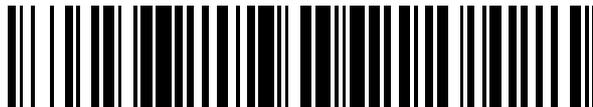


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 606**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2011 PCT/US2011/061412**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12068470**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2011 E 11841875 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2640420**

54 Título: **Compuestos de oligonucleótido inmunorregulador (IRO) para modular la respuesta inmunitaria basada en un receptor tipo Toll**

30 Prioridad:

19.11.2010 US 415494 P

26.07.2011 US 201161511709 P

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

25.01.2019

73 Titular/es:

IDERA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

167 Sidney Street

Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

KANDIMALLA, EKAMBAR, R.;

WANG, DAQING;

NOWAK, IRENEUSZ y

AGRAWAL, SUDHIR

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 697 606 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de oligonucleótido inmunorregulador (IRO) para modular la respuesta inmunitaria basada en un receptor tipo Toll

5

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La invención se refiere en general al campo de la inmunología y la inmunoterapia, y más específicamente a las composiciones de oligonucleótidos reguladores inmunitarios (IRO) y su uso para la inhibición y/o supresión de respuestas inmunitarias mediadas por receptores de tipo Toll. En particular, la invención se refiere a antagonistas de los receptores tipo Toll 7 (TLR7) y/o TLR9 que inhiben de forma única las citoquinas que normalmente se producen a través de la estimulación con TLR7 y/o TLR9.

15

Resumen de la técnica relacionada

Los receptores tipo Toll (TLR) están presentes en muchas células del sistema inmunitario y se ha demostrado que están involucrados en la respuesta inmunitaria innata (Hornung, V. et al., (2002) J. Immunol. 168:4531-4537). En vertebrados, o mamíferos, esta familia consiste en diez proteínas llamadas TLR1 a TLR10, que se sabe que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos de bacterias, hongos, parásitos y virus (Poltorak, a. et al. (1998) Science 282:2085-2088; Underhill, D.M., et al. (1999) Nature 401:811-815; Hayashi, F. et. al (2001) Nature 410:1099-1103; Zhang, D. et al. (2004) Science 303:1522-1526; Meier, A. et al. (2003) Cell. Microbiol. 5:561-570; Campos, M.A. et al. (2001) J. Immunol. 167: 416-423; Hoebe, K. et al. (2003) Nature 424: 743-748; Lund, J. (2003) J. Exp. Med. 198:513-520; Heil, F. et al. (2004) Science 303:1526-1529; Diebold, S.S., et al. (2004) Science 303:1529-1531; Hornung, V. et al. (2004) J. Immunol. 173:5935-5943). Los TLR son un medio clave por el cual los mamíferos reconocen y montan una respuesta inmunitaria a moléculas extrañas y también proporcionan un medio por el cual las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas están vinculadas (Akira, S. et al. (2001) Nature Immunol. 2:675-680; Medzhitov, R. (2001) Nature Rev. Immunol. 1:135-145). También se ha demostrado que los TLR cumplen una función en la patogénesis de muchas enfermedades, incluida la autoinmunidad, las enfermedades infecciosas y la inflamación (Cook, D.N. et al. (2004) Nature Immunol. 5:975-979) y la regulación de la activación mediada por TLR utilizando agentes apropiados puede proporcionar un medio para la intervención de la enfermedad.

35

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

40

Tabla 1

Molécula TLR	Agonista
TLR de Superficie Celular:	
TLR2	lipopéptidos bacterianos
TLR4	bacteria gram negativa
TLR5	Bacteria móvil
TLR6	bacteria gram positiva
TLR Endosómico:	
TLR3	ARN de virus de cadena doble
TLR7	ARN de virus de cadena sencilla
TLR8	ARN de virus de cadena sencilla
TLR9	ADN no metilado

Se ha demostrado que ciertos motivos CpG no metilados presentes en el ADN bacteriano y sintético activan el sistema inmunitario e inducen actividad antitumoral. (Tokunaga T et al., *J. Natl. Cancer Inst.* (1984) 72:955-962; Shimada S, et al., *Jpn. H cancer Res*, 1986, 77, 808-816; Yamamoto S, et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 1986, 79, 866-73). Se ha demostrado que otros estudios que utilizan oligonucleótidos antisentido que contienen dinucleótidos CpG estimulan respuestas inmunitarias (Zhao Q, et al. (1996) *Biochem.Pharmacol.* 26:173-182). Estudios posteriores demostraron que TLR9 reconoce los motivos CpG no metilados presentes en el ADN bacteriano y sintético (Hemmi, H. et al. (2000) *Nature* 408: 740-745). Otras modificaciones de los oligonucleótidos de fosforotioato que contienen CpG también pueden afectar su capacidad para actuar como moduladores de la respuesta inmunitaria a través de TLR9 (véase, por ejemplo, Zhao et al., *Biochem. Pharmacol.* (1996) 51:173-182; Zhao et al. (1996) *Biochem Pharmacol.* 52:1537-1544; Zhao et al. (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:495-502; Zhao et al (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:3453-3458; Zhao et al. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10:1051-1054; Yu, D. et al. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10:2585-2588; Yu, D. et al. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:2263-2267; y Kandimalla, E. et al. (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813). Además, los estudios de relación estructura-actividad han permitido la identificación de motivos sintéticos y nuevos compuestos basados en ADN que inducen perfiles de respuesta inmunitaria específicos que son distintos de los resultantes de dinucleótidos CpG no metilados. (Kandimalla, E. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102:6925-6930. Kandimalla, E. et al. (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 100:14303-14308; Cong, Y. et al. (2003) *Biochem Biophys Res. Commun.* 310:1133-1139; Kandimalla, E. et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:948-953; Kandimalla, E. et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2393-2400; Yu, D. et al. (2003) *Bioorg. Med. Chem.* 11:459-464; Bhagat, L. et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300:853-861; Yu, D. et al. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:4460-4469; Yu, D. et al. (2002) *J. Med. Chem.* 45:4540-4548. Yu, D. et al. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:83-90; Kandimalla, E. et al. (2002) *Bioconjug. Chem.* 13:966-974; Yu, D. et al. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:1613-1619; Yu, D. et al. (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:2803-2808; Yu, D. et al. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:2263-2267; Kandimalla, E. et al. (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813; Yu, D. et al. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10:2585-2588; Putta, M. et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34:3231-3238).

La localización selectiva de los TLR y la señalización generada a partir de ellos, proporciona una idea de su función en la respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria implica una respuesta tanto innata como adaptativa basada en el subconjunto de células involucradas en la respuesta. Por ejemplo, las células T auxiliares (Th) involucradas en las funciones mediadas por células clásicas, como la hipersensibilidad de tipo retardado y la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTL) son células Th1. Esta respuesta es la respuesta innata del cuerpo al antígeno (por ejemplo, infecciones virales, patógenos intracelulares y células tumorales), y produce una secreción de IFN-gamma y una activación concomitante de CTL. Alternativamente, las células Th involucradas como células auxiliares para la activación de células B son células Th2. Se ha demostrado que las células Th2 se activan en respuesta a bacterias y parásitos y pueden mediar la respuesta inmunitaria adaptativa del cuerpo (por ejemplo, producción de IgE y activación de eosinófilos) a través de la secreción de IL-4 e IL-5. El tipo de respuesta inmunitaria está influenciado por las citoquinas producidas en respuesta a la exposición al antígeno y las diferencias en las citoquinas secretadas por las células Th1 y Th2 pueden ser el resultado de las diferentes funciones biológicas de estos dos subconjuntos.

Si bien la activación de los TLR está involucrada en el desarrollo de una respuesta inmunitaria, una estimulación incontrolada del sistema inmunitario a través de los TLR puede exacerbar ciertas enfermedades en sujetos inmunocomprometidos. En los últimos años, varios grupos han mostrado el uso de oligodesoxoligonucleótidos sintéticos (ODN) como inhibidores de las citocinas inflamatorias (Lenert, P. et al. (2003) *DNA Cell Biol.* 22(10):621-631).

Usando ciertos ODN sintéticos, Lenert et al. informa la capacidad para producir ODN inhibitorios (Lenert, P. et al. (2003) *DNA Cell Biol.* 22(10):621-631). Estos ODN inhibitorios requieren dos secuencias de tripletes, un triplete "CCT" proximal y un triplete "GGG" distal. Además de estos ODN inhibitorios que contienen tripletes, varios grupos han informado otras secuencias de ADN específicas que pueden inhibir la activación mediada por TLR-9 por ODN contienen CpG. Estos motivos "inhibitorios" o "supresores" son ricos en poli "G" (por ejemplo, "GGGG") o secuencias "GC" tienden a estar metiladas y están presentes en el ADN de los mamíferos y ciertos virus (véase, por ejemplo; Chen, Y., et al., *Gene Ther.* 8: 1024-1032 (2001); Stunz, L.L., *Eur. J. Immunol.* 32: 1212-1222 (2002). Duramad, O., et al., *J. Immunol.*, 174: 5193-5200 (2005) and Jurk et al (US 2005/0239733), describen una estructura para oligonucleótidos de ADN inhibidores que contienen un motivo GGGG dentro de las secuencias. Patole et al. demuestra que GGGG que contiene ODN suprimirá el lupus sistémico Patole, P. et al. (2005) *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:3273-3280). Además, Gursel, I., et al., *J. Immunol.*, 171: 1393-1400 (2003), describen elementos TTAGGG repetitivos, que están presentes a alta frecuencia en telómeros de mamíferos, regulan a la baja la activación inmune inducida por CpG. Shirota, H., y otros, *J. Immunol.*, 173: 5002-5007 (2004), demuestran que los oligonucleótidos sintéticos que contienen el elemento TTAGGG imitan esta actividad y podrían ser efectivos en la prevención/tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunitarias dependientes de Th1 .

En contraste, algunos estudios han cuestionado la opinión de que los ODN que contienen poli G están actuando como antagonistas de los TLR. Por ejemplo, el documento US 6,426,334, Agrawal et al., demuestran que la administración de oligonucleótidos CpG que contienen cadenas de GGGG tiene una potente actividad antiviral y anticancerígena y que la administración de estos compuestos causará un aumento en la concentración sérica de IL-12. Además, se sabe que las secuencias de poliG que contienen oligos CpG inducen respuestas inmunitarias a través de la activación de TLR9 (Verthelyi D et al, *J Immunol.* 166, 2372, 2001; Gursel M et al, *J Leukoc Biol*, 71, 813, 2001, Krug A et al, *Eur J*

5 Immunol, 31, 2154, 2001) y muestran actividades antitumorales y antivirales (Ballas GK et al, J Immunol, 167, 4878, 2001; Verthelyi D et al, J Immunol, 170, 4717, 2003). Además, se sabe que los oligonucleótidos poliG inhiben el VIH y Rel A (McShan WM, et al, J Biol Chem., 267(8):5712-21, 1992; Rando, RF et al., J Biol Chem, 270(4):1754-60, 1995; Benimetskaya L, et al., Nucleic Acids Res., 25(13):2648-56, 1997); y los ODN que contienen un motivo CpG estimulante inmunitaria y 4 nucleótidos G consecutivos (conocidos como ODN de clase A) inducen la producción de interferón- γ y un cambio Th1 en la respuesta inmunitaria. Además, en los modelos de enfermedad preclínica, se ha demostrado que los ODN de clase A inducen una respuesta inmunitaria mediada por TLR.

10 Como una limitación adicional, se ha demostrado que los oligonucleótidos que contienen cadenas de guanosina forman estructuras tetraplex, actúan como aptámeros e inhiben la actividad de la trombina (Bock LC et al., Nature, 355:564-6, 1992; Padmanabhan, K et al., J Biol Chem., 268(24):17651-4, 1993). Por lo tanto, no está claro si las estructuras de cadena simple o de cadena múltiple son eficaces para suprimir la activación de TLR9.

15 Kandimalla et al. (US 2009/0060898 A1) describen una nueva clase de antagonistas de TLR que no requieren una secuencia poliG. Kandimalla et al. también describen la aplicación de estas nuevas composiciones para tratar y prevenir diversas enfermedades y trastornos (US 2009/0060898 A1; US 2008/0089883 A1; US 2009/0087388 A1; US 8,383,598 B2; US 8,399,423 B2). Se describen antagonistas de TLR adicionales en el documento WO 2009/154609 A1. Sin embargo, queda un desafío por desarrollar antagonistas de TLR adicionales que no requieran una secuencia poliG y, por lo tanto, no presenten el problema de formar estructuras secundarias. Este desafío se puede resolver a través del diseño de nuevos compuestos y composiciones basados en oligonucleótidos que pueden actuar como inhibidores únicos de los TLR 7 y/o 9. Tales nuevos compuestos y composiciones personalizados encontrarán uso en muchas aplicaciones clínicamente relevantes, que incluyen el tratamiento y la prevención de enfermedades y trastornos con un componente estimulante inmunológico.

25 Breve resumen de la invención.

30 Los inventores han descubierto sorprendentemente que la modificación única de la secuencia de ácido nucleico en el lado 5' de un dinucleótido inmunoestimulante del núcleo, los ácidos nucleicos dentro del dinucleótido estimulante inmunitaria del núcleo, los enlaces entre los nucleótidos o los enlazadores que conectan dos o más oligonucleótidos producen nuevos antagonistas de TLR7 y/o TLR9 que antagonizan, inhiben, suprimen o previenen claramente los perfiles de citoquinas y quimiocinas in vitro e in vivo normalmente generados a través de la estimulación con TLR7 y/o TLR9. Esta capacidad de antagonizar, inhibir, suprimir o prevenir la respuesta de citoquinas y quimiocinas a un TLR7 y/o un agonista de TLR9 brinda la capacidad de prevenir y/o tratar diversas afecciones de enfermedades de una manera específica de la enfermedad e incluso de un paciente específico.

35 El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. También se divulgan compuestos de oligonucleótidos inmunorreguladores (IRO) que actúan como antagonistas distintos de TLR7 y/o TLR9 y métodos para usar dichos compuestos para antagonizar, inhibir, suprimir o prevenir la estimulación inmunitaria mediada por TLR7 y/o TLR9. Estos compuestos IRO comprenden un motivo de estimulación inmunológica y serían estimulantes inmunitarios, pero para una o más modificaciones químicas en la secuencia de ácido nucleico en el lado 5' del motivo de estimulación inmunitaria y/o en el motivo de estimulación inmunitaria. Los compuestos IRO y las composiciones que preferentemente antagonizan, inhiben, suprimen o previenen la actividad de TLR7 y/o TLR9 tienen la estructura 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3', en el que CG es un motivo de oligonucleótido seleccionado de CpG, C*pG, C*pG* o CpG* en donde C es citosina, C* es un análogo o derivado de citosina, G es una guanina y G* es un análogo o derivado de guanina; N₁-N₃, en cada aparición, es independientemente un nucleótido o derivado de nucleótido; N¹-N³, en cada aparición, es independientemente un nucleótido o derivado de nucleótido; N_m y N^m, en cada aparición, son independientemente un nucleótido, derivado de nucleótido o enlazador no nucleotídico; siempre que al menos uno de N₁, N₂ y N₃ y/o C y/o G del motivo oligonucleótido sea un derivado de nucleótido que antagonice, inhiba, suprima o prevenga la actividad del motivo oligonucleótido; y además siempre que el compuesto contenga menos de 4 nucleótidos de guanosina consecutivos y preferiblemente menos de 3 guanosinas consecutivas, en donde la actividad estimulante inmunitaria del motivo oligonucleótido es antagonizada, inhibida, suprimida o prevenida por el derivado de nucleótido; y en donde m es un número de 0 a aproximadamente 30.

55 Los compuestos IRO divulgados en el presente documento pueden comprender al menos dos oligonucleótidos, en el que al menos dos oligonucleótidos están unidos covalentemente a través de un enlace de nucleótido directo a nucleótido en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o nucleobase modificada o a través de un enlazador no nucleotídico en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o nucleobase modificada. Preferiblemente, por lo menos uno de los oligonucleótidos del compuesto IRO tiene la estructura 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3', en el que N_m, N₁, N₂, N₃, C, G, N¹, N², N³ y N^m son los descritos anteriormente para la estructura general del compuesto IRO. Más preferiblemente, al menos dos de los oligonucleótidos del compuesto IRO tienen la estructura 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3'-X-3'-N^m-N³N²N¹GCN₁N₂N₃-N_m-5', en el que X es un enlace de nucleótidos o un enlazador no nucleotídico y N_m, N₁, N₂, N₃, C, G, N¹, N², N³ y N^m son como se describió anteriormente para la estructura general del compuesto IRO.

65 Los compuestos y composiciones de IRO divulgados en el presente documento inhiben preferentemente las respuestas inmunitarias mediadas por TLR7 y/o TLR9 en diversos tipos de células y en diversos modelos

experimentales in vitro e in vivo, y cada compuesto o composición proporciona un perfil de inhibición inmunitaria distinto.

