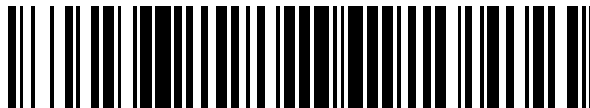


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 608**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/117** (2010.01)

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2014 PCT/US2014/048291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15013673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014 E 14750657 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3024936**

54 Título: **Construcciones esféricas a base de ácido nucleico como agentes inmunoestimulantes para uso profiláctico y terapéutico**

30 Prioridad:

**25.07.2013 US 201361858558 P**

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

**26.03.2020**

73 Titular/es:

**EXICURE, INC. (100.0%)  
8045 Lamon Avenue, Suite 410  
Skokie, IL 60077-5318, US**

72 Inventor/es:

**RADOVIC-MORENO, ALEKSANDAR, FILIP;  
MADER, CHRISTOPHER;  
NALLAGATLA, SUBBARAO;  
HASAN, WAREFTA;  
LOVE, AARON y  
GRYAZNOV, SERGEI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 750 608 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

Construcciones esféricas a base de ácido nucleico como agentes inmunoestimulantes para uso profiláctico y terapéutico

5

### Campo de la invención

La invención se refiere a construcciones a nanoescala de agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico, tales como agonistas de TLR, así como métodos y composiciones de las mismas.

10

### Antecedentes de la invención

El sistema inmunitario es un mecanismo endógeno muy evolucionado, exquisitamente preciso para eliminar material extraño, perjudicial e innecesario, incluyendo patógenos y células hospedadoras senescentes o malignas. Se sabe que la modulación del sistema inmunitario con fines terapéuticos o profilácticos es posible mediante la introducción de compuestos que modulan la actividad de células inmunitarias específicas. Un ejemplo principal son las vacunas, que han mostrado la capacidad de inducir protección contra patógenos así como células cancerosas. Las primeras formulaciones de vacunas modernas incluyeron patógenos vivos/atenuados o inactivados, pero estos se consideraron demasiado tóxicos en muchos casos o no proporcionaron inmunidad protectora. Se han buscado derivados de proteínas purificadas y otras estrategias de vacuna de subunidades antigénicas, pero estos normalmente conducen a respuestas ligeramente protectoras o ineficaces. Ahora se aprecia que se sabe que la inmunidad eficaz, en la mayoría de los casos, requiere el uso de compuestos inmunoestimulantes, que, entre otras cosas, proporciona las señales necesarias para inducir respuestas más robustas, específicas y duraderas, incluyendo inmunidad mediada por células y memoria inmunológica. La naturaleza de estas respuestas puede ser modulada por el tipo de compuesto o compuestos inmunoestimulantes introducidos. De hecho, se ha postulado que los compuestos inmunoestimulantes administrados juntos en presencia de estímulos antigénicos apropiados pueden usarse para inducir una amplia diversidad de respuestas inmunitarias, con el potencial de tratar o prevenir diversas dolencias, incluyendo enfermedades infecciosas y cáncer. Estos también pueden usarse potencialmente para vacunar a poblaciones inmunocomprometidas, tales como niños y ancianos.<sup>1</sup>

15

20

25

30

Las vacunas existentes no logran inducir respuestas inmunitarias eficaces en diversas enfermedades con un impacto mundial crítico, incluyendo SIDA, malaria, clamidia, diversas neoplasias malignas y alergias o enfermedades alérgicas, tales como asma. Entre los compuestos inmunoestimulantes que se están desarrollando, los agonistas de receptores de tipo Toll (TLR) han demostrado un potencial sobresaliente. Los agonistas de TLR4, tales como monofosforil lípido A (MPL) han alcanzado etapas tardías de ensayos clínicos y aprobación en diversos países en algunos casos.<sup>2</sup> A pesar de estos resultados prometedores, todavía existe una clara y significativa necesidad de compuestos que puedan inducir de manera segura y eficaz respuestas que puedan eliminar patógenos intracelulares y cánceres, tales como inductores de inmunidad celular. Los agonistas de TLR 3, TLR 7/8 y TLR 9 tienen un excelente potencial debido a su potente capacidad para inducir respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos Th1. Un agonista sintético de TLR 7/8, imiquimod, ha sido aprobado para tratar diversas dermatopatías, incluyendo carcinomas superficiales y verrugas genitales, y se está desarrollando para diversas indicaciones adicionales. De manera similar, los agonistas de TLR 9 se encuentran en diversas etapas de desarrollo clínico, para el tratamiento de diversas enfermedades con grandes necesidades médicas insatisfechas. Sin embargo, las preocupaciones con respecto a la falta de eficacia, los efectos colaterales del fosforotioato y la toxicidad han retrasado la traducción clínica eficaz de los agonistas de TLR 7/8 y 9.

35

40

45

### Sumario

En el presente documento se describen nuevos métodos y composiciones para mejorar las respuestas inmunitarias y activar complejos que interactúan con el ácido nucleico tales como TLR usando una construcción a nanoescala.

50

La invención se refiere a construcciones a nanoescala que comprenden una corona de un agonista de complejos que interactúan con el ácido nucleico, en donde el agonista de los complejos que interactúan con el ácido nucleico es un oligonucleótido inmunoestimulante, en donde la densidad de superficie del agonista de los complejos que interactúan con el ácido nucleico es de al menos 0,3 pmol/cm<sup>2</sup>, en donde el agonista es la SEQ ID NO: 30, en donde el diámetro de la construcción a nanoescala es de 1 nm a 90 nm en diámetro medio, en donde el agonista contiene un espaciador que consiste en oligoetileno y en donde la construcción a nanoescala contiene un núcleo de nanopartículas en el centro de la corona.

55

En algunas realizaciones, se incorpora un antígeno en la corona. En algunas realizaciones, la densidad de superficie del antígeno es de al menos 0,3 pmol/cm<sup>2</sup>. En otras realizaciones, el antígeno incluye al menos dos tipos diferentes de antígeno.

60

En otras realizaciones más, la construcción a nanoescala tiene una corona con al menos dos agonistas de complejos de interacción con el ácido nucleico incorporados, en donde los agonistas se seleccionan del grupo que consiste en agonistas de TLR 3, 7/8 y/o 9.

65

El agonista de complejos que interactúan con el ácido nucleico contiene un espaciador.

En algunos ejemplos de la divulgación, el agonista de complejos que interactúan con el ácido nucleico es ARN o ADN. Los agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico pueden ser, por ejemplo, un ARN bicatenario, tal como poli(I:C). Como alternativa, el agonista de complejos que interactúan con el ácido nucleico puede ser un ARN monocatenario tal como un ARN que contiene motivos UUG. En algunas realizaciones, el agonista de complejos que interactúan con el ácido nucleico es un ácido desoxirribonucleico no metilado, tal como un oligonucleótido CpG.

