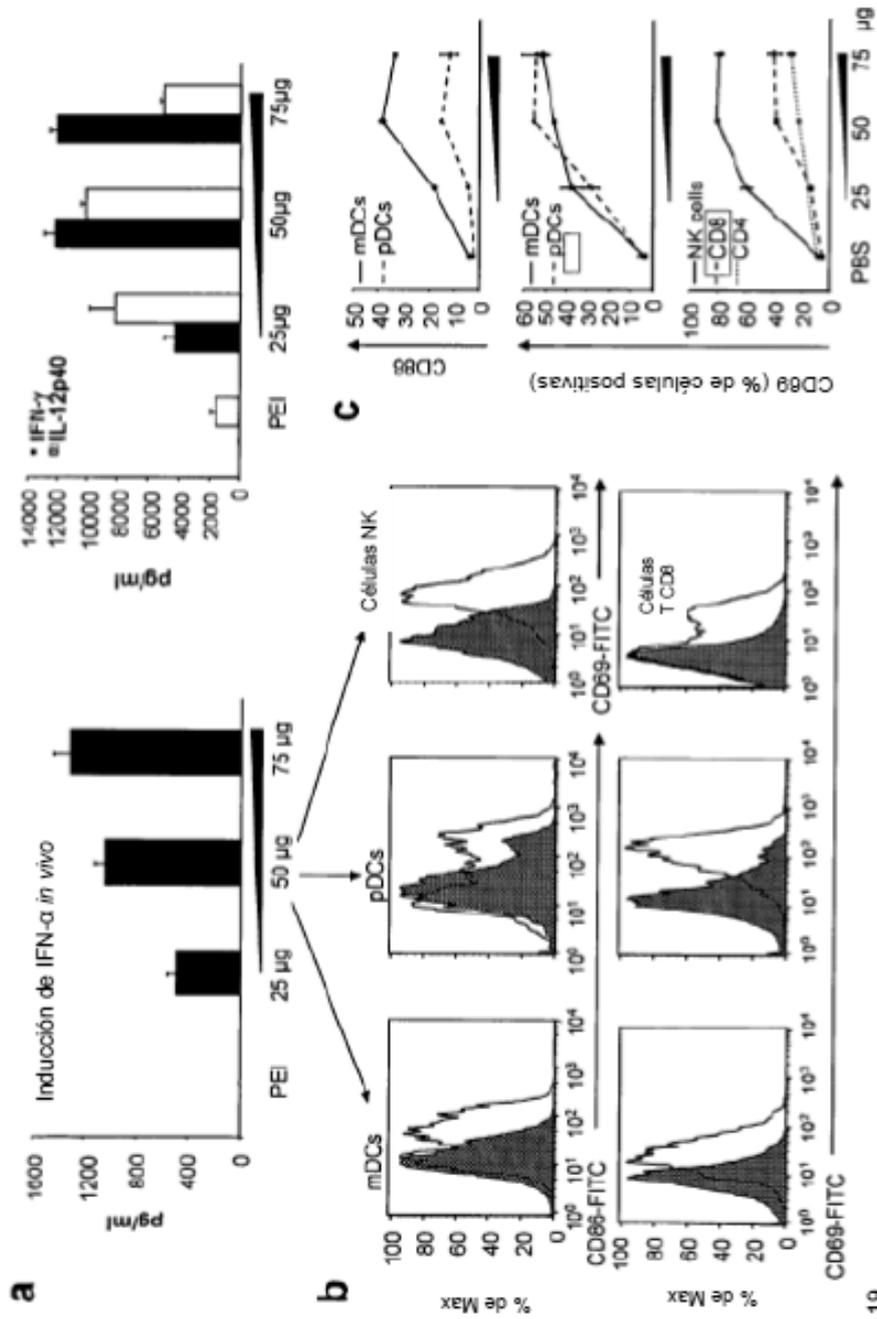


Figura 19

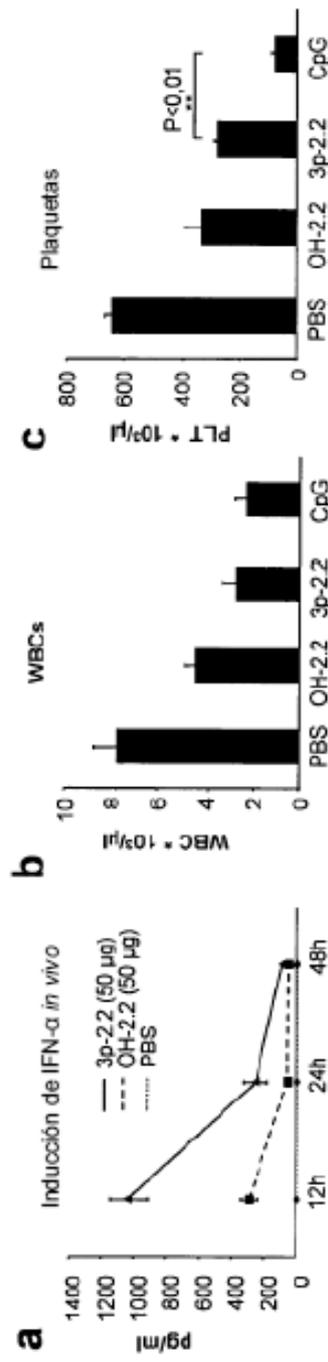