5 También se divulga una composición farmacéutica que comprende un compuesto IRO de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 También se divulga un método para inhibir una respuesta inmunitaria mediada por TLR en un vertebrado o mamífero, el método comprende administrar al mamífero un compuesto o composición IRO divulgada en el presente documento en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Preferiblemente, suprimir o inhibir la estimulación de TLR comprende administrar un compuesto IRO divulgado en el presente documento, en el que el TLR se selecciona de entre TLR7 y TLR9.

15 También se divulga un método para suprimir o inhibir la actividad de un agonista de TLR que comprende administrar un compuesto IRO divulgado en el presente documento, en el que el compuesto IRO se administra al mismo tiempo, antes o después del agonista de TLR. Preferiblemente, el agonista de TLR se selecciona entre agonistas de TLR7 y TLR9.

20 También se divulga un método para tratar terapéuticamente un vertebrado, o mamífero, que tiene una enfermedad mediada por TLR7 y/o TLR9, dicho método comprende administrar al mamífero un compuesto IRO divulgado en el presente documento en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Preferiblemente, la enfermedad es cáncer, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, inflamación de las vías respiratorias, una enfermedad o trastorno inflamatorio, enfermedad infecciosa, malaria, enfermedad de Lyme, infecciones oculares, conjuntivitis, trastornos de la piel, psoriasis, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, síndrome de fatiga crónica, sarcoidosis, rechazo de trasplante, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Las enfermedades y trastornos autoinmunitarios preferidos incluyen, sin limitación, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Chron, artritis reumatoide, shock séptico, alopecia universalis, encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, penfigoide vesicular, enfermedad de chagas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad celiaca, dermatomiositis, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial, esclerodermia localizada, miastenia gravis, narcolepsia, neuromiotonía, pénfigo, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, esquizofrenia, síndrome de Sjögren, arteritis temporal (también conocida como "arteritis de células gigantes"), vasculitis, vitiligo, vulvodinia y granulitis de Wegener. Las enfermedades y trastornos inflamatorios preferidos incluyen, sin limitación, inflamación de las vías respiratorias, asma, enfermedades autoinmunitarias, inflamación crónica, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad de Behçet, hipersensibilidad, enfermedad inflamatoria del intestino, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, rechazo de trasplantes, colitis ulcerosa, uveítis, conjuntivitis y vasculitis.

40 También se divulga un método para prevenir el cáncer, enfermedades o trastornos autoinmunitarios, inflamación de las vías respiratorias, enfermedades o trastornos inflamatorios, enfermedades infecciosas, malaria, enfermedad de Lyme, infecciones oculares, conjuntivitis, trastornos de la piel, psoriasis, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, síndrome de fatiga crónica, sarcoidosis, rechazo de trasplante, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno en un vertebrado o mamífero, dicho método comprende administrar al mamífero un compuesto IRO divulgado en el presente documento en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Las enfermedades y trastornos autoinmunitarios preferidos incluyen, sin limitación, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Chron, artritis reumatoide, shock séptico, alopecia universalis, encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, penfigoide vesicular, enfermedad de chagas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad celiaca, dermatomiositis, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial, esclerodermia localizada, miastenia gravis, narcolepsia, neuromiotonía, pénfigo, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, esquizofrenia, síndrome de Sjögren, arteritis temporal (también conocida como "arteritis de células gigantes"), vasculitis, vitiligo, vulvodinia y granulitis de Wegener. Las enfermedades y trastornos inflamatorios preferidos incluyen, sin limitación, inflamación de las vías respiratorias, asma, enfermedades autoinmunitarias, inflamación crónica, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad de Behçet, hipersensibilidad, enfermedad inflamatoria del intestino, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, rechazo de trasplantes, colitis ulcerosa, uveítis, conjuntivitis y vasculitis.

60 En algunas realizaciones preferidas, el compuesto IRO divulgado en el presente documento se administra en combinación con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas de TLR, antagonistas de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes, inhibidores de la quinasa o moléculas coestimuladoras o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones preferidas, la vía de administración es parenteral, administración por vía mucosa, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, intragástrica, vaginal, por pistola génica, parche dérmico o en gota ocular o forma de enjuague bucal.

65

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema sintético para la síntesis lineal de compuestos reguladores inmunitarios divulgados en el presente documento. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

La figura 2 es un esquema sintético para la síntesis paralela de oligonucleótidos reguladores inmunitarios divulgados en el presente documento. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

La figura 3 muestra la capacidad de los antagonistas de TLR7/9 divulgados en el presente documento para inhibir las citoquinas/quimioquinas inducidas por TLR7 por antagonistas de TLR7/9 en esplenocitos de ratón tratados de acuerdo con el Ejemplo 3.

La figura 4 muestra la capacidad de los antagonistas de TLR7/9 divulgados en el presente documento para inhibir las citoquinas/quimioquinas inducidas por TLR9 por antagonistas de TLR7/9 en esplenocitos de ratón tratados de acuerdo con el Ejemplo 3.

La figura 5 representa la capacidad de los antagonistas de TLR7/9 divulgados en el presente documento para inhibir la IL-12 inducida por TLR7 in vivo en ratones tratados de acuerdo con el Ejemplo 4.

La figura 6 muestra la capacidad de los antagonistas de TLR7/9 divulgados en el presente documento para inhibir la IL-12 inducida por TLR9 in vivo en ratones tratados de acuerdo con el Ejemplo 4.

La figura 7 representa la capacidad de los antagonistas de TLR7/9 divulgados en el presente documento para inhibir la IL-12 inducida por TLR7 in vivo a lo largo del tiempo en ratones tratados de acuerdo con el Ejemplo 4.

La figura 8 muestra la capacidad de los antagonistas de TLR7/9 divulgados en el presente documento para inhibir la inhibición de IL-12 inducida por TLR9 in vivo a lo largo del tiempo en ratones tratados de acuerdo con el Ejemplo 4.

La figura 9 muestra la capacidad de los antagonistas de TLR7/9 divulgados en el presente documento para inhibir selectivamente las citoquinas inducidas por TLR7 y 9 de ratón en ratones tratados de acuerdo con el Ejemplo 4.

La figura 10 demuestra que los antagonistas de TLR 7/9 divulgados en el presente documento no inhiben la actividad de TLR3 o TLR5 in vivo en ratones tratados de acuerdo con el Ejemplo 4.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. También se divulga el uso terapéutico de nuevos compuestos basados en oligonucleótidos como agentes inmunomoduladores para aplicaciones de inmunoterapia. También se divulgan nuevos compuestos basados en oligonucleótidos que proporcionan distintos perfiles de inhibición inmunitaria a través de su interacción con TLR7 y/o TLR9. Específicamente, se divulgan compuestos de oligonucleótidos reguladores inmunitarios (IRO) como antagonistas de los receptores tipo toll (TLR) para inhibir y/o suprimir una respuesta inmunitaria mediada por TLR. Estas IRO tienen modificaciones químicas y/o enlaces internucleótidos, y/o enlazadores entre oligonucleótidos que proporcionan su inhibición o supresión de la señalización mediada por TLR7 y/o TLR9 en respuesta a ligandos o agonistas de TLR endógenos y/o exógenos. Las referencias citadas en el presente documento reflejan el nivel de conocimiento en el campo. Cualquier conflicto entre las enseñanzas de las referencias citadas y esta especificación se resolverá a favor de estas últimas.

También se divulgan métodos para suprimir una respuesta inmunitaria causada por los TLR y puede usarse para aplicaciones de inmunoterapia, como, entre otras, el tratamiento del cáncer, trastornos autoinmunitarios, asma, alergias respiratorias, alergias a alimentos, alergias cutáneas, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis, pleuritis, infecciones crónicas, enfermedades inflamatorias, síndrome inflamatorio del intestino, sepsis e infecciones parasitarias y virales en adultos, pediátricos, humanos y veterinarios. Por lo tanto, la invención proporciona compuestos IRO que tienen niveles óptimos de efecto modulador inmune para la inmunoterapia y métodos para hacer y usar tales compuestos. Además, se divulgan los compuestos IRO de la invención que son útiles en combinación con, por ejemplo, vacunas, antígenos, anticuerpos, alérgenos, agentes quimioterapéuticos (quimioterapia y terapias dirigidas) y/u oligonucleótidos antisentido para la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Definiciones

El término "oligonucleótido" en general se refiere a un polinucleósido que comprende una pluralidad de unidades de nucleósido enlazadas. Dichos oligonucleótidos pueden obtenerse a partir de fuentes de ácido nucleico existentes, incluyendo el ADNc genómico, pero preferiblemente se producen por métodos sintéticos. Preferiblemente, cada unidad de nucleósido puede abarcar diversas modificaciones y sustituciones químicas en comparación con los oligonucleótidos de tipo silvestre, que incluyen, entre otros, la base de nucleósido modificado y/o la unidad de azúcar modificada. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de modificaciones químicas y se describen, por ejemplo, en Uhlmann E et al. (1990) Chem. Rev. 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties &

Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; y Hunziker, J. et al. (1995) Mod. Syn. Methods 7:331-417; y Croke, S. et al. (1996) Ann.Rev. Pharm. Tox. 36:107-129. Los residuos de nucleósidos se pueden acoplar entre sí mediante cualquiera de los numerosos enlaces internucleosídicos conocidos. Dichos enlaces internucleosídicos incluyen, sin limitación, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidato puenteado, metilfosfonato puenteado, fosforotioato puenteado y enlaces internucleosídicos de sulfona. El término "oligonucleótido" también abarca polinucleósidos que tienen uno o más enlaces internucleosídicos estereoespecíficos (por ejemplo, (R_P)- o (S_P)- fosforotioato, alquilfosfonato o enlaces fosfotriéster). Tal como se usa en el presente documento, los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" pretenden incluir polinucleósidos y dinucleósidos que tienen cualquiera de dichos enlaces internucleosídicos, ya sea que el enlace comprenda un grupo fosfato. En ciertas realizaciones preferidas, estos enlaces internucleosídicos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato o combinaciones de los mismos.

El término "ribonucleósido sustituido en 2'" o "arabinósido sustituido en 2'" incluyen en general ribonucleósidos o arabinonucleósidos en los que el grupo hidroxilo en la posición 2' de la fracción pentosa está sustituida para producir un ribonucleósido sustituido en 2' o 2'-O. Opcionalmente, dicha sustitución es con un grupo hidrocarbilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados, con un átomo de halógeno, o con un grupo arilo que tiene 6-10 átomos de carbono, en el que dicho grupo hidrocarbilo o arilo puede no estar sustituido o pueden estar sustituidos, por ejemplo, con grupos halo, hidroxí, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carboalcoxi o amino. Los ejemplos de ribonucleósidos 2'-O-sustituidos o de arabinósidos 2'-O-sustituidos incluyen, sin limitación, 2'-amino, 2'-flúor, 2'-alilo, 2'-O-alquilo y 2'-propargil ribonucleósidos o arabinósidos, 2'-O-metilribonucleósidos o 2'-O-metil-arabinósidos y 2'-O-metoxietoxirribonucleósidos o 2'-O-metoxietoxicarabinósidos.

El término "3'", cuando se usa direccionalmente, en general se refiere a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 3' (cadena abajo) de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido.

El término "5'", cuando se usa direccionalmente, en general se refiere a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 5' (cadena arriba) de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido.

El término "acerca de" en general significa que el número exacto no es crítico. Por lo tanto, el número de residuos de nucleósidos en los oligonucleótidos no es crítico, y los oligonucleótidos que tienen uno o dos residuos de nucleósidos menos, o de uno a varios residuos de nucleósidos adicionales se contemplan como equivalentes de cada una de las realizaciones descritas anteriormente.

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

El término "antagonista" en general se refiere a una sustancia que atenúa, inhibe o suprime los efectos de un agonista o ligando.

El término "adyuvante" en general se refiere a una sustancia que, cuando se agrega a un agente inmunogénico como una vacuna o antígeno, mejora o potencia una respuesta inmunitaria al agente en el huésped receptor tras la exposición a la mezcla.

El término "inflamación de las vías respiratorias" en general incluye, sin limitación, asma.

El término "alérgeno" en general se refiere a un antígeno o porción antigénica de una molécula, en general una proteína, que provoca una respuesta alérgica al exponerse a un sujeto. Típicamente, el sujeto es alérgico al alérgeno tal como se indica, por ejemplo, mediante la prueba de ronchas y eritema o cualquier método conocido en la técnica. Se dice que una molécula es un alérgeno aunque si solo un pequeño subconjunto de sujetos muestra una respuesta inmunitaria alérgica al exponerse a la molécula.

El término "alergia" en general se refiere a una respuesta inmunitaria inapropiada caracterizada por inflamación e incluye, sin limitación, alergias a alimentos y alergias respiratorias.

El término "antígeno" en general se refiere a una sustancia que es reconocida y unida selectivamente por un anticuerpo o por un receptor de antígeno de células T, lo que resulta en la inducción de una respuesta inmunitaria. Los antígenos pueden incluir, entre otros, péptidos, proteínas, nucleósidos, nucleótidos y combinaciones de los mismos. Los antígenos pueden ser naturales o sintéticos y en general inducen una respuesta inmunitaria que es específica para ese antígeno.

Los términos "enfermedad autoinmunitaria" y "trastorno autoinmunitario" en general se refieren a enfermedades o trastornos en los cuales los componentes "propios" sufren un ataque del sistema inmunitario.

El término "enfermedad mediada por TLR" o "trastorno mediado por TLR" en general significa cualquier afección patológica para la cual la activación de uno o más TLR sea un factor contribuyente. Dichas afecciones incluyen, entre

otras, cáncer, enfermedades o trastornos autoinmunitarios, inflamación de las vías respiratorias, enfermedades o trastornos inflamatorios, enfermedades infecciosas, trastornos de la piel, alergias, asma o enfermedades causadas por un patógeno.

5 El término “fisiológicamente aceptable” en general se refiere a un material que no interfiere con la efectividad de un compuesto o composición IRO divulgado en el presente documento y que es compatible con un sistema biológico como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Preferiblemente, el sistema biológico es un organismo vivo, tal como un vertebrado o mamífero.

10 El término “vehículo” en general abarca cualquier excipiente, diluyente, relleno, sal, tampón, estabilizador, solubilizador, aceite, lípido, vesícula que contiene lípidos, microesferas, encapsulación liposómica u otro material bien conocido en la técnica para uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del vehículo, excipiente o diluyente dependerán de la vía de administración para una aplicación particular. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describe, por ejemplo, en
15 Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

El término “coadministración” en general se refiere a la administración de al menos dos sustancias diferentes suficientemente cercanas en el tiempo para modular, suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria. La administración conjunta se refiere a la administración simultánea, así como al orden temporalmente espaciado de hasta varios días,
20 de al menos dos sustancias diferentes en cualquier orden, ya sea en una dosis única o en dosis separadas.

El término “complementario” en general significa tener la capacidad de hibridar con un ácido nucleico. Dicha hibridación es en general el resultado del enlace de hidrógeno entre cadenas complementarias, preferiblemente para formar pares de bases de Watson-Crick o Hoogsteen, aunque otros modos de enlace de hidrógeno, así como el apilamiento de
25 bases, también pueden conducir a la hibridación.

El término “cantidad efectiva” o “cantidad suficiente” en general se refiere a una cantidad suficiente para afectar un efecto biológico deseado, como los resultados beneficiosos. Por lo tanto, una “cantidad efectiva” o “cantidad suficiente” dependerá del contexto en el que se administra. En el contexto de la administración de un compuesto o composición que modula una respuesta inmunitaria a un antígeno coadministrado, una cantidad efectiva de un compuesto o
30 composición IRO divulgada en el presente documento y antígeno es una cantidad suficiente para lograr la modulación, inhibición o supresión deseada como en comparación con la respuesta inmunitaria obtenida cuando el antígeno se administra solo. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones.

35 El término “en combinación con” en general significa en el curso del tratamiento de una enfermedad o trastorno en un paciente, administrar un compuesto o composición IRO divulgada en el presente documento y un agente útil para tratar la enfermedad o trastorno que no disminuya el efecto inhibitorio inmunitario del compuesto o composición IRO según la invención. Dicho tratamiento de combinación también puede incluir más de una administración única de un compuesto o composición IRO divulgada en el presente documento y/o independientemente un agente. La
40 administración del compuesto o composición IRO divulgada en el presente documento y/o el agente puede ser por la misma o por diferentes vías.

45 El término “individuo” o “sujeto” o “vertebrado” en general se refiere a un mamífero. Los mamíferos en general incluyen, pero no están limitados a, humanos, primates no humanos, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado, vacas, cerdos, ovejas y conejos.

El término “inhibidor de quinasa” en general se refiere a moléculas que antagonizan o inhiben la señalización celular dependiente de la fosforilación y/o las vías de crecimiento en una célula. Los inhibidores de la quinasa pueden ser naturales o sintéticos e incluyen pequeñas moléculas que tienen el potencial de ser administradas como terapias orales. Los inhibidores de la quinasa tienen la capacidad de inhibir rápida y específicamente la activación de las moléculas de quinasa diana. Las proteínas quinasas son dianas farmacológicas atractivas, en parte porque regulan una amplia variedad de vías de señalización y crecimiento e incluyen muchas proteínas diferentes. Como tales, tienen un gran potencial en el tratamiento de enfermedades que involucran la señalización de la quinasa, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos inflamatorios, diabetes, degeneración macular y trastornos neurológicos.
50 Los ejemplos de inhibidores de la quinasa incluyen sorafenib (Nexavar®), Sutent®, dasatinib, Dasatinib™, Zactima™, Tykerb™ y STI571.