La construcción a nanoescala contiene un núcleo de nanopartículas en el centro de la corona que es opcionalmente metálico. El núcleo metálico puede seleccionarse del grupo que consiste en oro, plata, platino, aluminio, paladio, cobre, cobalto, indio, níquel y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el núcleo de nanopartículas comprende oro. En otras realizaciones, la construcción a nanoescala es degradable.

En determinados ejemplos de la divulgación, el diámetro de la construcción a nanoescala es de 1 nm a aproximadamente 250 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 240 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 230 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 220 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 210 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 200 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 190 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 180 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 170 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 160 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 150 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 140 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 130 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 120 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 110 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 90 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 80 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 70 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 60 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 40 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 30 nm de diámetro medio, o de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm de diámetro medio o de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm de diámetro medio.

En otras realizaciones, el agonista es ácido nucleico que tiene al menos un enlace internucleotídico fosfodiéster. En algunas realizaciones, el agonista es un oligonucleótido CpG. En otras realizaciones, cada enlace internucleotídico del ácido nucleico es un enlace fosfodiéster.

En realizaciones de la invención, la corona es una corona esférica.

Se proporciona una vacuna compuesta por una construcción a nanoescala de la invención y un vehículo según otros aspectos de la invención.

En otros aspectos, se proporciona un método para administrar un agente terapéutico a una célula suministrando la construcción a nanoescala de la invención a la célula.

También se desvela en el presente documento un método para regular la expresión de una molécula diana. El método implica administrar la construcción a nanoescala de la invención a la célula. En algunas realizaciones, la molécula diana es un TLR seleccionado del grupo que consiste en TLR3, 7, 8 y 9.

También se describe en el presente documento un método para activar un TLR mediante la administración de la construcción a nanoescala como se describe en el presente documento a la célula.

Según otros aspectos, la divulgación es un método de tratamiento de un sujeto, que implica administrar al sujeto la construcción a nanoescala de la invención en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una enfermedad infecciosa, un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, alergia o una enfermedad alérgica tal como asma.

En otros ejemplos más de la divulgación, la invención es un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, administrando al sujeto una construcción a nanoescala de la invención en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria.

En determinados ejemplos de la divulgación, el método implica administrar una modalidad terapéutica o de detección a una célula.

También se desvela en el presente documento un kit que comprende: una construcción a nanoescala que incluye opcionalmente un núcleo de nanopartículas; y que tiene un agonista de complejos que interactúan con ácido nucleico e instrucciones para el ensamblaje de un agonista de complejos que interactúan con ácido nucleico-corona. En

determinados ejemplos de la divulgación, el kit comprende además instrucciones para su uso.

La invención se define por las reivindicaciones.

## 5 Breve descripción de los dibujos

No se pretende que los dibujos adjuntos estén dibujados a escala. En los dibujos, cada componente idéntico o casi idéntico que se ilustra en diversas figuras está representado por un número similar. Por razones de claridad, no puede marcarse cada componente en cada dibujo. En los dibujos:

- 10 Las Figuras 1A-1B muestran un ejemplo esquemático no limitante de una construcción a nanoescala de la invención. A. Se muestra una estructura general de una construcción adyuvante a nanoescala que tiene un núcleo y uno o más agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico, tales como agonistas de TLR unidos a los mismos. B. Se muestra una estructura general de una construcción a nanoescala adyuvante que tiene un núcleo y uno o más agonistas de TLR y uno o más antígenos unidos a los mismos.
- 15 La Figura 2 es un conjunto de gráficos que representan una potencia notablemente mejorada en macrófagos de las construcciones a nanoescala de la divulgación sobre agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico (oligonucleótidos CpG) en solución.
- 20 La Figura 3 es un conjunto de gráficos que representan una potencia notablemente mejorada en macrófagos de las construcciones a nanoescala de la divulgación sobre agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico (oligonucleótidos CpG) en solución después de la incubación durante una noche.
- 25 La Figura 4 es un conjunto de gráficos que representan un nivel mejorado de secreción de citocinas con las construcciones a nanoescala de la divulgación sobre agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico (oligonucleótidos CpG) en solución. Se examinó el efecto sobre la inducción de citocinas para ambos oligonucleótidos que tienen enlaces internucleotídicos de fosfodiéster y fosforotioato tanto en la construcción a nanoescala como en los grupos agonistas de TLR.
- 30 La Figura 5 es un gráfico de líneas y barras que representa la activación de TLR9 en respuesta a la estimulación con una construcción a nanoescala de la invención que tiene un oligonucleótido CpG de fosfodiéster en comparación con oligonucleótidos CpG de fosfodiéster y fosforotioato en solución.
- 35 La Figura 6 es un conjunto de gráficos que representan un factor de aumento múltiple en la potencia de una construcción a nanoescala de la divulgación sobre varias secuencias de oligonucleótidos CpG diferentes. CpG 1826 es la SEQ ID NO: 1 y el rplV a continuación es la SEQ ID NO: 2. CpG 1668 es la SEQ ID NO: 3 y el rplV a continuación es la SEQ ID NO: 4.
- 40 La Figura 7 es un conjunto de gráficos que representan los efectos de la modulación del tamaño del núcleo de la construcción a nanoescala que sugiere la mejora de la actividad agonista.
- 45 La Figura 8 muestra un gráfico que representa una activación más rápida y prolongada que el oligonucleótido CpG. La Figura 9 es un conjunto de gráficos que representan la capacidad de las modificaciones de fosforotioato para modular la actividad agonista de una manera dependiente de la secuencia. Para CpG 1668: PO es la SEQ ID NO: 5, C\*G es la SEQ ID NO: 6, 5PS2/C\*G es la SEQ ID NO: 7 y PS es la SEQ ID NO: 8. Para CpG 1826: PO es la SEQ ID NO: 9, C\*G es la SEQ ID NO: 10, 5PS2/C\*G es la SEQ ID NO: 11 y PS es la SEQ ID NO: 12.
- 50 La Figura 10 es un conjunto de gráficos que representan la capacidad de la densidad de carga de oligonucleótidos para afectar a la actividad agonista.
- 55 La Figura 11 muestra un gráfico que representa un ciclo temporal de activación de construcciones a nanoescala de CpG PO/PO. Las construcciones ensayadas no se activan hasta >4 h de incubación.
- 60 La Figura 12 muestra un gráfico que demuestra que las construcciones a nanoescala de 5'Chol CpG PO muestran activación en un intervalo bajo de nM y 5'C18 anuló la actividad.
- 65 La Figura 13 es un conjunto de gráficos que demuestran que los macrófagos previamente sembrados en placas están más sensibilizados para la activación posterior.
- La Figura 14 es un conjunto de gráficos que demuestran bajos niveles de secreción de IFN-gamma por los macrófagos.
- La Figura 15 muestra una representación de un SNA inmunoterapéutico (AST-008). La Figura 6 muestra que los SNA pueden copresentar un antígeno vacunal terapéutico y un adyuvante en una sola nanopartícula y pueden dirigirse simultáneamente a múltiples receptores inmunoestimulantes (por ejemplo, TLR 3, 4, 7/8, 9).
- La Figura 16 es un esquema que demuestra cómo AST-008 puede entrar en endosomas a través de endocitosis desencadenada, donde después puede usarse para una estimulación versátil del sistema inmunitario. Dentro del endosoma, AST-008 estimula la señalización del sistema inmunitario a través del receptor TLR 9, una diana molecular para terapia de SNA, que conduce a respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. AST-008 también puede dirigirse a TLR 3, 4, 7/8, lo que da como resultado respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.
- Las Figuras 17A y 17B son un conjunto de gráficos que muestran que AST-008 induce respuestas proinflamatorias mayores que los oligodesoxinucleótidos (oligo) CpG correspondientes *in vitro*. La Figura 17A muestra los niveles de expresión de TNF, IL-12 e IL-6 inducidos por oligo CTL, SNA CTL, CpG 1826 y AST-008. La Figura 17B presenta la activación de NF-κB derivada de los agentes indicados.
- La Figura 18 demuestra que AST-008 se dirige a ganglios linfáticos de drenaje después de la administración de una única dosis subcutánea. AST-008 se tiñó de plata para mejorar la dispersión de la luz del núcleo de oro y después se contratiñó con eosina. Se utilizó un aumento de campo brillante 4X.
- La Figura 19 es un gráfico que ilustra la actividad *in vivo* de AST-008. A los ratones se les administró una inyección