Figura 20

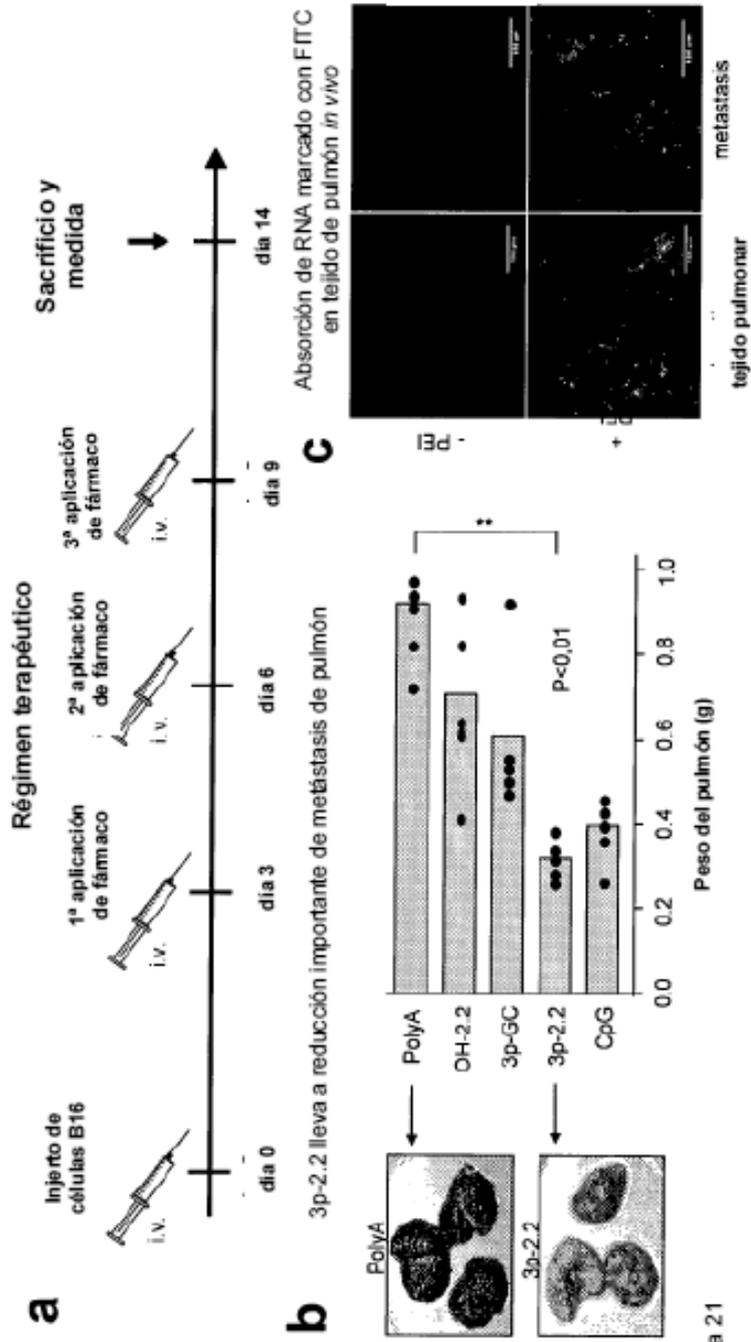


Figura 21