55 El término “nucleósido” en general se refiere a compuestos que consisten en un azúcar, en general ribosa o desoxirribosa, y una base de purina o pirimidina.

60 El término “nucleótido” en general se refiere a un nucleósido que comprende un grupo fosfato unido al azúcar.

65 Como se usa en el presente documento, el término “nucleósido de pirimidina” se refiere a un nucleósido en el que el componente base del nucleósido es una base de pirimidina (por ejemplo, citosina (C) o timina (T) o Uracilo (U)). De manera similar, el término “nucleósido de purina” se refiere a un nucleósido en el que el componente base del nucleósido es una base de purina (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)).

5 Los términos “análogo” o “derivado” se pueden usar intercambiables para referirse en general a cualquier nucleótido o nucleósido de purina y/o pirimidina que tenga una base y/o azúcar modificada. Una base modificada es una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo. Un azúcar modificado es cualquier azúcar que no sea ribosa o 2'-desoxirribosa y se puede usar en el esqueleto para un oligonucleótido.

El término “inhibir” o “suprimir” en general se refiere a una disminución o prevención de una respuesta o diferencia cualitativa en una respuesta, que podría surgir de la provocación y/o estimulación de una respuesta.

10 El término “enlazador no nucleotídico” en general se refiere a cualquier enlace o fracción que pueda enlazarse o estar enlazada a los oligonucleótidos, excepto a través de un enlace que contiene fósforo. Preferiblemente, dicho enlazador es de aproximadamente 2 angstroms a aproximadamente 200 angstroms de longitud.

15 El término “enlace de nucleótidos” en general se refiere a un enlace directo 3'-5' que conecta directamente los grupos hidroxilo 3' y 5' de dos nucleósidos a través de un enlace que contiene fósforo.

20 Los términos “motivo de oligonucleótido” significan una secuencia de oligonucleótido, que incluye un dinucleótido seleccionado de CpG, C*pG, C*pG* or CpG*. Los términos CpG, C*pG, C*pG* y CpG* se refieren a motivos oligonucleotídicos que son inmunoestimulantes en los que C es citosina, C* es un análogo o derivado de citosina, G es una guanina y G* es un análogo o derivado de guanina .

25 Un “motivo oligonucleótido que sería inmunoestimulador, pero para una o más modificaciones” significa un motivo oligonucleótido que es inmunoestimulante en un oligonucleótido primario, pero no en un oligonucleótido derivado, en el que el oligonucleótido derivado se basa en el oligonucleótido principal, pero tiene una o más modificaciones. En otras palabras, un “motivo oligonucleotídico que sería inmunoestimulador, pero para una o más modificaciones” se refiere a una fracción inductora de TLR9 que tendría actividad agonista de TLR9, pero por el hecho de que se ha bloqueado o inhibido funcionalmente de inducir la respuesta inmunitaria mediada por TLR9 a través de la modificación o modificaciones de la propia fracción inductora de TLR9 y/o mediante una o más modificaciones químicas dentro del compuesto basado en oligonucleótidos. Las modificaciones que inhiben la actividad de una fracción inductora de TLR9 incluyen, pero no se limitan a, 2'-OMe-ribonucleósidos, 3'-OMe-ribonucleósidos, 3-nitropirrol, 5-nitroindol, dU, β-L-desoxinucleósidos, α-desoxinucleósidos, nucleósido abásico, enlazador de propanodiol, enlazador de amino, isopropoxilo, enlazador de glicerol, ADN de 2'-5', ARN de 2'-5' y ADN de P-Me.

35 El término “tratamiento” en general se refiere a un enfoque destinado a obtener un resultado beneficioso o deseado, que puede incluir el alivio de los síntomas y/o retrasar y/o mejorar la progresión de una enfermedad o trastorno.

40 Ciertas IRO según la invención se muestran en la Tabla 2. En esta tabla, los compuestos de la IRO tienen todos los enlaces de fosforotioato (PS), excepto donde se indique con “o”. Excepto donde se indique, todos los nucleótidos son desoxirribonucleótidos.

Compuesto IRO #	Secuencia / Estructura / SEQ ID NO
1	5'-UGUCG1TTCT-X1-TCTTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 1-3'-X1-3'-SED ID NO 1-5'
2	5'-UGUCG1TTC-X1-CTTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 2-3'-X1-3'-SED ID NO 2-5'
3	5'-UGUCG1TT-X1-TTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 3-3'-X1-3'-SED ID NO 3-5'
4	5'-UGUCoG1TTCTo-Z-oTCTTG1oCUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 4-3'-Z-3'-SED ID NO 4-5'
5	5'-GUCG1TTCTT-Z-TTCTTGICUG-5'; 5'-SEQ ID NO 5-3'-Z-3'-SED ID NO 5-5'
6	5'-UGUCG2TTCT-Z-TCTTG2CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 6-3'-Z-3'-SED ID NO 6-5'
7	5'-UGUCG1 TTCT-X4-TCTTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 7-3'-X4-3'-SED ID NO 7-5'

ES 2 697 606 T3

8	5'- <u>UGUCG</u> 1TTC-X4-CTTG1 <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 8-3'-X4-3'-SED ID NO 8-5'
9	5'- <u>UGUCoG</u> 1 TTCTo-X4-oTCTTG1 o <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 9-3'-X4-3'-SED ID NO 9-5'
10	5'- <u>GUCG</u> 1TTCTT-X4-TTCTTG1 <u>CUG</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 10-3'-X4-3'-SED ID NO 10-5'
11	5'- <u>UGUCG</u> 1TT-X4-TTG1 <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 11-3'-X4-3'-SED ID NO 11-5'
12	5'- <u>UGUCG</u> 1TTC-X5-CTTG1 <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 12-3'-X5-3'-SED ID NO 12-5'
13	5'- <u>UGUCG</u> 2TTC-X5-CTTG2 <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 13-3'-X5-3'-SED ID NO 13-5'
14	5'- <u>UGUCG</u> 1TTC-X6-CTTG1 <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 14-3'-X6-3'-SED ID NO 14-5'
15	5'- <u>UGUCG</u> 2TTC-X6-CTTG2 <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 15-3'-X6-3'-SED ID NO 15-5'
16	5'- <u>UGUCG</u> 1TTCT-X7-TCTTG1 <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 16-3'-X7-3'-SED ID NO 16-5'
17	5'- <u>UGUCG</u> 2TTCT-X7-TCTTG2 <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 17-3'-X7-3'-SED ID NO 17-5'
18	5'- <u>UGUCG</u> 1TTC-X7-CTTG1 <u>CUGU</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 18-3'-X7-3'-SED ID NO 18-5'
19	5'- <u>TGUCG</u> 1TTCT-X-TCTTG1 <u>CUGT</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 19-3'-X-3'-SED ID NO 19-5'
20	5'-CTT <u>GUCG</u> 1TTCT-X-TCTTG1 <u>CUGTTC</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 20-3'-X-3'-SED ID NO 20-5'
21	5'-TT <u>GUCG</u> 1TTC-X-CTTG1 <u>CUGTT</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 21-3'-X-3'-SED ID NO 21-5'
22	5'-CTTT <u>GUCG</u> 1 TTC-X-CTTG1 <u>CUGTTTC</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 22-3'-X-3'-SED ID NO 22-5'
23	5'- <u>TGUCG</u> 1TTCT-X7-TCTTG1 <u>CUGT</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 23-3'-X7-3'-SED ID NO 23-5'
24	5'-TT <u>GUCG</u> 1 TTC-X7-CTTG1 <u>CUGTT</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 24-3'-X7-3'-SED ID NO 24-5'
25	5'- <u>GUCG</u> 1TTCTT-Z-TTCTTG1 <u>CUG</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 25-3'-Z-3'-SED ID NO 25-5'
26	5'- <u>TGUCG</u> 1TTCA-X-ACTTG1 <u>CUGT</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 26-3'-X-3'-SED ID NO 26-5'
27	5'-TCT <u>GACG</u> 1TTCT-X-TCTTG1 <u>CAGTCT</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 27-3'-X1-3'-SED ID NO 27-5'
28	5'-TCT <u>GACG</u> 2TTCT-X-TCTTG2 <u>CAGTCT</u> -5'; 5'-SEQ ID NO 28-3'-X-3'-SED ID NO 28-5'

ES 2 697 606 T3

29	5'-TTGUCG1TTA-X-ATTG1CUGTT-5'; 5'-SEQ ID NO 29-3'-X-3'-SED ID NO 29-5'
30	5'-CTCTGUCG1TTA-X-ATTG1CUGTCTC-5'; 5'-SEQ ID NO 30-3'-X-3'-SED ID NO 30-5'
31	5'-TGTC*GTTCT-X-TCTTGC*TGT-5'; 5'-SEQ ID NO 31-3'-X-3'-SED ID NO 31-5'
32	5'-TGTCGTTCT-X-TCTTGCTGT-5'; 5'-SEQ ID NO 32-3'-X-3'-SED ID NO 32-5'
33	5'-TGTC*GTTCT-X-TCTTGC*TGT-5'; 5'-SEQ ID NO 33-3'-X-3'-SED ID NO 33-5'
34	5'-TGTCGTTCT-X-TCTTGCTGT-5'; 5'-SEQ ID NO 34-3'-X-3'-SED ID NO 34-5'
35	5'-UGUCG1ACAT-X-TACAG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 35-3'-X-3'-SED ID NO 35-5'
36	5'-UGUCG1TTC-X-CTTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 36-3'-X-3'-SED ID NO 36-5'
37	5'-UGUCG1TT-X-TTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 37-3'-X-3'-SED ID NO 37-5'
38	5'-UoGUCG1TTCTo-X-oTCoTTG1CUGoU-5'; 5'-SEQ ID NO 38-3'-X-3'-SED ID NO 38-5'
39	5'-UoGoUCG1TTCTo-X-oTCTTG1CUoGoU-5'; 5'-SEQ ID NO 39-3'-X-3'-SED ID NO 39-5'
40	5'-UGACG1TTCT-X-TCTTG1CAGU-5'; 5'-SEQ ID NO 40-3'-X-3'-SED ID NO 40-5'
41	5'-UGUCG1ACAT-Z-TACAG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 41-3'-Z-3'-SED ID NO 41-5'
42	5'-UGUCG1TTCT-Z-TCTTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 42-3'-Z-3'-SED ID NO 42-5'
43	5'-UGUCG1TTC-Z-CTTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 43-3'-Z-3'-SED ID NO 43-5'
44	5'-UGUCG1TT-Z-TTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 44-3'-Z-3'-SED ID NO 44-5'
45	5'-UGUC*GTTCT-X-TCTTGC*UGU-5'; 5'-SEQ ID NO 45-3'-X-3'-SED ID NO 45-5'
46	5'-T^G^T^C*GTTCT-X-TCTTGC*T^G^T^A-5'; 5'-SEQ ID NO 46-3'-X-3'-SED ID NO 46-5'
47	5'-UGUC*GTTCT-X-TCTTGC*UGU-5'; 5'-SEQ ID NO 47-3'-X-3'-SED ID NO 47-5'
48	5'-T^G^T^C*GTTCT-X-TCTTGC*T^G^T^A-5'; 5'-SEQ ID NO 48-3'-X-3'-SED ID NO 48-5'
49	5'-UGUCG1ACAT-X1-TACAG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 49-3'-X1-3'-SED ID NO 49-5'

ES 2 697 606 T3

50	5'-UGACG2TTCT-X-TCTTG2CAGU-5'; 5'-SEQ ID NO 50-3'-X-3'-SED ID NO 50-5'
51	5'-TCTGUCG1TTCT-X-TCTTG1CUGTCT-5'; 5'-SEQ ID NO 51-3'-X-3'-SED ID NO 51-5'
52	5'-TCTGUCG2TTCT-X-TCTTG2CUGTCT-5'; 5'-SEQ ID NO 52-3'-X-3'-SED ID NO 52-5'
53	5'-UGUCG2TTCT-X-TCTTG2CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 53-3'-X-3'-SED ID NO 53-5'
54	5'-UGUCG2TT-Z-TTG2CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 54-3'-Z-3'-SED ID NO 54-5'
55	5'-TUGUCG1TTC-Z-CTTG1CUGUT-5'; 5'-SEQ ID NO 55-3'-Z-3'-SED ID NO 55-5'
56	5'-CTUGUCG1TT-Z-TTG1CUGUTC-5'; 5'-SEQ ID NO 56-3'-Z-3'-SED ID NO 56-5'
57	5'-UCG1TTCTTC-Z-CTTCTTG1CU-5'; 5'-SEQ ID NO 57-3'-Z-3'-SED ID NO 57-5'
58	5'-CTATCTGAC*GTTCTCTGT-3'; 5'-SEQ ID NO 58-3'
59	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'; 5'-SEQ ID NO 59-3'
60	5'-CTATCTGAC*GTTCTCTGT-3'; 5'-SEQ ID NO 60-3'
61	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'; 5'-SEQ ID NO 61-3'
62	5'-CTATCTG^A^CGTTCTCTGT-3'; 5'-SEQ ID NO 62-3'
63	5'-CTATCTGUC*GTTCTCTGT-3'; 5'-SEQ ID NO 63-3'
64	5'-CTATCTGUCGTTCTCTGT-3'; 5'-SEQ ID NO 64-3'
65	5'-CTATCTGUC*GTTCTCTGT-3'; 5'-SEQ ID NO 65-3'
66	5'-CTATCTGUCGTTCTCTGT-3'; 5'-SEQ ID NO 66-3'
67	5'-CTTGUC*G1TTCT-X-TCTTG1C*UGTTC-5'; 5'-SEQ ID NO 67-3'-X-3'-SED ID NO 67-5'
68	5'-CTATCTGUC*G1TTCTCTGU-3'; 5'-SEQ ID NO 68-3'
69	5'-UGUCG1TTCT-X-TCTTG1CUGU-5'; 5'-SEQ ID NO 69-3'-X-3'-SED ID NO 69-5'
70	5'-TGUC*G1TTCT-X-TCTTG1C*UGT-5'; 5'-SEQ ID NO 70-3'-X-3'-SED ID NO 70-5'

ES 2 697 606 T3

71	5'-CTTT <u>GUC</u> *G1 TTC-X-CTTG 1C* <u>UG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 71-3'-X-3'-SED ID NO 71-5'
72	5'- <u>GUC</u> *G1TTCTT-X-TTCTTG1C* <u>UG</u> -5' 5'-SEQ ID NO 72-3'-X-3'-SED ID NO 72-5'
73	5'- <u>TGUC</u> *G1TTCA-X-ACTTG1C* <u>UGT</u> -5' 5'-SEQ ID NO 73-3'-X-3'-SED ID NO 73-5'
74	5'-CTT <u>GUC</u> *G1TTCT-X1-TCTTG1C* <u>UG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 74-3'-X1-3'-SED ID NO 74-5'
75	5'-CTT <u>GUC</u> *G2TTCT-X-TCTTG2C* <u>UG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 75-3'-X-3'-SED ID NO 75-5'
76	5'-CTT <u>GUC</u> *G1 TTC-X5-CTTG1 C* <u>UG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 76-3'-X5-3'-SED ID NO 76-5'
77	5'-CTT <u>GUC</u> *G1 TTCT-X7-TCTTG1C* <u>UG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 77-3'-X7-3'-SED ID NO 77-5'
78	5'-CTTT <u>GUC</u> *oG1TTC-X-CTTG1oC* <u>UG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 78-3'-X-3'-SED ID NO 78-5'
79	5'-CTTT <u>GoUC</u> *oG1TTC-X-CTTG1oC* <u>UoG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 79-3'-X-3'-SED ID NO 79-5'
80	5'-CTT <u>GUC</u> *oG1 TTCT-X-TCTTG1 oC* <u>UG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 80-3'-X-3'-SED ID NO 80-5'
81	5'-CTT <u>GoUC</u> *oG1TTCT-X-TCTTG1oC* <u>UoG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 81-3'-X-3'-SED ID NO 81-5'
82	5'-CT <u>GUC</u> *oG1TTCTT-X-TTCTTG1oC* <u>UG</u> TC-5' 5'-SEQ ID NO 82-3'-X-3'-SED ID NO 82-5'
83	5'-CT <u>GoUC</u> *oG1TTCTT-X-TTCTTG1oC* <u>UoG</u> TC-5' 5'-SEQ ID NO 83-3'-X-3'-SED ID NO 83-5'
84	5'- <u>UGUC</u> *G1TTCT-X1-TCTTG1C* <u>UGU</u> -5' 5'-SEQ ID NO 84-3'-X1-3'-SED ID NO 84-5'
85	5'- <u>UGUC</u> *G2TTCT-X-TCTTG2C* <u>UGU</u> -5' 5'-SEQ ID NO 85-3'-X-3'-SED ID NO 85-5'
86	5'- <u>UGUC</u> *G1TTC-X5-CTTG1C* <u>UGU</u> -5' 5'-SEQ ID NO 86-3'-X5-3'-SED ID NO 86-5'
87	5'- <u>UGUC</u> *G1TTCT-X7-TCTTG1C* <u>UGU</u> -5' 5'-SEQ ID NO 87-3'-X7-3'-SED ID NO 87-5'
88	5'-CTATCT <u>GUC</u> *G1TTCTCTGT-3' 5'-SEQ ID NO 88-3'
89	5'-CTATCT <u>GUC</u> *G1TTCTCTGT-3' 5'-SEQ ID NO 89-3'
90	5'- <u>TGAC</u> *G1TTCT-X-TCTTG1C* <u>AGT</u> -5' 5'-SEQ ID NO 90-3'-X-3'-SEQ ID NO 90-5'
91	5'-CTT <u>GAC</u> *G1TTCT-X-TCTTG1C* <u>AGT</u> TC-5' 5'-SEQ ID NO 91-3'-X-3'-SED ID NO 91-5'