en embolada en la vena de la cola (intravenosa) de 50 µl de solución de 5,1 nmol (AST-008-po, AST-008-ps, CpG 1826-po, CpG 1826-ps, GpC-po SNA, GpC-ps SNA, GpC-po o GpC-ps) y después se analizaron para determinar la expresión de IL-12 1, 3 y 6 horas después de la inyección (24 ratones por grupo, 3 por cada punto temporal). Los niveles de IL-12 se expresan como el factor sobre PBS. La arquitectura AST-008 mejora la inducción de IL-12 en aproximadamente 20 veces con respecto a oligodesoxinucleótidos libres y el efecto se mantuvo durante más de seis horas después de la administración inicial.

Las Figuras 20A-20C consisten en un par de gráficos y un diagrama que demuestran que AST-008 induce una respuesta equilibrada de Th1/Th2 (Figura 20A) y una mayor respuesta de anticuerpos IgG2a (Figura 20B) que el alumbre o los oligonucleótidos CpG. Los resultados se tabulan en la Figura 20C. \*\*p<0,01.

Las Figuras 21A-21B muestran que AST-008 induce respuestas celulares más eficazmente que el alumbre o los oligonucleótidos CpG. La Figura 21A representa esquemáticamente el protocolo: los esplenocitos se cultivaron durante 28 días, se expusieron el día 0 y el día 21 y después se volvieron a estimular con SIINFEKL y se exploraron para INF-γ con ELISPOT el día 28. La Figura 21B es un gráfico que representa los resultados. \*\*\*\*p <0,0001.

Las Figuras 22A-22B demuestran que AST-008 induce una respuesta inmunitaria de eliminación tumoral profunda en un modelo de linfoma *in vivo*. La figura 22A ilustra el protocolo: se inyectó en los flancos derechos de ratones C57BL/6 1x10<sup>6</sup> E.G7-OVA linfoma (11 por grupo). Los ratones se expusieron después tres veces con 100 µg de OVA s.c., 1,8 µg de OVA<sub>257-264</sub> s.c. y 0,92 nmol de oligo en AST-008 y se sacrificaron a 2000 mm<sup>3</sup>. La Figura 22B es un gráfico de los resultados. \* p <0,05 usando ANOVA de dos vías.

Las Figuras 23A-23B muestran que AST-008 presenta actividad antitumoral superior y supervivencia más larga que los oligodesoxinucleótidos CpG. Los gráficos muestran el volumen tumoral (Figura 23A) y el porcentaje de supervivencia (Figura 23B) después de inyectarse a los ratones C57BL/6 1x10<sup>6</sup> E.G7-OVA linfoma en sus flancos derechos (11 por grupo) y después se expusieron tres veces con PBS, PBS y OVA, CpG 1826 y OVA o AST-008 y OVA. \*p <0,05.

## 25 Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones. La fraseología y terminología usadas en el presente documento son para fines de descripción y no deberían considerarse limitantes. Se pretende que el uso de "incluir", "comprender" o "tener" "contener", "implicar" y variaciones de los mismos en el presente documento, incluya los elementos enumerados a continuación y equivalentes de los mismos así como elementos adicionales.

La presente invención, en algunos aspectos, supera varios obstáculos importantes con los que se encuentran los agonistas de TLR 3, TLR 7/8 y TLR 9 convencionales al lograr una activación más rápida, crear una estructura multivalente, cambiar la distribución celular y facilitar la síntesis sencilla y escalable de diversas estructuras que contienen adyuvantes y antígenos, entre otros. Las construcciones de la invención dan como resultado vacunas más eficaces para usos profilácticos o terapéuticos en el tratamiento de una amplia diversidad de enfermedades/infecciones incluyendo, por ejemplo, SIDA, malaria, clamidia, *Campylobacter*, citomegalovirus, dengue, mononucleosis de Epstein-Barr, glosopeda, rabia, úlceras gástricas por *Helicobacter pylori*, hepatitis A, B, C, herpes simple, gripe, leishmaniosis, cólera, difteria, *Haemophilus influenzae*, meningitis meningocócica, peste, neumonía neumocócica, tétanos, fiebre tifoidea, virus sincitial respiratorio, rinovirus, esquistosomiasis, *Shigella*, estreptococo de grupo A y B, tuberculosis, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* e infecciones del tracto urinario; diversas alergias alimentarias tales como cacahuete, fruta, ajo, avena, carne, leche, pescado, marisco, soja, fruto seco arbóreo, trigo, gluten, huevo, sulfitos; diversas alergias a medicamentos tales como tetraciclina, dilantina, carbamazepina, penicilinas, cefalosporinas, sulfonamidas, AINE, colorante de contraste intravenoso, anestésicos locales; enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, lupus, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, asma y EPOC; y cánceres tales como melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, CPNM, glioblastoma multiforme, entre otros.