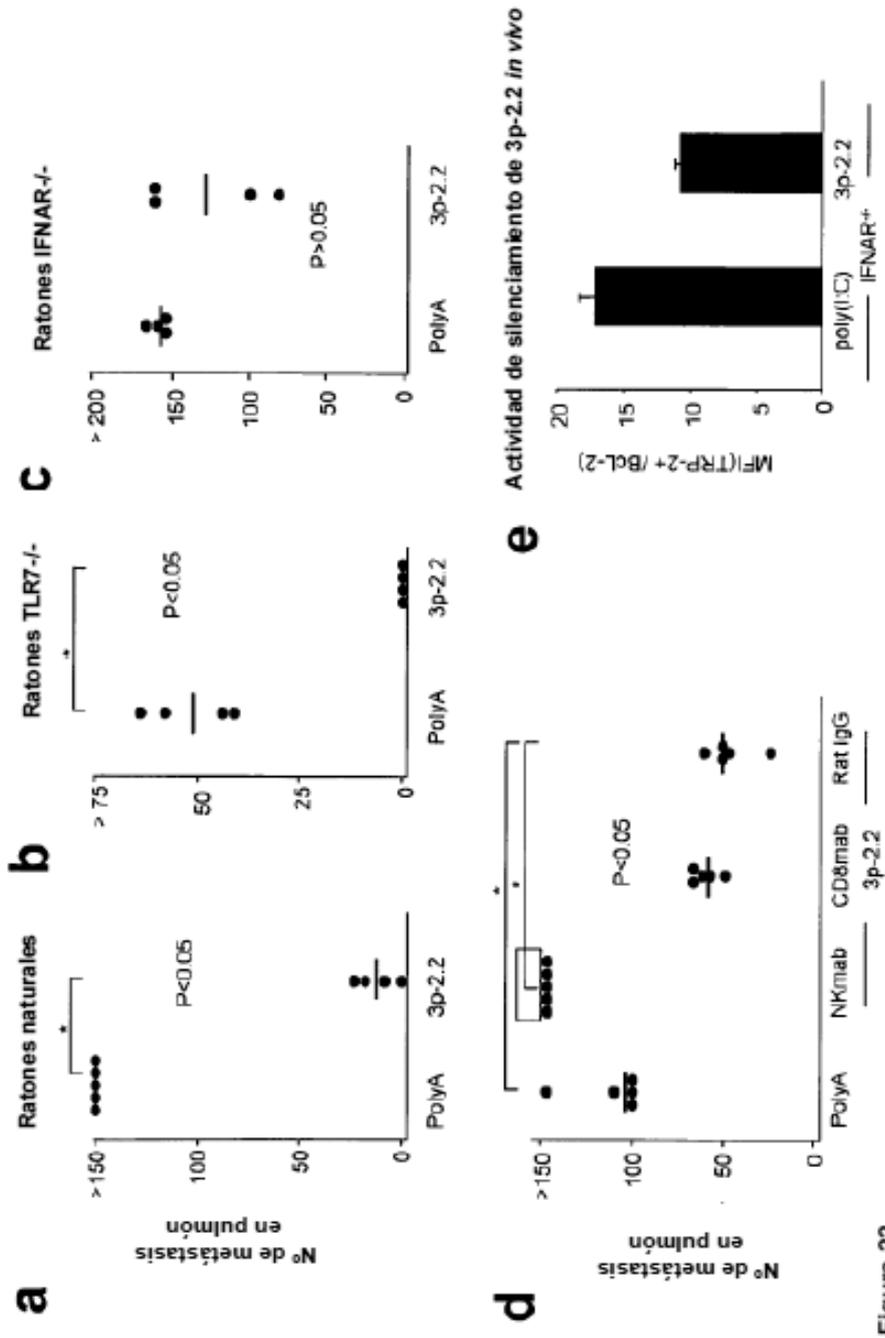


Figura 22

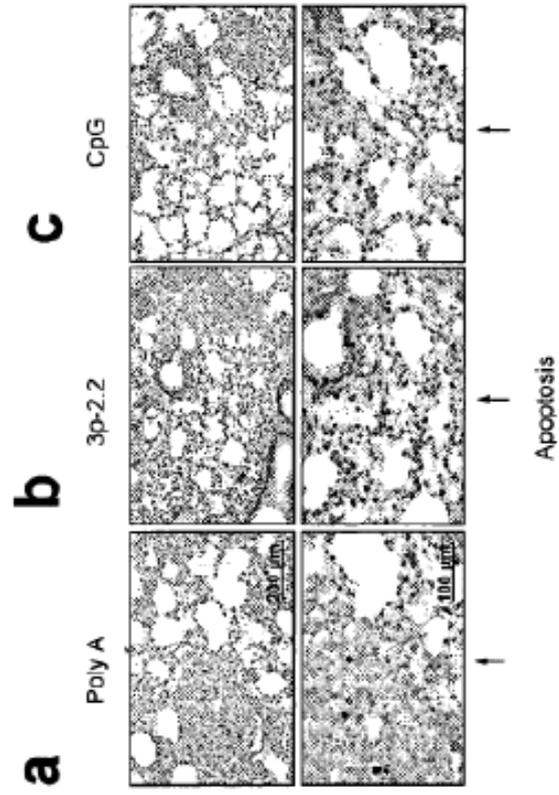