ES 2 697 606 T3

92	5'-CTTT <u>GAC</u> *G1 TTC-X-CTTG 1C* <u>AG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 92-3'-X-3'-SED ID NO 92-5'
93	5'- <u>GAC</u> *G1TTCTT-X-TTCTTG1C* <u>AG</u> -5' 5'-SEQ ID NO 93-3'-X-3'-SED ID NO 93-5'
94	5'- <u>TGAC</u> *G1TTCA-X-ACTTG1C* <u>AGT</u> -5' 5'-SEQ ID NO 94-3'-X-3'-SED ID NO 94-5'
95	5'-CTT <u>GAC</u> *G1TTCT-X1-TCTTG1C* <u>AGTTC</u> -5' 5'-SEQ ID NO 95-3'-X1-3'-SED ID NO 95-5'
96	5'-CTT <u>GAC</u> *G2TTCT-X-TCTTG2C* <u>AGTTC</u> -5' 5'-SEQ ID NO 96-3'-X-3'-SED ID NO 96-5'
97	5'-CTT <u>GAC</u> *G1 TTC-X5-CTTG1 C* <u>AGTTC</u> -5' 5'-SEQ ID NO 97-3'-X5-3'-SED ID NO 97-5'
98	5'-CTT <u>GAC</u> *G1TTCT-X7-TCTTG1C* <u>AGTTC</u> -5' 5'-SEQ ID NO 98-3'-X7-3'-SED ID NO 98-5'
99	5'-CTTT <u>GAC</u> *oG1TTC-X-CTTG1oC* <u>AGTTC</u> -5' 5'-SEQ ID NO 99-3'-X-3'-SED ID NO 99-5'
100	5'-CTTT <u>GoAC</u> *oG1TTC-X-CTTG1oC* <u>AoG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 100-3'-X-3'-SED ID NO 100-5'
101	5'-CTT <u>GAC</u> *oG1TTCT-X-TCTTG1oC* <u>AGTTC</u> -5' 5'-SEQ ID NO 101-3'-X-3'-SED ID NO 101-5'
102	5'-CTT <u>GoAC</u> *oG1TTCT-X-TCTTG1oC* <u>AoG</u> TTTC-5' 5'-SEQ ID NO 102-3'-X-3'-SED ID NO 102-5'
103	5'-CT <u>GAC</u> *oG1TTCTT-X-TTCTTG1oC* <u>AGTC</u> -5' 5'-SEQ ID NO 103-3'-X-3'-SED ID NO 103-5'
104	5'-CT <u>GoAC</u> *oG1TTCTT-X-TTCTTG1oC* <u>AoGTC</u> -5' 5'-SEQ ID NO 104-3'-X-3'-SED ID NO 104-5'
105	5'- <u>UGAC</u> *G1TTCT-X-TCTTG1C* <u>AGU</u> -5' 5'-SEQ ID NO 105-3'-X-3'-SED ID NO 105-5'
106	5'- <u>UGAC</u> *G1TTCT-X1-TCTTG1C* <u>AGU</u> -5' 5'-SEQ ID NO 106-3'-X1-3'-SED ID NO 106-5'
107	5'- <u>UGAC</u> *G2TTCT-X-TCTTG2C* <u>AGU</u> -5' 5'-SEQ ID NO 107-3'-X-3'-SED ID NO 107-5'
108	5'- <u>UGAC</u> *G1TTC-X5-CTTG1C* <u>AGU</u> -5' 5'-SEQ ID NO 108-3'-X5-3'-SED ID NO 108-5'
109	5'- <u>UGAC</u> *G1TTCT-X7-TCTTG1C* <u>AGU</u> -5' 5'-SEQ ID NO 109-3'-X7-3'-SED ID NO 109-5'
110	5'-CTATCT <u>GAC</u> *G1TTCTCTGT-3' 5'-SEQ ID NO 110-3'
111	5'-CTATCT <u>GAC</u> *G1 TTCTCTGT -3' 5'-SEQ ID NO 111-3'
112	5'-CTATCT <u>GAC</u> *G1TTCTCT <u>GU</u> -3' 5'-SEQ ID NO 112-3'

G1 = 7-deaza-dG; G2 = AraG; C* = 5-Me-dC; C* = 2'-O-Me-5-Me-C; A[^]/G[^]/T[^]/G[^] = 2'-O-(2-metoxietil)-ribonucleótidos; X = Enlazador de Glicerol (también conocido como Enlazador 1,2,3-Propanotriol); X1 = 1,2,4-Enlazador Butanetriol; Z = Enlazador 1,3,5 Pentanotriol; X4 = Enlazador 3-Trimetilamino-1,2-propanediol; X5 = Enlazador Bis-1,5-O-(3'-timidil)-1,3,5-pentanotriol; X6 = Enlazador Bis-1,5-O-[3'-(1,2-didesoxi-D-ribosil)]-1,3,5-pentanotriol; X7 = Enlazador 3-(2-Hidroxietil)-1,5-pentanodiol; G/U/A/C = 2'-O-Me-ribonucleótidos; o = Enlazador Fosfodiéster.

En un primer aspecto, la divulgación proporciona compuestos de oligonucleótidos reguladores inmunitarios (IRO). El término "IRO" se refiere a un compuesto a base de oligonucleótidos reguladores inmunitarios que es un antagonista de TLR7 y/o TLR9, en donde el compuesto comprende un motivo oligonucleótido y al menos una modificación, en el que el motivo oligonucleótido sería inmunoestimulante pero para una o más modificaciones que bloquean o inhiben funcionalmente la actividad del motivo oligonucleótido, siempre que el compuesto contenga menos de 4 nucleótidos de guanosina consecutivos y preferiblemente menos de 3 nucleótidos de guanosina consecutivos. Dichas modificaciones pueden estar en el terminal 5' del oligonucleótido, en la secuencia 5' que flanquea el motivo del oligonucleótido, y/o dentro del motivo del oligonucleótido inmunoestimulador. Estas modificaciones dan como resultado un compuesto IRO que antagoniza, inhibe, suprime o previene la estimulación inmunitaria mediada por TLR7 y/o TLR9. Dichas modificaciones pueden ser a las bases, residuos de azúcar y/o a la estructura principal de fosfato de los nucleótidos/nucleósidos que flanquean el motivo de oligonucleótido inmunoestimulador o dentro de dicho motivo de oligonucleótido.

La estructura general del compuesto IRO tiene la estructura 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3' en la que CG es un motivo oligonucleótido seleccionado de CpG, C*pG, C*pG* o CpG* en donde C es citosina, C* es un análogo o derivado de citosina, G es una guanina y G* es un análogo o derivado de guanina; N₁-N₃, en cada aparición, es independientemente un nucleótido o derivado de nucleótido; N¹-N³, en cada aparición, es independientemente un nucleótido o derivado de nucleótido; N_m y N^m, en cada aparición, son independientemente un nucleótido, derivado de nucleótido o enlazador no nucleótido; siempre que al menos uno de N₁, N₂ y N₃ y/o C y/o G del motivo oligonucleótido sea un derivado de nucleótido que bloquee o inhiba funcionalmente la actividad del motivo oligonucleótido; y además siempre que el compuesto contenga menos de 4 nucleótidos de guanosina consecutivos y preferiblemente menos de 3 guanosinas consecutivas, en donde la actividad estimulante inmunitaria del motivo oligonucleótido es antagonizada, inhibida, suprimida o prevenida por el derivado de nucleótido; y en el que m es un número de 0 a aproximadamente 30.

Preferiblemente, N₁ es un derivado de nucleótido que bloquee o inhiba funcionalmente la actividad del motivo oligonucleótido. Preferiblemente, N₁ y N₂, o N₁ y N₃, o N₂ y N₃, o N₁, N₂ y N₃ son derivados de nucleótidos que bloquean o inhiben funcionalmente la actividad del motivo oligonucleótido.

Preferiblemente, el compuesto IRO no es un oligonucleótido antisentido.

El compuesto IRO puede comprender al menos dos oligonucleótidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 oligonucleótidos), en el que al menos dos oligonucleótidos están unidos covalentemente a través de un nucleótido directo al enlace de nucleótido en su terminal 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o nucleobase modificada o a través de un enlazador no nucleotídico en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o nucleobase modificada. Preferiblemente, al menos uno de los oligonucleótidos del compuesto IRO tiene la estructura 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3', en la que N_m, N₁, N₂, N₃, C, G, N¹, N², N³ y N^m son los descritos anteriormente para la estructura general del compuesto IRO. Más preferiblemente, al menos dos de los oligonucleótidos del compuesto IRO tienen la estructura 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3', en el que N_m, N₁, N₂, N₃, C, G, N¹, N², N³ y N^m son los descritos anteriormente para la estructura general del compuesto IRO. Un compuesto IRO de este tipo puede tener la estructura 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3'-X-3'-N^m-N³N²N¹GCN₁N₂N₃-N_m-5', donde X es un enlace nucleotídico o un enlazador no nucleótido y N_m, N₁, N₂, N₃, C, G, N¹, N², N³ y N^m son como se describió anteriormente para la estructura general del compuesto IRO.

Opcionalmente, el compuesto IRO que es un antagonista de TLR7 y/o TLR9 tiene la estructura 5'-N_pN₃N₂N₁C*G*N¹N²N³N⁴N⁵-3', en el que C*G* es un motivo oligonucleótido en el que C* es 5-Me-dC, y G* es 7-deaza-dG; N₁-N₂, en cada aparición, es independientemente un ribonucleótido 2'-O-Me; N³, en cada aparición, es independientemente un nucleótido o derivado de nucleótido; N¹-N³, en cada aparición, es independientemente un nucleótido o derivado de nucleótido; N_p y N², en cada aparición, es independientemente un nucleótido o derivado de nucleótido; N⁴-N⁵, en cada aparición, es independientemente un ribonucleótido 2'-O-Me; p es un número de 0 a aproximadamente 30 y z es un número de 0 a aproximadamente 30; siempre que el compuesto contenga menos de 3 guanosinas consecutivas. Opcionalmente, p y z son independientemente un número de 1 a aproximadamente 20. Opcionalmente, p y z son independientemente un número de 2 a aproximadamente 15. Opcionalmente, p y z son independientemente un número de 3 a aproximadamente 10.

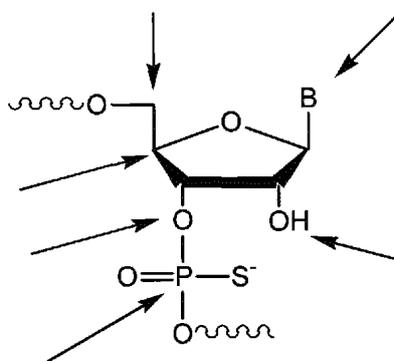
Opcionalmente, el compuesto IRO que es un antagonista de TLR7 y/o TLR9 tiene la estructura 5'-N_pN₃N₂N₁C*G*N¹N²N³N⁴N⁵-3', en donde C*G* es un motivo oligonucleótido en donde C* es 5-Me-dC, y G* es 7-deaza-dG; N₁-N₂, en cada aparición, es independientemente un ribonucleótido 2'-O-Me; N³, en cada aparición, es independientemente un nucleótido; N¹-N³, en cada aparición, es independientemente un nucleótido; N_p y N², en cada

aparición, es independientemente un nucleótido; N⁴-N⁵ en cada aparición es independientemente un ribonucleótido 2'-O-Me; p es 5 y z es 3; siempre que el compuesto contenga menos de 3 guanosinas consecutivas.

Preferiblemente, dos oligonucleótidos que tienen la estructura 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3', están unidos covalentemente a través de un nucleótido directo al enlace de nucleótidos en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o nucleobase modificada o a través de un enlazador no nucleotídico en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o nucleobase modificada. Preferiblemente, el compuesto IRO tiene la estructura 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3'-X-3'-N^m-N³N²N¹GCN₁N₂N₃-N_m-5', en la que X es un enlace de nucleótido o un enlazador no nucleotídico y N_m, N₁, N₂, N₃, C, G, N¹, N², N³ y N^m son como se describió anteriormente para la estructura general del compuesto IRO. Preferiblemente, los dos oligonucleótidos están unidos covalentemente directamente a través de un enlace de nucleótido. Más preferiblemente, los dos oligonucleótidos están unidos covalentemente a través de un enlazador no nucleotídico.

Como ejemplo no limitante, el enlazador no nucleotídico que enlaza covalentemente los dos oligonucleótidos puede unirse al 3'-hidroxilo del azúcar, en el que el enlazador comprende un grupo funcional, que está unido al 3'-hidroxilo por medio de un enlace basado en fosfato como, por ejemplo, fosfodiéster, fosfortioato, fosforoditioato, metilfosfonato, o por un enlace no basado en fosfato. Los posibles sitios de conjugación para el enlazador al extremo 3' del oligonucleótido se indican en la Fórmula I, a continuación, en donde B representa una base heterocíclica y en donde la flecha que apunta a P indica cualquier unión a fósforo.

Fórmula I



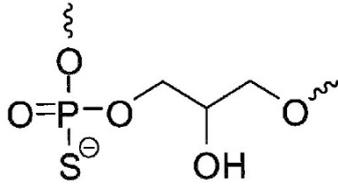
Opcionalmente, el enlazador no nucleotídico es una molécula pequeña, macromolécula o biomolécula, que incluye, sin limitación, polipéptidos, anticuerpos, lípidos, antígenos, alérgenos y oligosacáridos. Opcionalmente, el enlazador no nucleotídico es una molécula pequeña. Para los fines de la divulgación, una molécula pequeña es una fracción orgánica que tiene un peso molecular inferior a 1.000 Da. Opcionalmente, la molécula pequeña tiene un peso molecular inferior a 750 Da.

Opcionalmente, la molécula pequeña es un hidrocarburo alifático o aromático, cualquiera de los cuales puede incluir opcionalmente, ya sea en la cadena lineal que conecta los oligonucleótidos o adjuntados a él, uno o más grupos funcionales que incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea o tiourea. La molécula pequeña puede ser cíclica o acíclica. Los ejemplos de ligadores de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, carbohidratos, ciclodextrinas, adamantano, colesterol, haptenos y antibióticos. Sin embargo, a los efectos de describir el enlazador no nucleotídico, el término "molécula pequeña" no pretende incluir un nucleósido.

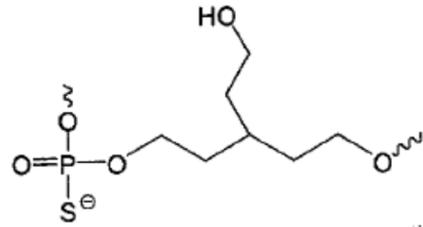
Opcionalmente, el enlazador no nucleotídico es un enlazador alquilo o enlazador amino. El enlazador de alquilo puede ser ramificado o no ramificado, cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado, quiral, aquiral o mezcla racémica. Los enlazadores de alquilo pueden tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 18 átomos de carbono. Opcionalmente, dichos enlazadores de alquilo tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 9 átomos de carbono. Opcionalmente, el enlazador de alquilo tiene menos de 3 átomos de carbono. Alternativamente, el enlazador de alquilo tiene al menos 3 átomos de carbono y preferentemente más de tres átomos de carbono. Algunos enlazadores de alquilo incluyen uno o más grupos funcionales que incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea y tioéter. Dichos enlazadores de alquilo pueden incluir, pero no se limitan a, 1,2 propanodiol, 1,2,3 propanetriol, 1,3 propanodiol, 1,2,4-butanetriol, 1,3,5-pentanotriol, 3-trimetilamino-1,2-propanodiol, Bis-1,5-O-(3'timidil(-1,3,5-pentanotriol, Bis-1,5-O- [3'-(1,2-didesoxi-D-robosil)]-1,3,5-pentanotriol, 3-(2-hidroxiethyl)-1,5-pentanodiol, trietilenglicol hexaetilenglicol, enlazadores polietilenglicol (por ejemplo, [-O-CH₂-CH₂-]_n (n=1-9)), enlazadores metilo, enlazadores etilo, enlazadores propilo, enlazadores butilo o enlaces hexilo. Opcionalmente, dichos enlazadores de alquilo pueden incluir péptidos o aminoácidos.