Un conjunto de construcciones a modo de ejemplo a nanoescala de la invención se muestra en el esquema de la Figura 1. La plataforma descrita en el presente documento es útil para cargar uno o múltiples agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico (A) o uno o múltiples agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico y antígeno (B). Optimización de: (1) complejo que interactúa con el ácido nucleico, tal como un TLR dirigido (TLR 3, 7/8 y/o 9), (2) densidad del agonista de complejos que interactúan con el ácido nucleico, (3) densidad del antígeno, (4) presentación de múltiples antígenos, (5) composición, tamaño y carga del núcleo y (6) química de conector del núcleo "L", y (7) se espera que la estructura química agonista produzca nuevos paradigmas en el desarrollo de vacunas. En particular, los agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico incluyen ARN bicatenario (tal como poli(I:C), TLR 3), ARN monocatenario (tal como cadenas que contienen motivos UUG, TLR 7/8) y ácido desoxirribonucleico no metilado y derivados (tales como cadenas que contienen motivos CpG).

Los aspectos de la invención se refieren a construcciones a nanoescala. Una construcción a nanoescala se refiere a una construcción de tamaño nanométrico que tiene uno o más ácidos nucleicos mantenidos en una posición geométrica. La construcción a nanoescala normalmente se denomina corona de un conjunto de ácidos nucleicos. Una corona, como se usa en el presente documento, se refiere a una cubierta exterior compuesta de moléculas de ácido nucleico. La construcción a nanoescala contiene un núcleo de nanopartículas compuesto de ácidos nucleicos u otros materiales, tales como metales. Como alternativa, la corona puede ser simplemente un conjunto de ácidos nucleicos

dispuestos en una forma geométrica con un núcleo hueco, es decir, una capa moldeada tridimensional de ácidos nucleicos. Normalmente, pero no siempre, la corona tiene una forma esférica.

Los ácidos nucleicos pueden estar unidos directamente al núcleo. Algunos o todos los ácidos nucleicos pueden estar unidos a otros ácidos nucleicos, directa o indirectamente a través de un enlace covalente o no covalente. El enlace de un ácido nucleico con otro ácido nucleico puede ser adicional o alternativo al enlace de ese ácido nucleico con un núcleo. Uno o más de los ácidos nucleicos también pueden estar unidos a otras moléculas, tales como un antígeno.

También se desvelan construcciones a nanoescala que no incluyen un núcleo de nanopartículas. Cuando la corona no incluye un núcleo de nanopartículas, los ácidos nucleicos pueden estar unidos entre sí directa o indirectamente a través de un enlace covalente o no covalente. En algunos ejemplos, la corona que no incluye un núcleo de nanopartículas puede formarse colocando en capas los ácidos nucleicos en un retículo u otra estructura soluble y disolviendo después el retículo u otra estructura para producir un centro vacío.

Como se usa en el presente documento, la construcción a nanoescala de la divulgación es una construcción que tiene un diámetro promedio del orden de nanómetros (es decir, entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 1 micrómetro. Por ejemplo, en algunos casos, el diámetro de la nanopartícula es de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 250 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 240 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 230 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 220 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 210 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 200 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 190 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 180 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 170 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 160 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 150 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 140 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 130 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 120 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 110 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 90 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 80 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 70 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 60 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 40 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 30 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm de diámetro medio, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm de diámetro medio, de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 150 nm de diámetro medio, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 nm de diámetro medio, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nm de diámetro medio, de aproximadamente 10 a 150 nm de diámetro medio, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nm de diámetro medio, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nm de diámetro medio, de aproximadamente 30 a aproximadamente 100 nm de diámetro medio o de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 nm de diámetro medio.

En algunos casos, la corona incluye un núcleo de nanopartículas que está unido a uno o más agonistas de complejos y/o antígenos que interactúan con el ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un núcleo de nanopartículas se refiere al componente de nanopartículas de una construcción de nanopartículas, sin ninguna modalidad adjunta. En algunos casos, el núcleo de nanopartículas es metálico. Debe apreciarse que el núcleo de nanopartículas puede comprender cualquier metal. Varios ejemplos no limitantes de metales incluyen oro, plata, platino, aluminio, paladio, cobre, cobalto, indio, níquel y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el núcleo de nanopartículas comprende oro. Por ejemplo, el núcleo de nanopartículas puede ser una estructura reticular que incluye oro degradable. Las nanopartículas también pueden comprender materiales semiconductores y magnéticos.

Se describen ejemplos no limitantes de nanopartículas compatibles con aspectos de la invención en: Patente de los Estados Unidos n.º 7.238.472, Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2003/0147966, Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2008/0306016, Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2009/0209629, Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2010/0136682, Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2010/0184844, Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2010/0294952, Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2010/0129808, Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2010/0233270, Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2011/0111974, Publicación PCT N.º WO 2002/096262, Publicación PCT N.º WO 2003/08539, Publicación PCT N.º WO 2006/138145, Publicación PCT N.º WO 2008/127789, Publicación PCT N.º WO 2008/098248, Publicación PCT N.º WO 2011/079290, Publicación PCT N.º WO 2011/053940, Publicación PCT N.º WO 2011/017690 y Publicación PCT N.º WO 2011/017456. Las nanopartículas asociadas con la invención pueden sintetizarse según cualquier medio conocido en la técnica o pueden obtenerse comercialmente. Por ejemplo, varios ejemplos no limitantes de proveedores comerciales de nanopartículas incluyen: Ted Pella, Inc., Redding, CA, Nanoprobe, Inc., Yaphank, NY, Vacuum Metallurgical Co., Ltd., Chiba, Japón y Vector Laboratories, Inc., Burlington, CA.

**Agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico**

Un complejo que interactúa con el ácido nucleico como se usa en el presente documento se refiere a una molécula o un complejo de moléculas que interactúan con una molécula de ácido nucleico y se estimulan para producir una respuesta inmunitaria en respuesta a esa interacción. La molécula o el complejo de moléculas puede ser un receptor, por ejemplo. En algunas realizaciones, un complejo que interactúa con el ácido nucleico es un complejo receptor de reconocimiento de patrones (PRR). Los PRR son una parte primitiva del sistema inmunitario compuesta de proteínas expresadas por células del sistema inmunitario innato para identificar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que están asociados con patógenos microbianos o tensión celular, así como patrones moleculares asociados al daño (DAMP), que están asociados con componentes celulares liberados durante el daño celular. Los PRR incluyen, pero sin limitación, PRR unidos a membrana, tales como quinasas receptoras, receptores de tipo toll (TLR) y receptores de lectina de tipo C (CLR) (receptores de manosa y receptores de asialoglicoproteína); PRR citoplásmicos tales como receptores de tipo RIG-I (RLR), ARN Helicasas, PRR de plantas y quinasas no RD; y PRR secretados.

Los complejos que interactúan con el ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, TLR, RIG-I, factores de transcripción, maquinaria de traducción celular, maquinaria de transcripción celular, enzimas que actúan en el ácido nucleico y autoantígenos que se asocian al ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico que son agonistas de un complejo que interactúa con el ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, agonistas de TLR y agonistas de RIG-I, factores de transcripción, maquinaria de traducción celular, maquinaria de transcripción celular, enzimas que actúan en el ácido nucleico y autoantígenos que se asocian al ácido nucleico.