Figure 23

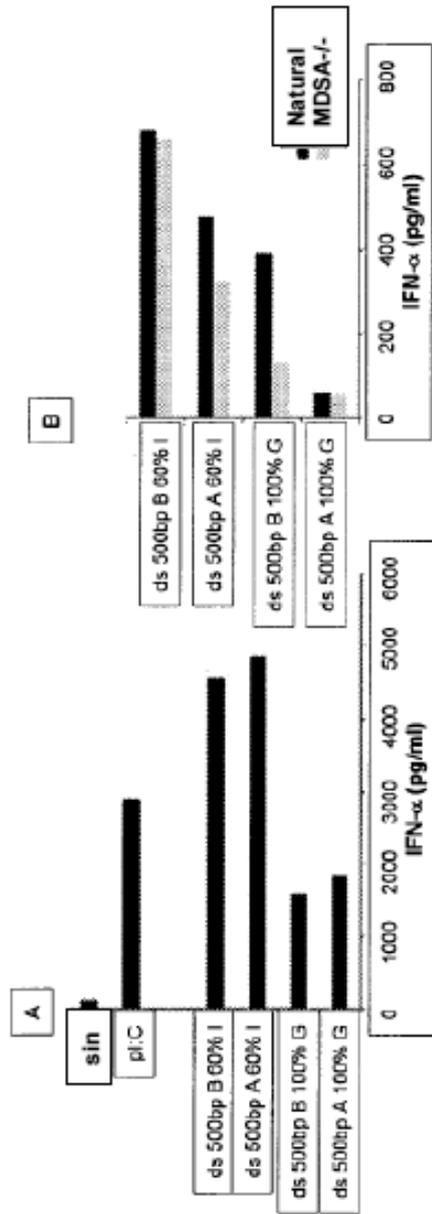


Figura 24