Opcionalmente, el enlazador no nucleotídico puede incluir, pero no se limita a, los enumerados en la Tabla 3.

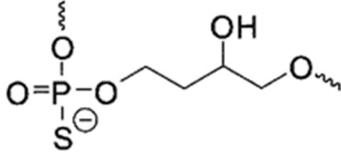
Tabla 3: Enlazadores no nucleotídicos representativos



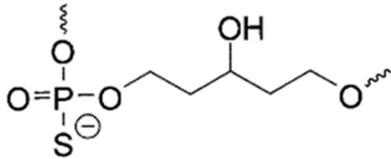
Enlazador 1,2,3-Propanodiol (glicerol)



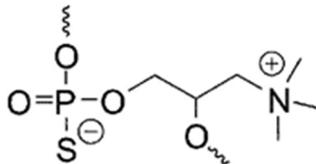
Enlazador 3-(2-Hidroxietyl)-1,5-pentanediol



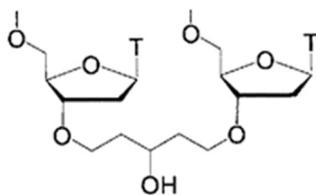
Enlazador 1,2,4-Butanotriol



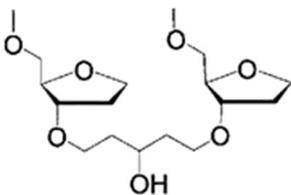
Enlazador 1,3,5-Pentanotriol



Enlazador 3-Trimetilamino-1,2-propanediol



Enlazador Bis-1,5-O-(3'-timidil)-1,3,5-pentanotriol



Enlazador Bis-1,5-O-[3'-(1,2-dideoxi-D-ribosil)]-1,3-5-pentanotriol

Opcionalmente, el enlazador de molécula pequeña es glicerol o un homólogo de glicerol de fórmula HO-(CH₂)_o-CH(OH)-(CH₂)_p-OH, en donde o y p son independientemente números enteros de 1 a aproximadamente 6, de 1 a

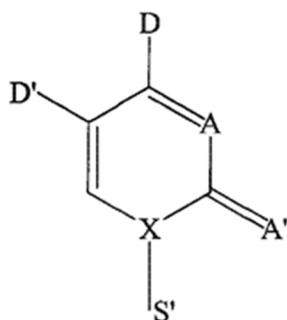
aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3. Alternativamente, el enlazador de molécula pequeña es un derivado del 1,3-diamino-2-hidroxipropano. Algunos de estos derivados tienen la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$, en donde m es un número entero de 0 a aproximadamente 10, de 0 a aproximadamente 6, de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 4.

Algunos enlazadores no nucleotídicos divulgados en el presente documento permiten la unión de más de dos oligonucleótidos. Por ejemplo, el glicerol enlazador de molécula pequeña tiene tres grupos hidroxilo a los que los oligonucleótidos pueden unirse covalentemente. Algunos IRO divulgados en el presente documento, por lo tanto, comprenden dos o más oligonucleótidos unidos a un nucleótido o un enlazador no nucleotídico. Dichas IRO se denominan "ramificadas".

Los compuestos IRO también pueden comprender al menos dos oligonucleótidos ligados de manera no covalente, tales como por interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, interacciones de apilamiento π , enlaces de hidrógeno y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de dicho enlace no covalente incluyen el emparejamiento de bases de Watson-Crick, el emparejamiento de bases de Hoogsteen y el apilamiento de bases.

Preferiblemente, uno de los oligonucleótidos del compuesto IRO no es un oligonucleótido antisentido. Más preferiblemente, ninguno de los oligonucleótidos del compuesto IRO es un oligonucleótido antisentido.

Opcionalmente, los nucleósidos de pirimidina en los oligonucleótidos reguladores inmunitarios usados en las composiciones y métodos divulgados en el presente documento tienen la estructura (II):



(II)

en el que:

D es un donante de enlaces de hidrógeno;

D' se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, donador de enlaces de hidrógeno, aceptor de enlaces de hidrógeno, grupo hidrófilo, grupo hidrófobo, grupo de extracción de electrones y grupo donante de electrones;

A es un aceptor de enlaces de hidrógeno o un grupo hidrófilo;

A' se selecciona del grupo que consiste en un aceptor de enlaces de hidrógeno, un grupo hidrófilo, un grupo hidrófobo, un grupo de extracción de electrones y un grupo donante de electrones;

X es carbono o nitrógeno; y

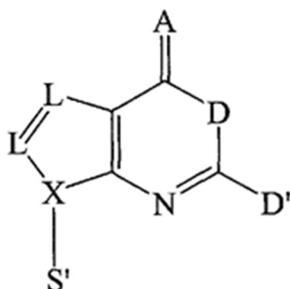
S' es un anillo de azúcar pentosa o hexosa, o un análogo de azúcar.

Opcionalmente, el anillo de azúcar se deriva con una fracción fosfato, una fracción fosfato modificado, u otra fracción de enlazador adecuado para unir el nucleósido pirimidina a otro nucleósido o análogo de nucleósido.

Opcionalmente, los donantes de enlaces de hidrógeno incluyen, sin limitación, -NH-, -NH₂, -SH y -OH. Los aceptadores de enlaces de hidrógeno preferidos incluyen, sin limitación, C=O, C=S y los átomos de nitrógeno del anillo de un heterociclo aromático, por ejemplo, N3 de citosina.

Opcionalmente, la estructura (II) es un derivado de nucleósido pirimidina. Los ejemplos de derivados de nucleósidos de pirimidina incluyen, sin limitación, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, N4-alkilcitosina o N4-etilcitosina, araC, 5-OH-dC, N3-Me-dC, 2'-O-Me-C, 2'-O-Me-U, 2'-O-Me-T y 4-tiouracilo. Los derivados modificados químicamente también incluyen, pero no se limitan a, timina o análogos de uracilo. Opcionalmente, la fracción de azúcar S' en (II) es un derivado de azúcar. Los derivados de azúcar adecuados incluyen, pero no se limitan a, derivados de trehalosa o trehalosa, hexosa o derivados de hexosa, arabinosa o derivados de arabinosa.

Opcionalmente, los nucleósidos de purina en oligonucleótidos reguladores inmunitarios usados en las composiciones y métodos divulgados en el presente documento tienen la estructura (III):



(III)

- 5 en el que:
- D es un donante de enlaces de hidrógeno;
- 10 D' se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, donador de enlaces de hidrógeno y un grupo hidrófilo;
- A es un aceptor de enlaces de hidrógeno o un grupo hidrófilo;
- X es carbono o nitrógeno;
- 15 cada L se selecciona independientemente del grupo que consiste en C, O, N y S; y
- S' es un anillo de azúcar pentosa o hexosa, o un análogo de azúcar.
- 20 Opcionalmente, el anillo de azúcar se deriva con una fracción fosfato, una fracción fosfato modificada, u otra fracción enlazadora adecuada para unir el nucleósido pirimidina a otro nucleósido o análogo de nucleósido.
- Opcionalmente, los donantes de enlaces de hidrógeno incluyen, sin limitación, -NH-, -NH₂-, -SH y -OH. Opcionalmente, los aceptadores de enlaces de hidrógeno incluyen, sin limitación, C=O, C=S, -NO₂ y los átomos de nitrógeno del anillo de un heterociclo aromático, por ejemplo, N1 de guanina.
- 25 Opcionalmente, la estructura (III) es un derivado de nucleósido de purina. Los ejemplos de derivados de nucleósidos de purina incluyen, sin limitación, análogos de guanina tales como 7-deaza-G, 7-deaza-dG, ara-G, 6-tio-G, inosina, Iso-G, loxoribina, TOG (7-tio- 8-oxo)-G, 8-bromo-G, 8-hidroxi-G, 5-aminoformicina B, oxoformicina, 7-metil-G, 9-p-clorofenil-8-aza-G, 9-fenil-G, 9-hexil-guanina, 7-deaza-9-bencil-G, 6-cloro-7-deazaguanina, 6-metoxi-7-deazaguanina, 8-Aza-7-deaza-G (PPG), 2-(dimetilamino)guanosina, 7-metil-6-tioguanosina, 8-benciloxiguanosina, 9-deazaguanosina, 1-(BD-ribofuranosil)-2-oxo-7-desza-8-metil-purina, 1-(2'-desoxi-(3-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-O-metil-G y N1-Me-dG. Los derivados modificados químicamente también incluyen, pero no se limitan a, análogos de adenina tales como 9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)adenina, 2-Amino-N2-O-, metiladenosina, 8-Aza-7-deaza-A, 7-deaza-A, Vidarabina, 2-Aminoadenosina, N1-Metiladenosina, 8-Azaadenosina, 5-Yodotubercidina y 2'-O-Me-A. En algunas realizaciones, la fracción azúcar S' en (II I) es un derivado del azúcar como se define para la Fórmula II.
- 30 Opcionalmente, el ácido nucleico inmunorregulador comprende una secuencia de ácido nucleico que contiene al menos un nucleósido B-L-desoxi o nucleósido 3'-desoxi.
- Opcionalmente, el oligonucleótido inmunorregulador comprende una secuencia de ácido nucleico que contiene al menos un dinucleótido seleccionado de CpG, C*pG, C*pG* y CpG*, en donde C es citosina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2'-desoxiguanosina, C* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 5-Me-dC, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, 2'-desoxi-2'-arabinocitidina sustituida, 2'-O-arabinocitidina sustituida, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, 2'-O-ribonucleótidos sustituidos (incluidos, entre otros, 2'-O-Me-5-Me-C, 2'-O-(2-metoxietil)-ribonucleótidos o 2'-O-Me-ribonucleótidos) u otros análogos o derivados del nucleósido pirimidina, G* es 2'-desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, 2'-desoxi-2'arabinoguanosina sustituida, 2'-O-arabinoguanosina sustituida, 2'-desoxiinosina, ribonucleótidos 2'-O-sustituidos (incluidos, entre otros, 2'-O-(2-metoxietil)-ribonucleótidos; o 2'-O-Me-ribonucleótidos u otros análogos de nucleósidos de purina o derivados, y p es un enlace internucleósido seleccionado del grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato y fosforoditioato, y en el que la actividad de al menos un dinucleótido está regulada por la secuencia de flaqueo.
- 45 Opcionalmente, los oligonucleótidos del compuesto IRO tienen cada uno de aproximadamente 6 a aproximadamente 35 residuos de nucleósidos, preferiblemente de aproximadamente 9 a aproximadamente 30 residuos de nucleósidos,
- 50
- 55

más preferiblemente de aproximadamente 11 a aproximadamente 23 residuos de nucleósidos. Opcionalmente, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 18 residuos de nucleótidos.

5 Opcionalmente, los compuestos IRO se pueden combinar con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas de TLR, antagonistas de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o inhibidores de la quinasa para mejorar la especificidad o la magnitud de la respuesta inmunitaria, o moléculas coestimulantes como citoquinas, quimiocinas, ligandos de proteínas, factores transactivadores, péptidos y péptidos que comprenden aminoácidos modificados.

10 En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto IRO divulgado en el presente documento y un vehículo fisiológicamente aceptable.

15 Opcionalmente, la composición puede comprender además una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonista de TLR, antagonista de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o inhibidores de la quinasa para mejorar la especificidad o la magnitud de la respuesta inmunitaria, o moléculas coestimuladoras como citoquinas, quimiocinas, ligandos de proteínas, factores transactivadores, péptidos y péptidos que comprenden aminoácidos modificados.

20 En un tercer aspecto, la divulgación proporciona métodos para inhibir o suprimir la inducción mediada por TLR de una respuesta inmunitaria en un mamífero, dichos métodos comprenden administrar al mamífero un compuesto IRO divulgado en el presente documento. Opcionalmente, el mamífero es un humano. Preferiblemente, el compuesto IRO se administra a un mamífero que necesita una supresión inmunitaria.

25 De acuerdo con este aspecto de la divulgación, un compuesto IRO es capaz de suprimir una respuesta inmunitaria basada en TLR a un ligando TLR adicional o agonista de TLR. Como se explica con más detalle en los ejemplos a continuación, la activación de una respuesta inmunitaria basada en TLR por un agonista de TLR o un ligando de TLR (por ejemplo, un oligonucleótido estimulante inmune) puede ser antagonizada, inhibida, suprimida o prevenida por la administración previa o posterior simultánea de un compuesto IRO, y dicho antagonismo, inhibición, supresión o prevención puede mantenerse durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, días) después de la administración. Esta propiedad beneficiosa divulgada tiene una ventaja única para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, la aplicación de ciertos agonistas de TLR en el curso del tratamiento de la enfermedad puede causar una estimulación inmunitaria no deseada que un compuesto IRO podría antagonizar, suprimir, inhibir o prevenir. La administración simultánea de la IRO, la administración previa y/o posterior del agonista de TLR puede permitir los beneficios terapéuticos del agonista de TLR mientras antagoniza, suprime, inhibe o evita los efectos secundarios no deseados. Además, la administración previa de un compuesto IRO divulgado en el presente documento podría antagonizar, suprimir, inhibir o prevenir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una reacción alérgica) a un desafío subsiguiente o posterior por parte de un agonista de TLR. Preferiblemente un agonista de TLR7 y/o TLR9.

40 En los métodos de acuerdo con este aspecto de la divulgación, la administración del compuesto IRO divulgado en el presente documento puede ser por cualquier vía adecuada, que incluyen, sin limitación, administración parenteral, mucosa, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, intragástrica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, por pistola génica, parche dérmico o en forma de gotas oculares o enjuagues bucales. La administración de las composiciones terapéuticas del compuesto IRO puede llevarse a cabo usando procedimientos conocidos en dosis y durante períodos de tiempo eficaces para reducir los síntomas o marcadores sustitutos de la enfermedad. Cuando se administra de forma sistémica, la composición terapéutica se administra preferiblemente en una dosis suficiente para alcanzar una concentración en sangre del compuesto IRO desde aproximadamente 0.0001 micromolar hasta aproximadamente 100 micromolar. Más preferiblemente, la administración sistémica sería a una dosis suficiente para alcanzar una concentración en sangre del compuesto IRO de aproximadamente 0.001 micromolar a aproximadamente 10 micromolar. Para la administración localizada, concentraciones mucho más bajas que esto pueden ser efectivas, y concentraciones más altas pueden ser toleradas. Preferiblemente, una dosis total de compuesto IRO varía de aproximadamente 0.001 mg por paciente por día a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por día. Puede ser deseable administrar el compuesto IRO divulgado en el presente documento diariamente, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días o semanalmente. Puede ser deseable administrar simultáneamente, o secuencialmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de las composiciones terapéuticas que contienen IRO divulgadas en el presente documento a un individuo como un único episodio de tratamiento.

60 El compuesto IRO puede estar vinculado opcionalmente a uno o más alérgenos y/o antígenos (propios o extraños), una proteína inmunogénica, como la hemocianina de lapa californiana (KLH), la subunidad B de toxina del cólera o cualquier otra proteína portadora inmunogénica. La IRO también se puede usar en combinación con otros compuestos (por ejemplo, adyuvantes) que incluyen, sin limitación, agonistas de TLR (por ejemplo, agonistas de TLR2, agonistas de TLR4 y agonistas de TLR9, adyuvante incompleto de Freund, KLH, lípido A monofosforilo (MPL), adyuvante de alumbre de merck (MAA), y saponinas, que incluyen QS-21 e imiquimod, o combinaciones de las mismas.

65

Los métodos divulgados en el presente documento son útiles para estudios de modelos del sistema inmunitario. Los métodos también son útiles para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades humanas o animales. Por ejemplo, los métodos son útiles para aplicaciones de vacunas pediátricas, para adultos y veterinarias.

5 En un cuarto aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar terapéuticamente a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, dichos métodos comprenden administrar al paciente un compuesto IRO divulgado en el presente documento. Opcionalmente, la enfermedad o trastorno a tratar es cáncer, un trastorno autoinmunitario, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, malaria, enfermedad de Lyme, infecciones oculares, conjuntivitis, trastornos de la piel, psoriasis, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, síndrome de fatiga crónica, sarcoidosis, rechazo de trasplante, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Los trastornos autoinmunitarios preferidos incluyen sin limitación el lupus eritematoso, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus tipo I, el síndrome del intestino irritable, la enfermedad de Chron, la artritis reumatoide, el shock séptico, la alopecia universal, la encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad de Behçet, hipersensibilidad, enfermedad inflamatoria del intestino, lesión por reperusión, artritis reumatoide, rechazo de trasplantes, colitis ulcerosa, uveítis, conjuntivitis y vasculitis. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones. La administración se lleva a cabo como se describe para el tercer aspecto de la divulgación.