En algunos ejemplos, un agonista de un complejo que interactúa con el ácido nucleico es un agonista de TLR. Un agonista de TLR, como se usa en el presente documento es una molécula de ácido nucleico que interactúa con y estimula la actividad de un TLR.

Los receptores de tipo Toll (TLR) son una familia de polipéptidos muy conservados que desempeñan un papel crítico en la inmunidad innata en los mamíferos. Al menos diez miembros de la familia, designados TLR1 - TLR10, han sido identificados. Los dominios citoplásmicos de los diversos TLR se caracterizan por un dominio del receptor de interleucina de tipo Toll 1 (IL-1) (TIR). Medzhitov R *et al.* (1998) *Mol Cell* 2:253-8. El reconocimiento de la invasión microbiana por los TLR desencadena la activación de una cascada de señalización que está conservada evolutivamente en *Drosophila* y mamíferos. Se ha señalado que la proteína adaptadora MyD88 que contiene el dominio TIR se asocia con TLR y recluta quinasa asociada a receptor de IL-1 (IRAK) y factor 6 asociado a receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAF6) a los TLR. Se cree que la ruta de señalización dependiente de MyD88 conduce a la activación de factores de transcripción de NF- $\kappa$ B y proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK) de c-Jun NH<sub>2</sub> terminal quinasa (Jnk), etapas críticas en la activación inmunitaria y la producción de citocinas inflamatorias. Para una revisión, véase Aderem A *et al.* (2000) *Nature* 406:782-87.

Se cree que los TLR se expresan diferencialmente en diversos tejidos y en diversos tipos de células inmunitarias. Por ejemplo, se ha señalado que el TLR7 humano se expresa en placenta, pulmón, bazo, ganglios linfáticos, amígdalas y en células dendríticas precursoras plasmacitoides (pDC). Chuang TH *et al.* (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:372-8); Kadowaki N *et al.* (2001) *J Exp Med* 194:863-9. Se ha señalado que el TLR8 humano se expresa en pulmón, leucocitos de sangre periférica (PBL), placenta, bazo, ganglios linfáticos y en monocitos. Kadowaki N *et al.* (2001) *J Exp Med* 194:863-9; Chuang T-H *et al.* (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:372-8. Se ha señalado que el TLR9 humano se expresa en bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, PBL y en pDCs, y linfocitos B. Kadowaki N *et al.* (2001) *J Exp Med* 194:863-9; Bauer S *et al.* (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9237-42; Chuang T-H *et al.* (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:372-8.

Se conocen secuencias de nucleótidos y aminoácidos de TLR7 humano y murino. Véase, por ejemplo, N.º de referencia de GenBank AF240467, AF245702, NM\_016562, AF334942, NM\_133211; y AAF60188, AAF78035, NP\_057646, AAL73191 y AAL73192. Se ha señalado que el TLR7 humano tiene una longitud de 1049 aminoácidos. Se ha señalado que el TLR7 murino tiene una longitud de 1050 aminoácidos. Los polipéptidos de TLR7 incluyen un dominio extracelular que tiene una región de repetición rica en leucina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que incluye un dominio TIR.

Se conocen secuencias de nucleótidos y aminoácidos de TLR8 humano y murino. Véase, por ejemplo, N.º de referencia de GenBank AF246971, AF245703, NM\_016610, XM\_045706, AY035890, NM\_133212; y AAF64061, AAF78036, NP\_057694, XP\_045706, AAK62677 y NP\_573475. Se ha señalado que el TLR8 humano existe en al menos dos isoformas, una con una longitud de 1041 aminoácidos y la otra con una longitud de 1059 aminoácidos. El TLR8 murino tiene una longitud de 1032 aminoácidos. Los polipéptidos de TLR8 incluyen un dominio extracelular que tiene una región de repetición rica en leucina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que incluye un dominio TIR.

Se conocen secuencias de nucleótidos y aminoácidos de TLR9 humano y murino. Véase, por ejemplo, N.º de referencia de GenBank NM\_017442, AF259262, AB045180, AF245704, AB045181, AF348140, AF314224, NM\_031178; y NP\_059138, AAF72189, AAF78037, BAB19260, AAK29625, AAK28488 y NP\_112455. Se ha señalado que el TLR9 humano existe en al menos dos isoformas, una con una longitud de 1032 aminoácidos y la otra de 1055 aminoácidos. El TLR9 murino tiene una longitud de 1032 aminoácidos. Los polipéptidos de TLR9 incluyen

un dominio extracelular que tiene una región de repetición rica en leucina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que incluye un dominio TIR.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "señalización de TLR" se refiere a cualquier aspecto de la señalización intracelular asociada con la señalización a través de un TLR. Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria mediada por TLR" se refiere a la respuesta inmunitaria que está asociada con la señalización de TLR.

10 Una respuesta inmunitaria mediada por TLR7 es una respuesta asociada con la señalización de TLR7. La respuesta inmunitaria mediada por TLR7 generalmente se caracteriza por la inducción de citocinas inducibles por IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  tales como IP-10 e I-TAC. Los niveles de citocinas IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha/\beta$  y MIP-3 $\alpha/\beta$  inducidos en una respuesta inmunitaria mediada por TLR7 son menores que los inducidos en una respuesta inmunitaria mediada por TLR8.

15 Una respuesta inmunitaria mediada por TLR8 es una respuesta asociada con la señalización de TLR8. Esta respuesta se caracteriza además por la inducción de citocinas proinflamatorias tales como IFN- $\gamma$ , IL-12p40/70, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1  $\alpha/\beta$  y MIP-3  $\alpha/\beta$ .

20 Una respuesta inmunitaria mediada por TLR9 es una respuesta asociada con la señalización de TLR9. Esta respuesta se caracteriza además al menos por la producción/secreción de IFN- $\gamma$  e IL-12, aunque a niveles inferiores a los que se logran a través de una respuesta inmunitaria mediada por TLR8.

25 Como se usa en el presente documento, un "agonista de TLR7/8" se refiere de manera colectiva a cualquier ácido nucleico que sea capaz de aumentar la señalización de TLR7 y/o TLR8 (es decir, un agonista de TLR7 y/o TLR8). Algunos ligandos de TLR7/8 inducen la señalización de TLR7 solo (por ejemplo, agonistas específicos de TLR7), algunos inducen la señalización TLR8 solo (por ejemplo, agonistas específicos de TLR8) y otros inducen la señalización tanto de TLR7 como de TLR8.

30 El nivel de señalización de TLR7 o TLR8 puede mejorarse sobre un nivel de señalización preexistente o puede inducirse sobre un nivel de señalización de fondo. Los ligandos de TLR7 incluyen, sin limitación, análogos de guanosina tales como guanosinas sustituidas en C8, mezclas de ribonucleósidos que consisten esencialmente en G y U, ribonucleótidos de guanosina y ARN o moléculas de tipo ARN (documento PCT/US03/10406) y compuestos a base de adenosina (por ejemplo, 6-amino-9-bencil-2-(3-hidroxi-propoxi)-9H-purina-8-ol y compuestos similares fabricados por Sumitomo (por ejemplo, CL-029)).

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "análogos de guanosina" se refiere a un nucleótido similar a la guanosina (excluyendo la guanosina) que tiene una modificación química que implica la base de guanina, azúcar de nucleósido de guanosina o tanto la base de guanina como el azúcar de nucleósido de guanosina. Los análogos de guanosina incluyen específicamente, sin limitación, 7-desaza-guanosina.

40 Los análogos de guanosina incluyen además guanosinas sustituidas en C8 tales como 7-tia-8-oxoguanosina (inmunosina), 8-mercaptoguanosina, 8-bromoguanosina, 8-metilguanosa, 8-oxo-7,8-dihidroguanosina, C8-arilamino-2'-desoxiguanosina, C8-propinil-guanosina, ribonucleósidos de guanina sustituidos en C8 y N7 tales como 7-alil-8-oxoguanosina (loxoribina) y 7-metil-8-oxoguanosina, 8-aminoguanosina, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, 8-hidroxiguanosina y 7-desaza-guanosina 8-sustituida.

45 Los ligandos de TLR8 incluyen mezclas de ribonucleósidos que consisten esencialmente en G y U, ribonucleótidos de guanosina y ARN o moléculas de tipo ARN (documento PCT/US03/10406). También se desvelan ligandos de TLR8 adicionales en Gordon *et al.* J. Immunol. 2005,174:1259-1268).

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "agonista de TLR9" se refiere a cualquier agente que sea capaz de aumentar la señalización de TLR9 (es decir, un agonista de TLR9). Los agonistas de TLR9 incluyen específicamente, sin limitación, ácidos nucleicos inmunoestimulantes y, en particular, ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "ácidos nucleicos CpG inmunoestimulantes" u "oligonucleótidos CpG inmunoestimulantes" se refiere a cualquier ácido nucleico que contenga CpG que sea capaz de activar una célula inmunitaria. Al menos la C del dinucleótido CpG está normalmente, pero no necesariamente, no metilada. Se describen ácidos nucleicos CpG inmunoestimulantes en varias patentes expedidas y solicitudes de patentes publicadas, incluyendo patentes de los Estados Unidos N.º 6.194.388; 6.207.646; 6.218.371; 6.239.116; 6.339.068; 6.406.705; y 6.429.199.

60 En algunos ejemplos, los agonistas de los complejos que interactúan con el ácido nucleico son un oligonucleótido inmunoestimulante. Un "oligonucleótido inmunoestimulante" como se usa en el presente documento es cualquier ácido nucleico (ADN o ARN) que contenga un motivo inmunoestimulante o cadena principal que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria. Una inducción de una respuesta inmunitaria se refiere a cualquier aumento del número o la actividad de una célula inmunitaria o un aumento de la expresión o los niveles absolutos de un factor inmunitario, tal



como una citocina. Las células inmunitarias incluyen, pero sin limitación, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y otras células presentadoras de antígenos. Las citocinas incluyen, pero sin limitación, interleucinas, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , ligando Flt y moléculas coestimulantes. Los motivos inmunoestimulantes incluyen, pero sin limitación, motivos CpG y motivos ricos en T.

5

Un conjunto no limitante de oligonucleótidos inmunoestimulantes incluye:

**ARNbc (TLR 3): poli(A:C) y poli(I:C)**

**ARNmc (TLR7/8):**

10

CCGUCUGUUGUGUGACUC (SEQ ID NO: 13)  
 GCCACCGAGCCGAAGGCACC (SEQ ID NO: 14)  
 UAUUAUAUAUAUAUAUAUA (SEQ ID NO: 15)  
 UUAUAUAUAUAUAUAUAUA (SEQ ID NO: 16)  
 15 UUUUAUUUUUUUUUUUUUA (SEQ ID NO: 17)  
 UGUGUGUGUGUGUGUGUGUG (SEQ ID NO: 18)  
 UUGUUGUUGUUGUUGUUGU (SEQ ID NO: 19)  
 UUUGUUUGUUUGUUUGUUUG (SEQ ID NO: 20)  
 UUAUUUAUUUAUUUAUUUAU (SEQ ID NO: 21)  
 20 UUGUUUGUUUGUUUGUUUGU (SEQ ID NO: 22)  
 GCCCGUCUGUUGUGUGACUC (SEQ ID NO: 23)  
 GUCCUUCAAGUCCUCAA (SEQ ID NO: 24)

**ADN (TLR9):**

25

GGTGCATCGATGCAGGGGGG (SEQ ID NO: 25)  
 TCCATGGACGTTCTGAGCGTT (SEQ ID NO: 26)  
 TCGTCGTTTGAACGACGTTGAT (SEQ ID NO: 27)  
 TCGTCGACGATCCGCGCGCGCG (SEQ ID NO: 28)  
 30 GGGGTCAACGTTGAGGGGGG (SEQ ID NO: 29)  
 TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 30)  
 TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 31)  
 GGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO: 32)  
 GGGGACGACGTCGTGGGGGGG (SEQ ID NO: 33)  
 35 TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG (SEQ ID NO: 34)  
 TCGTCGTCGTTTGAACGACGTTGAT (SEQ ID NO: 35)

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden estar unidos al núcleo o entre sí o a otras moléculas tales como antígenos. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden conjugarse con un conector a través del extremo 5' o el extremo 3'. Por ejemplo, [Secuencia, 5'-3']-Conector o Conector-[Secuencia, 5'-3'].

40

Las expresiones "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente para indicar múltiples nucleótidos (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo, ribosa o desoxirribosa) unido a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, que es una pirimidina sustituida (por ejemplo, citosina (C), timidina (T) o uracilo (U)) o una purina sustituida (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)). Por tanto, la expresión abarca oligonucleótidos tanto de ADN como de ARN. Los términos también incluirán polinucleósidos (es decir, un polinucleótido menos el fosfato) y cualquier otro polímero que contenga bases orgánicas. Los oligonucleótidos pueden obtenerse a partir de fuentes de ácido nucleico existentes (por ejemplo, genómico o ADNc), pero son preferentemente sintéticos (por ejemplo, producidos por síntesis de ácido nucleico). Un polinucleótido de la construcción a nanoescala y opcionalmente unido a un núcleo de nanopartícula puede ser monocatenario o bicatenario. En el presente documento, un polinucleótido bicatenario también se denomina dúplex. Los oligonucleótidos bicatenarios de la invención pueden comprender dos cadenas de ácido nucleico complementarias separadas.