En un quinto aspecto, la invención proporciona métodos para prevenir una enfermedad o trastorno, dichos métodos comprenden la administración al paciente un compuesto IRO como se describe en el presente documento. Opcionalmente, la enfermedad o trastorno a prevenir es cáncer, un trastorno autoinmunitario, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, malaria, enfermedad de Lyme, infecciones oculares, conjuntivitis, trastornos de la piel, psoriasis, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, síndrome de fatiga, sarcoidosis, rechazo de trasplante, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Los trastornos autoinmunitarios preferidos incluyen sin limitación lupus eritematoso, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Chron, artritis reumatoide, shock séptico, alopecia universal, encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, penfigoide vesicular, enfermedad de chagas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad celiaca, dermatomiositis, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial, esclerodermia localizada, miastenia gravis, narcolepsia, neuromiotonía, pénfigo, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, esquizofrenia, síndrome de Sjögren, arteritis temporal ("arteritis de células gigantes"), vasculitis, vitiligo, vulvodinia y granulitis de Wegener. Las enfermedades y trastornos inflamatorios preferidos incluyen, sin limitación, inflamación de las vías respiratorias, asma, enfermedades autoinmunitarias, inflamación crónica, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino, lesión por reperusión, artritis reumatoide, rechazo de trasplantes, colitis ulcerosa, uveítis, conjuntivitis y vasculitis. La administración se lleva a cabo como se describe para el tercer aspecto de la divulgación.

En cualquiera de los métodos de acuerdo con el tercer, cuarto o quinto aspecto de la divulgación, el compuesto IRO puede administrarse en combinación con cualquier otro agente útil para tratar o prevenir la enfermedad o afección que no suprima el antagonista inmunitario, inhibición, supresión o efecto de prevención o actividad del compuesto IRO. En cualquiera de los métodos de acuerdo con la invención, el agente útil para tratar o prevenir la enfermedad o afección incluye, pero no se limita a, una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonista de TLR, antagonistas de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o inhibidores de la quinasa para mejorar la especificidad o magnitud de la respuesta inmunitaria, o moléculas coestimuladoras como citoquinas, quimiocinas, ligandos de proteínas, factores transactivadores, péptidos y péptidos que comprenden aminoácidos modificados. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, se contempla que el compuesto IRO se puede administrar en combinación con uno o más compuestos quimioterapéuticos, agente terapéutico dirigido y/o anticuerpo monoclonal; Y al prevenir una enfermedad, se contempla que el compuesto IRO se puede administrar en combinación con una o más vacunas. Alternativamente, el agente puede incluir vectores de ADN que codifican antígeno o alérgeno. Opcionalmente, los compuestos IRO divulgados en el presente documento pueden actuar de forma diversa como adyuvantes y/o producir efectos moduladores inmunitarios directos.

Los siguientes ejemplos tienen la intención de ilustrar más a fondo ciertas realizaciones ejemplares de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Síntesis de oligonucleótidos que contienen fracciones reguladoras inmunitarias

5 Todos los compuestos IRO de la invención se sintetizaron de acuerdo con procedimientos estándar (véase, por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2004/0097719).

10 Los oligonucleótidos se sintetizaron en una escala de 1 µM utilizando un sintetizador de ADN automatizado ((Expedite 8909; PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.), siguiendo los procedimientos estándar de síntesis lineal o síntesis paralela (véase, por ejemplo, figuras 5 y 6 de la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2004/0097719).

15 Se obtuvieron fosforamiditas de desoxirribonucleósidos de (Aldrich-Sigma, St. Louis, MO). 1',2'-didesoxirribosa fosforamidita, propil-1-fosforamidita, 2-desoxiuridina fosforamidita, 1,3-bis-[5-(4,4'-dimetoxitritil)pentilamidil]-2-propanol fosforamidita y fosfonamidita de metilo se obtuvieron de Glen Research (Sterling, Va). La fosforamidita β-L-2'-desoxirribonucleósido, fosforamidita α-2'-desoxirribonucleósida, fosforamidita mono-DMT-glicerol y fosforamidita di-DMT-gliceramida (Willmington, Masa.). (4-Aminobutil)-1,3-propanodiol fosforamidita se obtuvo de Clontech (Palo Alto, California). La arabinoguanosina se obtuvo de Reliable Pharmaceutical (St. Louis, MO). La fosforamidita de arabinoguanosina se sintetizó en Idera Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, Mass.) (Noronha et al. (2000) Biochem., 39: 7050-7062).

20 Todas las fosforamiditas de nucleósidos se caracterizaron por los espectros de RMN ¹H y ³¹P. Los nucleósidos modificados se incorporaron en sitios específicos utilizando ciclos de acoplamiento normales. Después de la síntesis, los oligonucleótidos se desprotegeron utilizando hidróxido de amonio concentrado y se purificaron mediante HPLC de fase inversa, seguido de diálisis. Los oligonucleótidos purificados en forma de sal de sodio se liofilizaron antes de su uso. La pureza fue probada por CGE y MALDI-TOF MS.

Ejemplo 2

Inhibición de la estimulación de TLR7 y TLR9

30 Se inyectaron ratones C57BL/6 s.c. en la axila izquierda con 5 mg/kg de un compuesto IRO a las 0 horas y 0,25 mg/kg de agonista de TLR9 o 10 mg/kg de agonista de TLR7 a las 24 horas. Se tomaron muestras de suero 2 horas después de la inyección del agonista de TLR9 o TLR7 y se determinó la concentración de IL-12 mediante ELISA. Para la IRO número 40, los agonistas de TLR7 y TLR9 se administraron 72 horas después de la administración de la IRO. Los resultados para todas las IRO se muestran en las Tablas 4-11. Estos resultados demuestran que los compuestos de IRO divulgados en el presente documento pueden inhibir la actividad de TLR7 y/o TLR9 in vivo, y más en general que los compuestos de IRO divulgados en el presente documento pueden inhibir la activación de TLR.

Tabla 4. Actividad antagonista in vivo en ratones

No. Oligo	Secuencias y Modificación	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR9	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR7
1	5'-UGUCG1TTCT-X1 TCTTG1CUGU-5'	44.8	94.0
2	5'-UGUCG1TTC-X1- CTTG1CUGU-5'	69.8	91.6
3	5'-UGUCG1TT-X1-TTG1CUGU-5'	63.7	89.8
4	5'-UGUCoG1TTCTo-Z oTCTTG1oCUGU-5'	27.6	53.7
5	5'-GUCG1TTCTT-Z- TTCTTG1CUG-5'	75.9	97.1
6	5'-UGUCG2TTCT-Z- TCTTG2CUGU-5'	70.9	99.0
7	5'-UGUCG1TTCT-X4- TCTTG1CUGU-5'	83.2	92.6

8	5'-UGUC G1 TTTC-X4-CTT G1 CU <u>GU</u> -5'	68.7	78.5
9	5'-UGUC oG1 TTCTo-X4-oTCTT G1 oCU <u>GU</u> -5'	76.5	18.6
10	5'-GU C1 TTCTT-X4-TTCTT G1 CU <u>G</u> -5'	87.8	100
11	5'-UGUC G1 TT-X4-TT G1 CU <u>GU</u> -5'	31.1	56.8
12	5'-UGUC G1 TTTC-X-5CTT G1 CU <u>GU</u> -5'	7.3	80.4
13	5'-UGUC G2 TTTC-X5-CTT G2 CU <u>GU</u> -5'	48.6	98.1
14	5'-UGUC G1 TTTC-X6-CTT G1 CU <u>GU</u> -5'	64.6	92.2
15	5'-UGUC G2 TTTC-X6-CTT G2 CU <u>GU</u> -5'	57.1	99.9
16	5'-UGUC G1 TTCT-X7-TCTT G1 CU <u>GU</u> -5'	96.5	98.5
17	5'-UGUC G2 TTCT-X7-TCTT G2 CU <u>GU</u> -5'	86.2	97.3
18	5'-UGUC G1 TTTC-X7-CTT G1 CU <u>GU</u> -5'	94.0	98.1

Tabla 5. Actividad antagonista in vivo en ratones

No. Oligo	Secuencias y Modificación	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR9	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR7
19	5'-TGUC G1 TTCT-X-TCTT G1 CU <u>GT</u> -5'	45.2	89.8
20	5'-CTTGUC G1 TTCT-X-TCTT G1 CU <u>GT</u> TC-5'	74.5	77.9
21	5'-TTGU C1 TTTC-X-CTT G1 CU <u>GT</u> T-5'	66.5	86.8
22	5'-CTTTGU C1 TTTC-X-CTT G1 CU <u>GT</u> TTTC-5'	47.5	88.9
23	5'-TGUC G1 TTCT-X7-TCTT G1 CU <u>GT</u> -5'	45.4	83.6
24	5'-TTGU C1 TTTC-X7-CTT G1 CU <u>GT</u> T-5'	42.5	88.3
25	5'-GU C1 TTCTT-Z-TTCTT G1 CU <u>G</u> -5'	80.4	92.3
26	5'-TGUC G1 TTCA-X-ACTT G1 CU <u>GT</u> -5'	65.8	93.2

Tabla 6. Actividad antagonista in vivo en ratones

No. Oligo	Secuencias y Modificación	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR9
27	5'-TCTG <u>ACG1</u> TTCT-X-TCTT G1 CAGTCT-5'	95.8
28	5'-TCTG <u>ACG2</u> TTCT-X-TCTT G2 CAGTCT-5'	97.4

Tabla 7. Actividad antagonista in vivo en ratones

No. Oligo	Secuencias y Modificación	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR9	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR7
29	5'-TTG <u>UCG1</u> TTA-X-ATT G1 CUGTT-5'	36.6	95.3
30	5'-CTCTG <u>UCG1</u> TTA-X-ATT G1 CUGTCTC-5'	22.6	91.6
31	5'-TGTC*GTTCT-X-TCTTGC*TGT-5'	78.9	
32	5'-TGTC <u>GTTCT</u> -X-TCTT GCT GT-5'	73.4	
33	5'-TGTC*GTTCT-X-TCTTGC*TGT-5'	75.5	
34	5'-TGTC <u>GTTCT</u> -X-TCTT GCT GT-5'	85.8	

5

Tabla 8. Actividad antagonista in vivo en ratones

No. Oligo	Secuencias y Modificación	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR9
35	5'- <u>UGUCG1</u> ACAT-X-TACAG 1 CUGU-5'	65.1
36	5'- <u>UGUCG1</u> TTT-X-CTT G1 CUGU-5'	35.7
37	5'- <u>UGUCG1</u> TTT-X-TT G1 CUGU-5'	26.5
38	5'- <u>UoGUCG1</u> TTToCTo-X-oTCoTT G1 CUGoU-5'	6.9
39	5'- <u>UoGoUCG1</u> TTCTTo-X-oTCTT G1 CUoGoU-5'	16.8

Tabla 9. Actividad antagonista in vivo en ratones

10

No. Oligo	Secuencias y Modificación	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR9
40	5'- <u>UGACG1</u> TTCT-X-TCTT G1 CAGU-5'	54.9

Tabla 10. Actividad antagonista in vivo en ratones

Oligo No.	Secuencias y Modificación	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR9
41	5'- <u>UGUCG1</u> ACAT-Z-TACAG 1 CUGU-5'	86.9
42	5'- <u>UGUCG1</u> TTCT-Z-TCTT G1 CUGU-5'	69.6
43	5'- <u>UGUCG1</u> TTT-Z-CTT G1 CUGU-5'	60.8
44	5'- <u>UGUCG1</u> TTT-Z-TT G1 CUGU-5'	43.8

Tabla 11. Actividad antagonista in vivo en ratones

No. Oligo	Secuencias y Modificación	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR9	% de Inhibición de IL-12 inducido por agonista TLR7
58	5'-CTATCT <u>GAC</u> *GTTCTCTGT-3'	72.6	79.8
62	5'-CTATCTG ^A A ^A CGTTCTCTGT-3'	68.1	30.9

Tabla 12. Actividad antagonista in vivo en ratones

5

No. Oligo	Secuencia	% de Inhibición de IL-12	
		TLR9	TLR7
71	5'-CTTT <u>GUC</u> * G1 TTTC-X-CTT G1C * <u>UG</u> TTTC-5'	55.5	94.9
77	5'-CTT <u>GUC</u> * G1 TTCT-X-TCTT G1C * <u>UG</u> TTTC-5'	71.5	92.8
78	5'-CTTT <u>GUC</u> * ^o G1 TTTC-X-CTT G1oC * <u>UG</u> TTTC-5'	25.6	83.4
80	5'-CTT <u>GUC</u> * ^o G1 TTCT-X-TCTT G1oC * <u>UG</u> TTTC-5'	6.7	68.2
82	5'-CT <u>GUC</u> * ^o G1 TTCTT-X-TTCTT G1oC * <u>UG</u> TC-5'	9.0	78.4
88	5'-CTATCT <u>GUC</u> * G1 TTCTCTGT-3'	63.2	77.7
89	5'-CTATCT <u>GUC</u> * G1 TTCTCTGT-3'	36.4	40.5

Ejemplo 3

Estudio de antagonistas in vitro de TLR7/TLR9

10

Se usaron ratones C57BL/6 en este estudio. Los esplenocitos de ratón se cultivaron durante 24 horas (a 37°C, 5% de CO₂) con antagonistas de TLR7/TLR9 en un rango de dosis de 0.3, 1, 5, 10 mg/ml (A) o en una dosis única, 10 mg/ml (B) en presencia de un agonista de TLR7 (200 mg/ml) o en presencia de un agonista de TLR9 (1 mg/ml) o en presencia de PBS. Se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron las respuestas de citoquinas/quimiocinas en sobrenadantes mediante ensayos multiplex utilizando el sistema Luminex xMAP. Las muestras se analizaron por duplicado (±DE). Los resultados se muestran en las Figs. 3 y 4.

15

Ejemplo 4

Estudio de antagonistas in vivo de TLR7/TLR9

20

Se inyectaron s.c. ratones hembra C57BL/6 (2/grupo) con 1, 5 o 15 mg/kg de compuesto antagonista a las 0 h en el flanco derecho. Los ratones fueron inyectados con agonista de TLR7 (10 mg/kg) o con agonista de TLR9 (0.25 mg/kg) a las 24 horas en el flanco izquierdo. La sangre se extrajo mediante sangrado orbital 2 horas después de la administración del agonista. Las muestras de suero fueron analizadas luego por IL-12 ELISA. Los resultados se muestran en las Figs. 5 y 6.

25

Además, a ratones C57BL/6 hembras (2/grupo) se les inyectó s.c. 5 mg/kg de compuesto antagonista en el día 0 en el flanco derecho. Los ratones fueron inyectados con agonista de TLR7 (10 mg/kg) en los días 1, 2, 4, 9 y 11 o con agonista de TLR9 (0.25 mg/kg) en los días 1, 2, 4, 7, 9 y 11 en el flanco izquierdo. La sangre se extrajo mediante sangrado orbital 2 horas después de la administración del agonista. Las muestras de suero fueron analizadas luego por IL-12 ELISA. Los resultados se muestran en las Figs. 7 y 8.

30

A los ratones C57BL/6 hembra (2/grupo) también se les inyectó s.c. 5 mg/kg de compuesto antagonista a las 0 h en el flanco derecho. Los ratones fueron inyectados con agonistas TLR9 (0.25 mg/kg) o TLR7 (10 mg/kg) a las 24 horas en el flanco izquierdo. La sangre se extrajo mediante sangrado orbital 2 horas después de la administración del agonista. Luego se evaluaron las respuestas de citoquinas/quimiocinas en muestras de suero mediante ensayos multiplex utilizando el sistema Luminex xMAP. Los resultados se muestran en la FIG. 9.