45

50

Como se usa en el presente documento, "dúplex" incluye una molécula o moléculas de ácido nucleico bicatenarias en las que las secuencias complementarias están unidas entre sí por enlaces de hidrógeno. Las secuencias complementarias pueden incluir una cadena con sentido y una cadena antisentido. La secuencia de nucleótidos antisentido puede ser idéntica o suficientemente idéntica al gen diana para mediar en la inhibición eficaz del gen diana (por ejemplo, al menos aproximadamente 98 % idéntica, 96 % idéntica, 94 %, 90 % idéntica, 85 % idéntica u 80 % idéntica) a la secuencia del gen diana.

60

Un polinucleótido bicatenario puede ser bicatenario en toda su longitud, lo que significa que no tiene secuencias monocatenarias salientes y, por tanto, tiene extremos romos. En otras realizaciones, las dos cadenas del polinucleótido bicatenario pueden tener diferentes longitudes, produciendo uno o más salientes monocatenarios. Un polinucleótido bicatenario de la invención puede contener desapareamientos y/o bucles o protuberancias. En algunas realizaciones, es bicatenario en al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la longitud del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el polinucleótido bicatenario de la invención contiene al menos o hasta 1, 2,

65

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 desapareamientos.

Los polinucleótidos asociados con la invención pueden modificarse tal como en el resto de azúcar, el enlace fosfodiéster y/o la base. Como se usa en el presente documento, "restos de azúcar" incluye azúcares naturales, sin modificar, incluyendo pentosa, ribosa y desoxirribosa, azúcares modificados y análogos de azúcar. Las modificaciones de los restos de azúcar pueden incluir el reemplazo de un grupo hidroxilo con un halógeno, un heteroátomo o un grupo alifático, y pueden incluir la funcionalización del grupo hidroxilo como, por ejemplo, un éter, amina o tiol.

La modificación de restos de azúcar puede incluir 2'-O-metil nucleótidos, que se denominan "metilados". En algunos casos, los polinucleótidos asociados con la invención pueden contener solo restos de azúcar modificados o no modificados, mientras que en otros casos, los polinucleótidos contienen algunos restos de azúcar que están modificados y otros que no.

En algunos casos, los nucleomonómeros modificados incluyen ribonucleótidos con azúcar o cadena principal modificados. Los ribonucleótidos modificados pueden contener una base de origen no natural tales como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5', por ejemplo, 5'-(2-amino)propil uridina y 5'-bromo uridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, por ejemplo, 8-bromo guanosina; desaza nucleótidos, por ejemplo, 7-desaza adenosina; y nucleótidos N-alquilados, por ejemplo, N6-metil adenosina. Además, los ribonucleótidos modificados con azúcar pueden tener el grupo 2'-OH reemplazado por un H, alcoxi (u OR), R o alquilo, halógeno, SH, SR, amino (tal como NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>), o grupo CN, en donde R es alquilo inferior, alqueno o alquino. En algunas realizaciones, los ribonucleótidos modificados pueden tener el grupo fosfodiéster conectado a ribonucleótidos adyacentes reemplazados por un grupo modificado, tal como un grupo fosforotioato.

En algunos aspectos, las modificaciones de 2'-O-metilo pueden ser beneficiosas para reducir las respuestas indeseables de tensión celular, tales como la respuesta de interferón a ácidos nucleicos bicatenarios. Los azúcares modificados pueden incluir D-ribosa, 2'-O-alquilo (incluyendo 2'-O-metilo y 2'-O-etilo), es decir, 2'-alcoxi, 2'-amino, 2'-S-alquilo, 2'-halo (incluyendo 2'-fluro), 2'-metoxietoxi, 2'-aliloxi (-OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 2'-propargilo, 2'-propilo, etinilo, etenilo, propenilo y ciano y similares. El resto de azúcar también puede ser una hexosa.

El término "alquilo" incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc.), grupos alquilo de cadena ramificada (isopropilo, *tert*-butilo, isobutilo, etc.), grupos cicloalquilo (alíclicos) (ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En algunas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o ramificada tiene 6 átomos de carbono o menos en su cadena principal (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, para cadena lineal, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> para cadena ramificada) y más preferentemente 4 o menos. De forma análoga, los cicloalquilos preferidos tienen de 3 a 8 átomos de carbono en su estructura de anillo y más preferentemente tienen 5 o 6 carbonos en la estructura de anillo. La expresión C1-C6 incluye grupos alquilo que contienen de 1 a 6 átomos de carbono.

A menos que se especifique otra cosa, el término alquilo incluye tanto "alquilos sin sustituir" como "alquilos sustituidos", el último de los cuales se refiere a restos alquilo que tienen sustituyentes seleccionados de manera independiente que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo. Dichos sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, alqueno, alquino, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcocarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcocarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcóxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarbonilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterocicilo, alquilarilo o un resto aromático o heteroaromático. Los cicloalquilos pueden sustituirse adicionalmente, por ejemplo, con los sustituyentes descritos anteriormente. Un resto "alquilarilo" o "arilalquilo" es un alquilo sustituido con un arilo (por ejemplo, fenilmetilo (bencilo)). El término "alquilo" también incluye las cadenas laterales de aminoácidos naturales y no naturales. La expresión "n-alquilo" significa un grupo alquilo sin sustituir de cadena lineal (es decir, no ramificada).

El término "alqueno" incluye grupos alifáticos insaturados análogos en cuanto a longitud y posible sustitución de los alquilos descritos anteriormente, pero que contienen al menos un doble enlace. Por ejemplo, el término "alqueno" incluye grupos alqueno de cadena lineal (por ejemplo, etilenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo, decenilo, etc.), grupos alqueno de cadena ramificada, grupos cicloalqueno (alíclicos) (ciclopropenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo), grupos cicloalqueno sustituidos con alquilo o alqueno y grupos alqueno sustituidos con cicloalquilo o cicloalqueno. En algunas realizaciones, un grupo alqueno de cadena lineal o ramificada tiene 6 átomos de carbono o menos en su cadena principal (por ejemplo, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> para cadena lineal, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> para cadena ramificada). De forma análoga, los cicloalquenos preferidos pueden tener de 3 a 8 átomos de carbono en su estructura de anillo y más preferentemente tienen 5 o 6 carbonos en la estructura de anillo. La expresión C2-C6 incluye grupos alqueno que contienen de 2 a 6 átomos de carbono.

A menos que se especifique otra cosa, el término alqueno incluye tanto "alquenos sin sustituir" como "alquenos sustituidos", el último de los cuales se refiere a restos alqueno que tienen sustituyentes seleccionados de manera

independiente que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo.

Dichos sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, grupos alquilo, grupos alquinilo, halógenos, hidroxilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcoxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfínilo, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo o un resto aromático o heteroaromático.