35

Finalmente, se inyectaron s.c. a ratones C57BL/6 hembra (2/grupo) con 5 mg/kg de compuesto antagonista a las 0 h en el flanco derecho. Los ratones fueron luego inyectados con agonistas TLR3 (10 mg/kg) o TLR5 (0.25 mg/kg) a las

40

24 horas en el flanco izquierdo. La sangre se extrajo mediante sangrado orbital 2 horas después de la administración del agonista. Luego se evaluaron las respuestas de citoquinas/quimiocinas en muestras de suero mediante ensayos multiplex utilizando el sistema Luminex xMAP. Los resultados se muestran en la FIG. 10.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de TLR7 y/o TLR9 que tiene la estructura
- 5 5'-N_pN₃N₂N₁C*G1N¹N²N³N^zN⁴N⁵-3'
- en el que
- C*G1 es un motivo de oligonucleótido en el que C* es 5-Me-dC, y G1 es 7-deaza-dG;
- 10 N₁-N₂, en cada aparición, es independientemente un ribonucleótido 2'-O-Me;
- N₃, en cada aparición, es independientemente un nucleótido;
- 15 N₁-N₃, en cada aparición, es independientemente un nucleótido;
- N_p y N^z, en cada aparición, es independientemente un nucleótido;
- 20 N⁴-N⁵, en cada aparición, es independientemente un ribonucleótido 2'-O-Me;
- p es 5; y
- z es 3;
- 25 siempre que dicho antagonista contenga menos de 3 guanosinas consecutivas.
2. El antagonista de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la estructura 5'-CTATCTGUC*G1TTCTCTGU-3' o 5'-CTATCTGAC*G1TTCTCTGU-3'; en el que G, A o U es un ribonucleótido 2'-O-Me, C* es 5-Me-dC, y G1 es 7-deaza-dG.
- 30 3. El antagonista de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los enlaces internucleósidos de dichos antagonistas son enlazadores fosforotioato.
4. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho antagonista está en
- 35 forma de una sal de sodio.
5. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéutico aceptable.
- 40 6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas de TLR, antagonistas de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes, agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la quinasa o moléculas coestimulantes.
- 45 7. Un antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 para uso en un método para inhibir una respuesta inmunitaria mediada por TLR7 y/o TLR9 en un mamífero.
- 50 8. Un antagonista según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 para uso en un método para inhibir la actividad de un agonista de TLR7 y/o TLR9 en un mamífero.
9. El antagonista o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el método comprende administrar el antagonista antes o al mismo tiempo que el agonista TLR7 y/o TLR9.
- 55 10. Un antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 para utilizar en un método para tratar terapéuticamente un trastorno autoinmunitario, un cáncer o un trastorno inflamatorio en un mamífero.
- 60 11. Un antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 para utilizar en un método para prevenir un trastorno autoinmunitario, un cáncer o un trastorno inflamatorio en un mamífero.
- 65 12. El antagonista o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 10 u 11, en el que el trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, psoriasis, artritis reumatoide, Shock séptico, alopecia universalis, encefalomiélitis aguda diseminada, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, síndrome de

- 5 anticuerpo antifosfolípido, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, penfigoide vesicular, enfermedad de Chagas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad celíaca, dermatomiositis, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial, esclerodermia localizada,
- 10 13. El antagonista o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 12, en el que el trastorno autoinmunitario es el síndrome del intestino irritable.
14. El antagonista o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 12, en donde el trastorno autoinmunitario es la enfermedad de Crohn.
- 15 15. El antagonista o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 10 u 11, en el que el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en inflamación de las vías respiratorias, asma, enfermedades autoinmunitarias, inflamación crónica, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad de Behçet, hipersensibilidad, enfermedad inflamatoria del intestino, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, rechazo de trasplantes, colitis ulcerosa, uveítis, conjuntivitis y vasculitis.
- 20 16. El antagonista o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 15, en el que el trastorno inflamatorio es una enfermedad inflamatoria del intestino.
- 25 17. El antagonista o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 15, en el que el trastorno inflamatorio es la colitis ulcerosa.
- 30 18. El antagonista o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, en el que el método comprende además administrar dicho antagonista o dicha composición farmacéutica junto con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas de TLR, antagonistas de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes, agentes quimioterapéuticos, inhibidores de quinasa o moléculas coestimuladoras.
- 35 19. El antagonista o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18, en donde el mamífero es un ser humano.
- 40 20. El antagonista o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19, en el que la vía de administración es parenteral, administración de mucosa, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, por pistola génica, parche dérmico o en forma de gotas oculares o enjuagues bucales.

Figura 1. Síntesis lineal de oligonucleótidos inmunorreguladores.

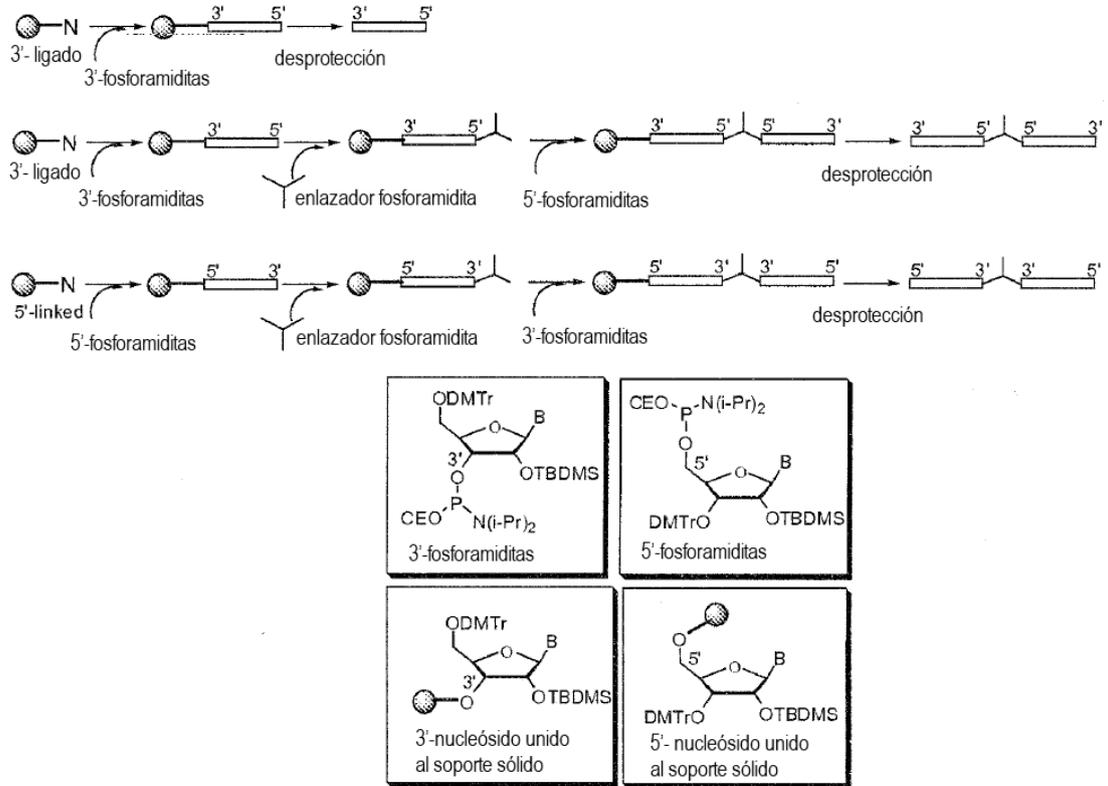
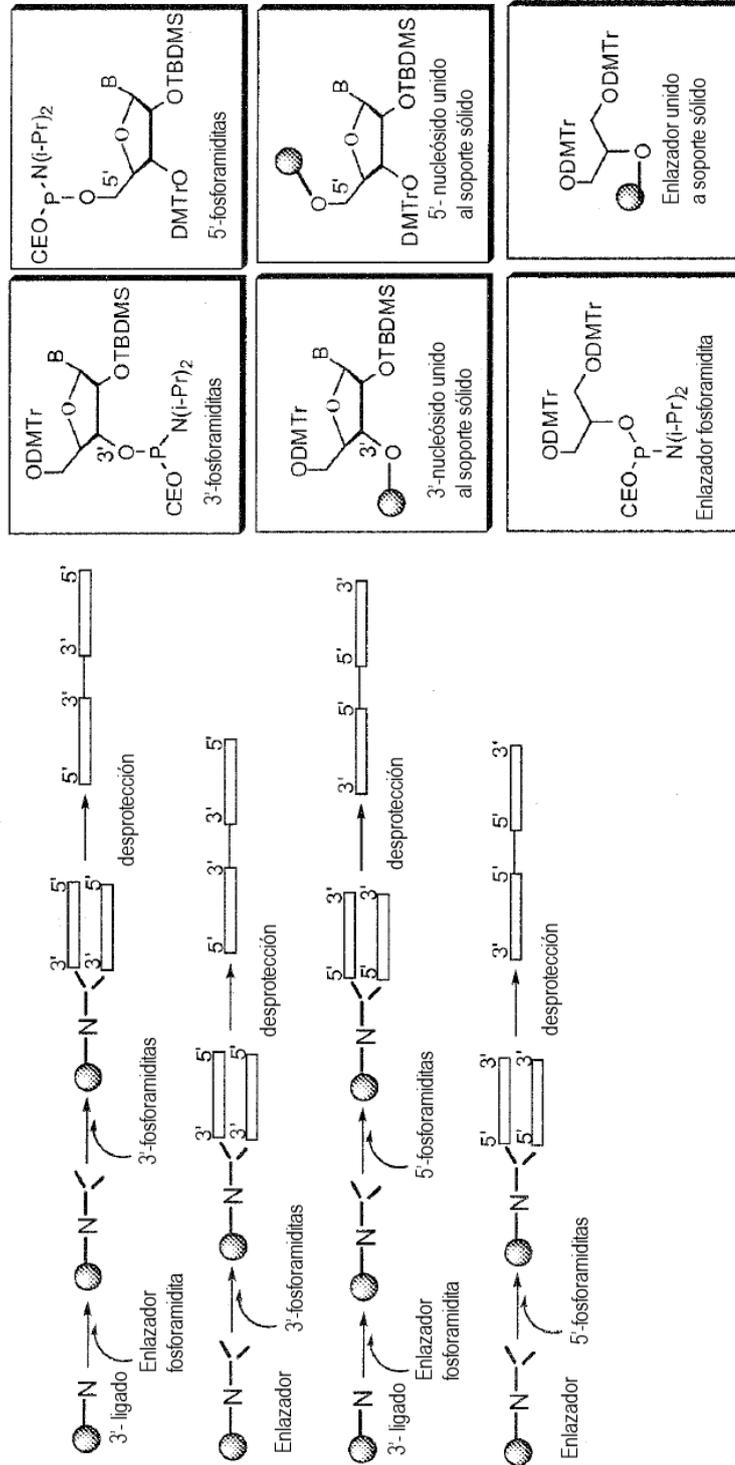


Figura 2. Síntesis en paralelo de oligonucleótidos inmunorreguladores.



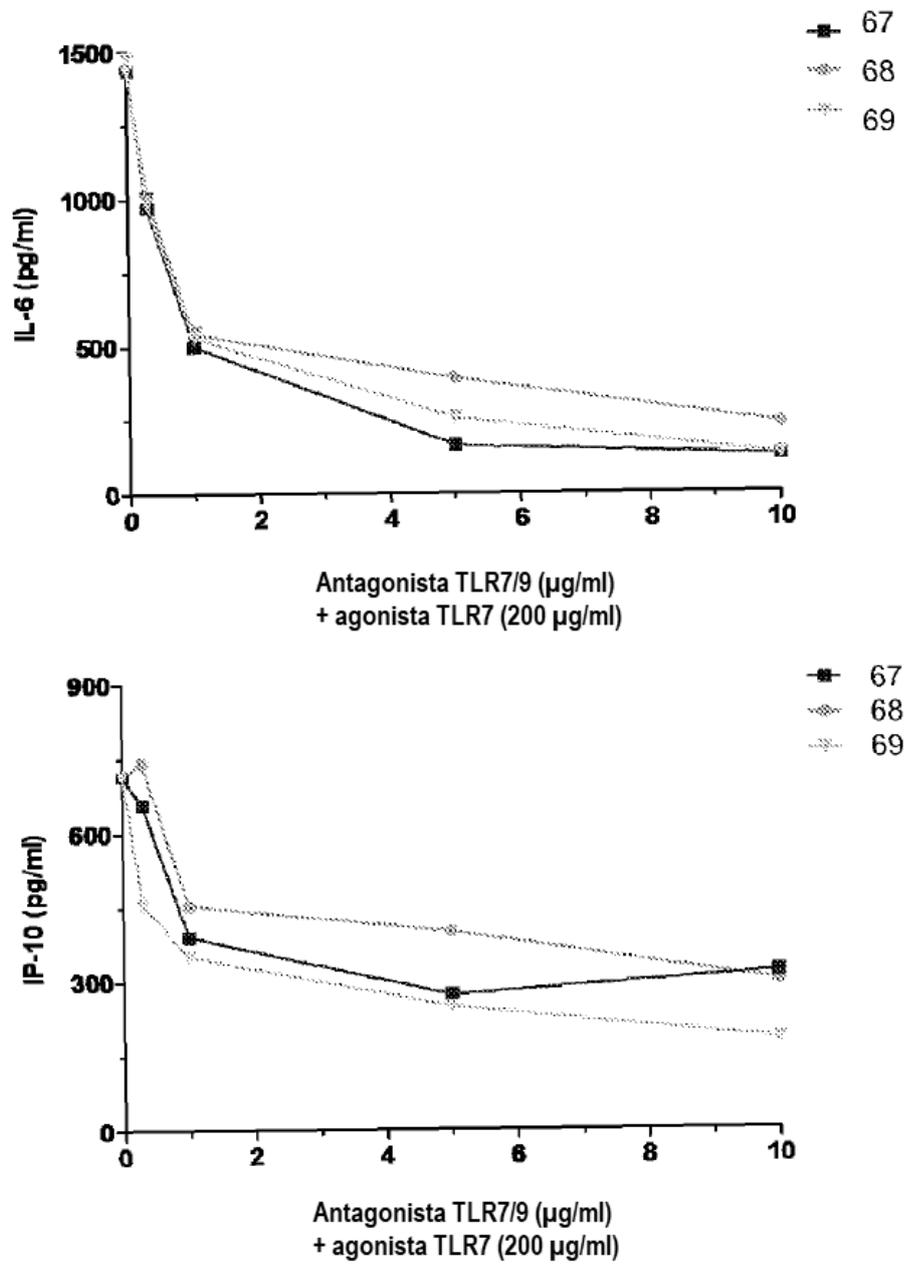


Figura 3A

Figura 3B

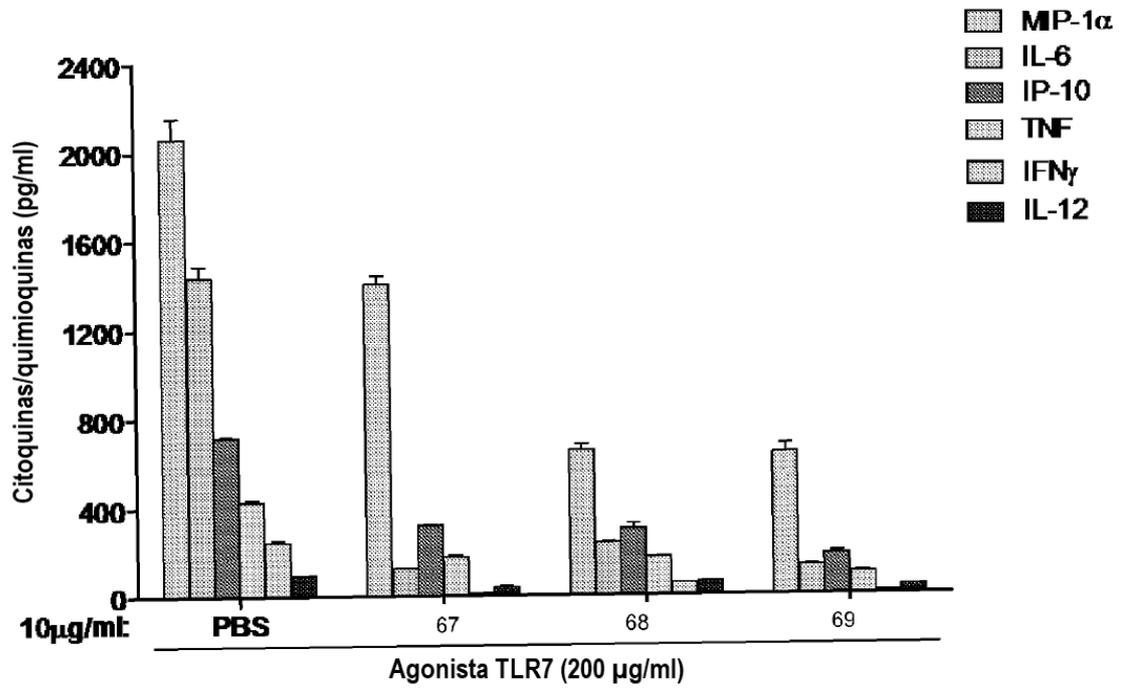


Figura 4A

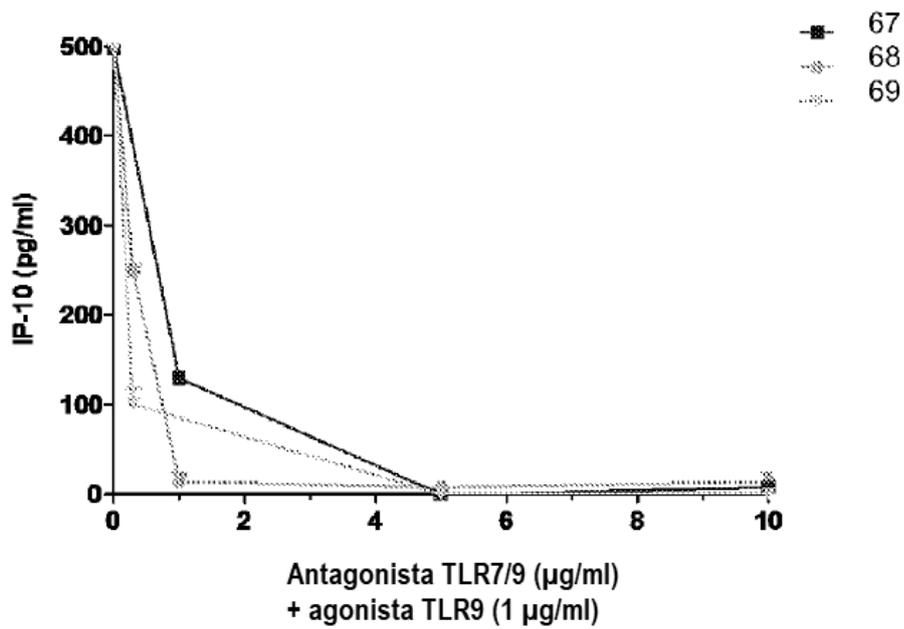
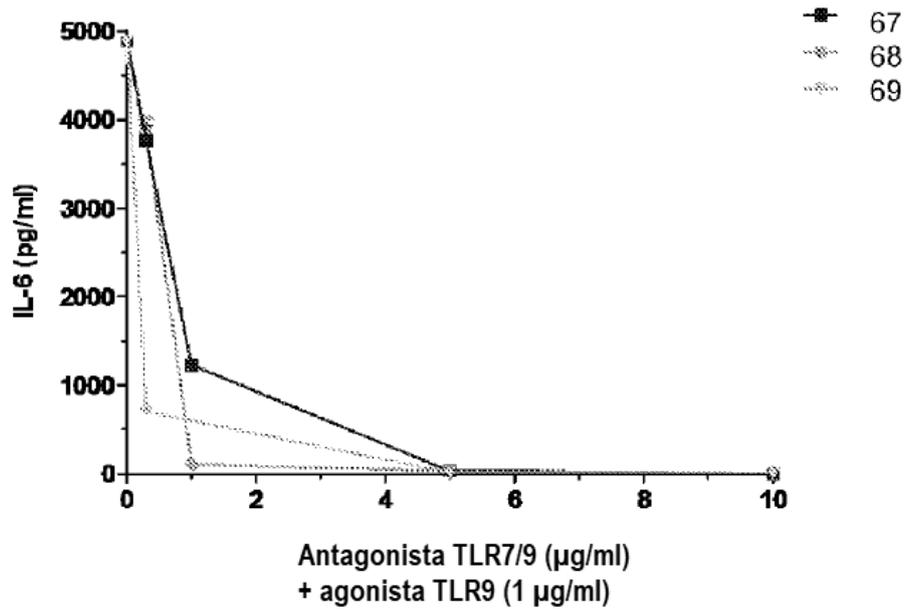


Figura 4B

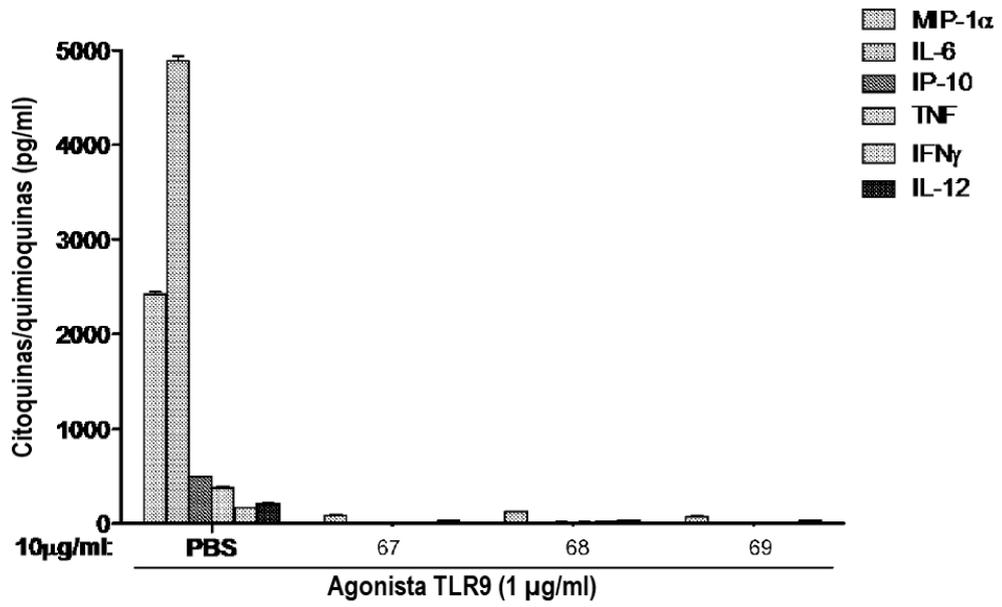


Figura 5

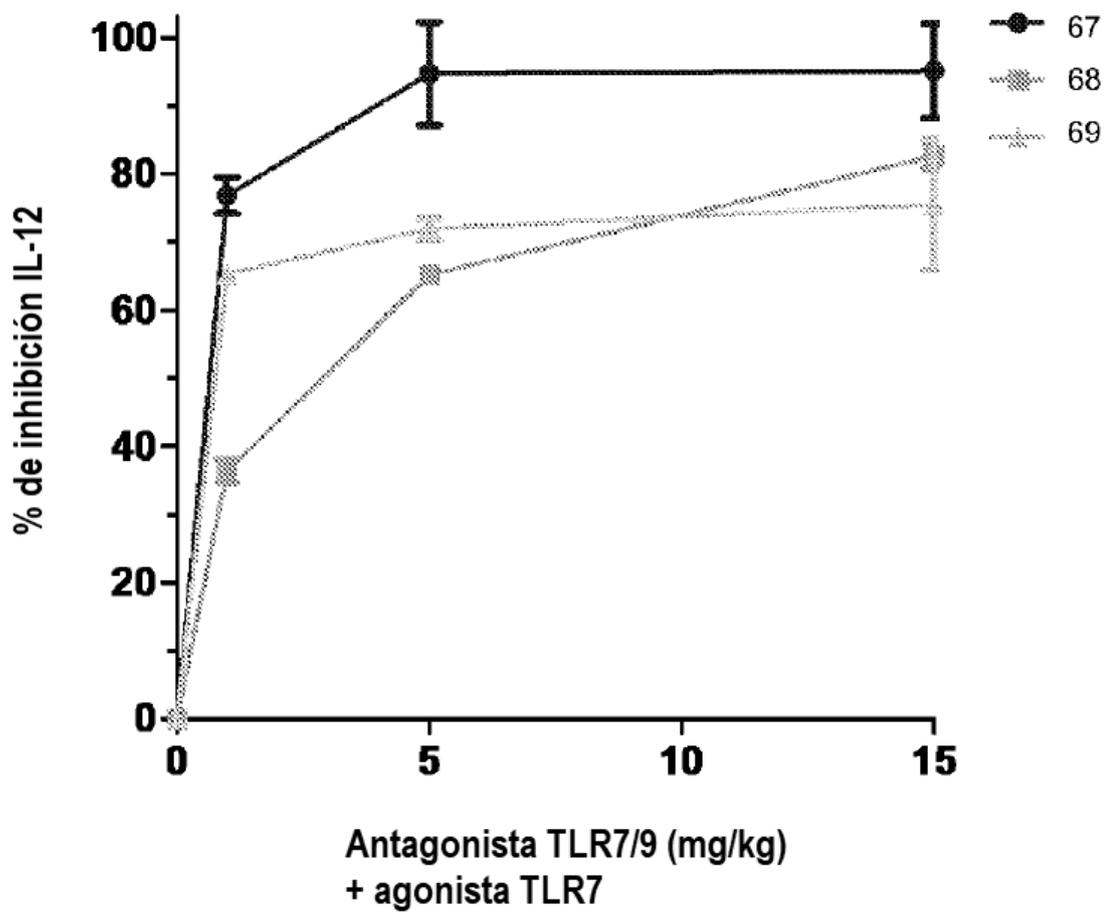


Figura 6

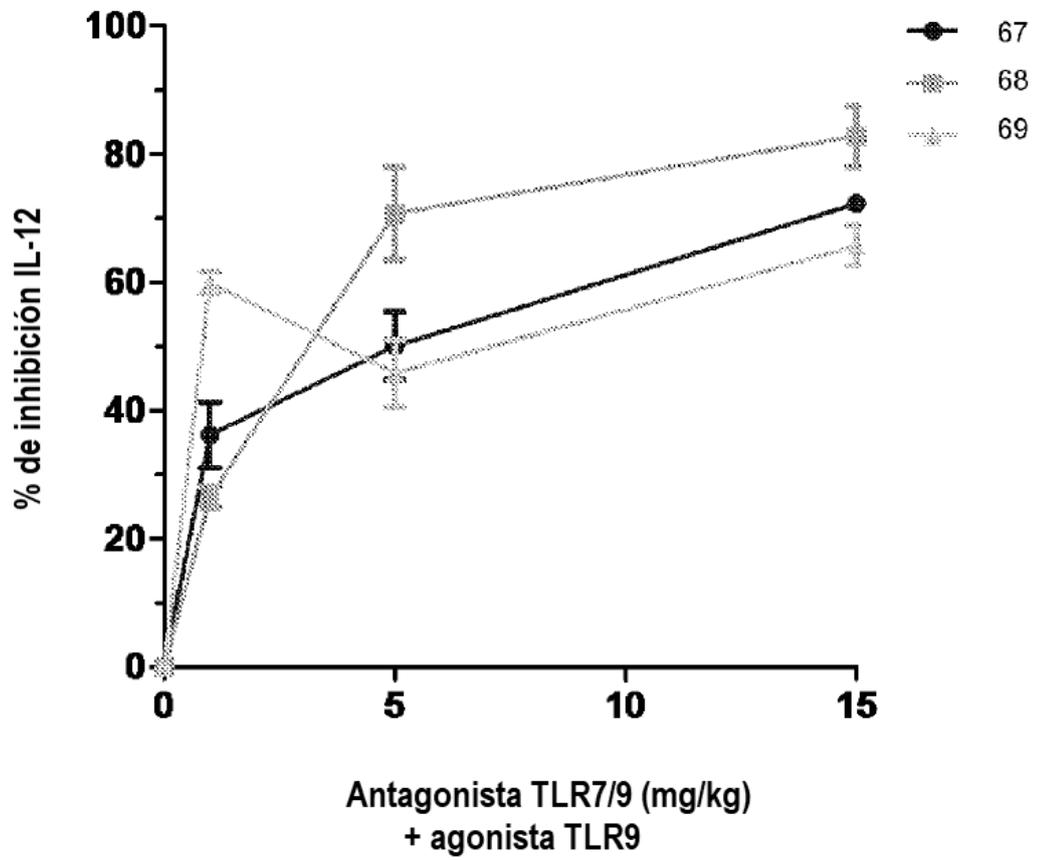


Figura 7

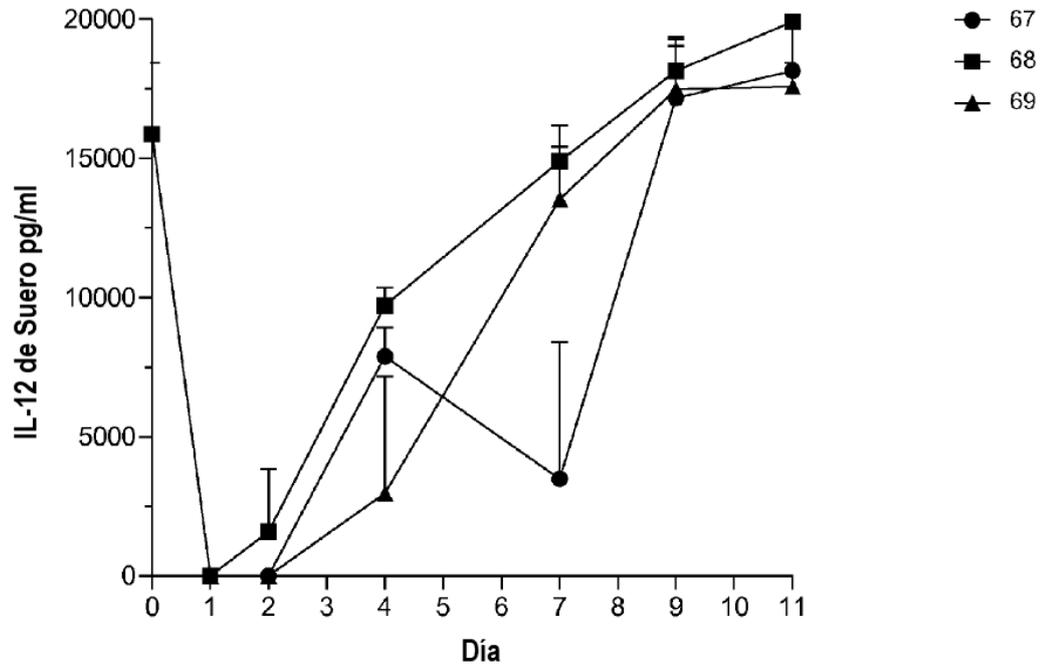


Figura 8

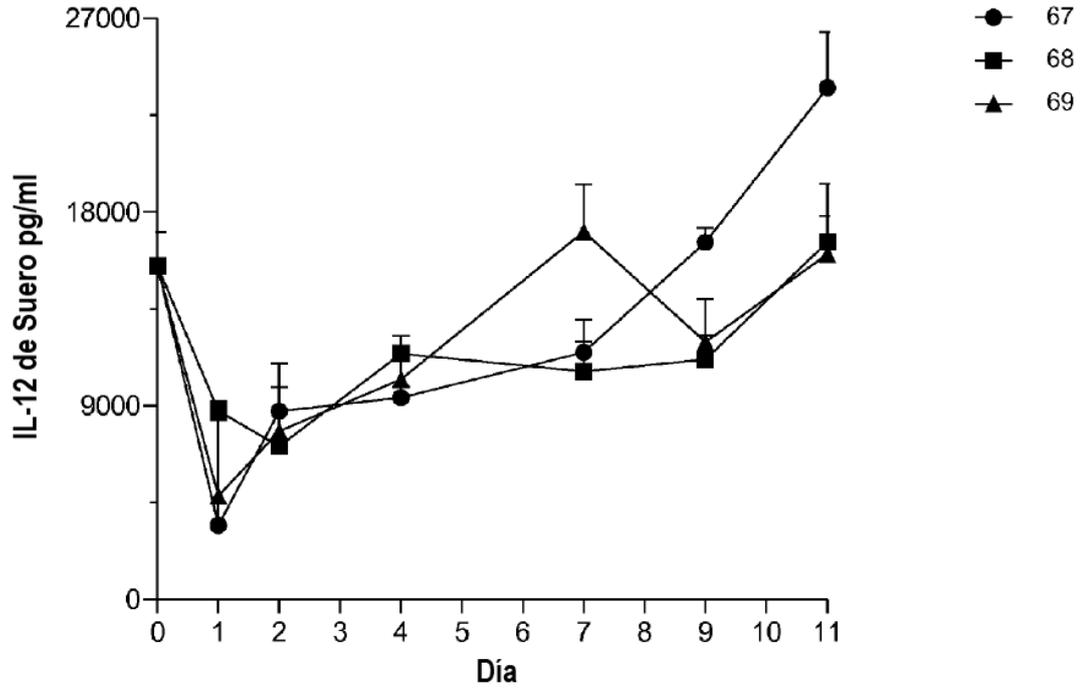


Figura 9

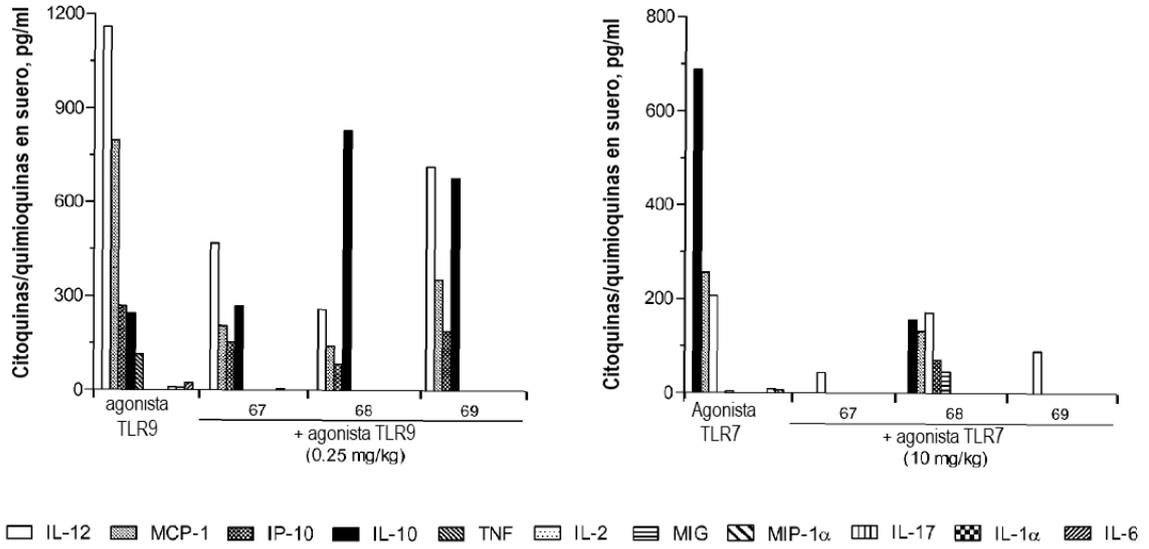


Figura 10