La expresión "modificaciones hidrófobas" se refiere a la modificación de bases de tal manera que aumente la hidrofobicidad general y la base aún sea capaz de formar interacciones de Watson-Crick casi regulares. Los ejemplos no limitantes de modificaciones de bases incluyen modificaciones de uridina y citidina en posición 5 como fenilo, 4-piridilo, 2-piridilo, indolilo e isobutilo, fenilo (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH); triptofanilo (C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N)CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CO), isobutilo, butilo, aminobencilo; fenilo; naftilo. El término "heteroátomo" incluye átomos de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. En algunas realizaciones, son heteroátomos preferidos nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. El término "hidroxi" o "hidroxilo" incluye grupos con un -OH u -O<sup>-</sup> (con un contraíón apropiado). El término "halógeno" incluye flúor, bromo, cloro, yodo, etc. El término "perhalogenado" se refiere en general a un resto en donde todos los hidrógenos se reemplazan por átomos de halógeno.

El término "sustituido" incluye sustituyentes seleccionados de manera independiente que pueden colocarse en el resto y que permiten que la molécula realice su función prevista. Los ejemplos de sustituyentes incluyen grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, (CR'R'')<sub>0-3</sub>NR'R'', (CR'R'')<sub>0-3</sub>CN, NO<sub>2</sub>, halógeno, (CR'R'')<sub>0-3</sub>C(halógeno)<sub>3</sub>, (CR'R'')<sub>0-3</sub>CH(halógeno)<sub>2</sub>, (CR'R'')<sub>0-3</sub>CH<sub>2</sub>(halógeno), (CR'R'')<sub>0-3</sub>CONR'R'', (CR'R'')<sub>0-3</sub>S(O)<sub>1-2</sub>NR'R'', (CR'R'')<sub>0-3</sub>CHO, (CR'R'')<sub>0-3</sub>O(CR'R'')<sub>0-3</sub>H, (CR'R'')<sub>0-3</sub>S(O)<sub>0-2</sub>R', (CR'R'')<sub>0-3</sub>O(CR'R'')<sub>0-3</sub>H, (CR'R'')<sub>0-3</sub>COR', (CR'R'')<sub>0-3</sub>CO<sub>2</sub>R' o (CR'R'')<sub>0-3</sub>OR'; en donde cada R' y R'' son cada uno de manera independiente hidrógeno, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> o grupo arilo, o R' y R'' tomados juntos son un grupo bencilideno o un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-.

El término "amina" o "amino" incluye compuestos o restos en los que un átomo de nitrógeno está unido covalentemente a al menos un carbono o heteroátomo. El término "alquilamino" incluye grupos y compuestos en donde el nitrógeno está unido a al menos un grupo alquilo adicional. El término "dialquilamino" incluye grupos en donde el átomo de nitrógeno está unido a al menos dos grupos alquilo adicionales.

El término "éter" incluye compuestos o restos que contienen un oxígeno unido a dos átomos de carbono o heteroátomos diferentes. Por ejemplo, el término incluye "alcoxialquilo", que se refiere a un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo unido covalentemente a un átomo de oxígeno que está unido covalentemente a otro grupo alquilo.

El término "base" incluye las bases heterocíclicas de purina y pirimidina conocidas, desazapurinas y análogos (incluyendo los análogos heterocíclicos sustituidos, por ejemplo, aminoetioxi-fenoxazina), derivados (por ejemplo, derivados 1-alquil-, 1-alquenil-, heteroaromáticos y 1-alquinílicos) y tautómeros de los mismos. Los ejemplos de purinas incluyen adenina, guanina, inosina, diaminopurina y xantina y análogos (por ejemplo, 8-oxo-N<sup>6</sup>-metiladenina o 7-diazaxantina) y derivados de los mismos. Las pirimidinas incluyen, por ejemplo, timina, uracilo y citosina, y sus análogos (por ejemplo, 5-metilcitosina, 5-metiluracilo, 5-(1-propinil)uracilo, 5-(1-propinil)citosina y 4,4-etanocitosina). Otros ejemplos de bases adecuadas incluyen bases no purinílicas y no pirimidinílicas tales como 2-aminopiridina y triazinas.

En algunos aspectos, los nucleomonómeros de un polinucleótido de la divulgación son nucleótidos de ARN, incluyendo nucleótidos de ARN modificados.

El término "nucleósido" incluye bases que están unidas covalentemente a un resto de azúcar, preferentemente ribosa o desoxirribosa. Los ejemplos de nucleósidos preferidos incluyen ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos. Los nucleósidos también incluyen bases unidas a aminoácidos o análogos de aminoácidos que pueden comprender grupos carboxilo libres, grupos amino libres o grupos protectores. Los grupos protectores adecuados son bien conocidos en la técnica (véase P. G. M. Wuts y T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2<sup>a</sup> Ed., Wiley-Interscience, Nueva York, 1999).

El término "nucleótido" incluye nucleósidos que además comprenden un grupo fosfato o un análogo de fosfato.

Como se usa en el presente documento, el término "enlace" incluye un resto fosfodiéster sin modificar (-O-(PO<sup>2</sup>)-O-), de origen natural, que se acopla covalentemente a nucleomonómeros adyacentes. Como se usa en el presente documento, la expresión "enlace sustituto" incluye cualquier análogo o derivado del grupo fosfodiéster nativo que se acopla covalentemente a nucleomonómeros adyacentes. Los enlaces sustitutos incluyen análogos de fosfodiéster, por ejemplo, fosforotioato, fosforoditioato y P-etoxifosfodiéster, P-etoxifosfodiéster, P-alquiloifosfotriéster, metilfosfonato y enlaces que no contienen fósforo, por ejemplo, acetales y amidas. Dichos enlaces sustitutos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Bjergarde *et al.* 1991. Nucleic Acids Res. 19:5843; Caruthers *et al.* 1991. Nucleosides Nucleotides. 10:47). En determinadas realizaciones, se prefieren enlaces no hidrolizables, tales como enlaces de

fosforotioato.

En algunos aspectos, los polinucleótidos de la invención comprenden los extremos 3' y 5' (excepto para oligonucleótidos circulares). Los extremos 3' y 5' de un polinucleótido pueden estar sustancialmente protegidos de las nucleasas, por ejemplo, por modificación de los enlaces 3' o 5' (por ejemplo, patente de los Estados Unidos N.º 5.849.902 y documento WO 98/13526). Los oligonucleótidos pueden hacerse resistentes mediante la inclusión de un "grupo de bloqueo". La expresión "grupo de bloqueo" como se usa en el presente documento se refiere a sustituyentes (por ejemplo, que no sean grupos OH) que pueden unirse a oligonucleótidos o nucleomonómeros, ya sea como grupos protectores o grupos de acoplamiento para síntesis (por ejemplo, FITC, propilo (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), glicol (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-) fosfato (PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), fosfonato de hidrógeno o fosforamidita). Los "grupos de bloqueo" también incluyen "grupos de bloqueo de extremos" o "grupos de bloqueo de exonucleasa" que protegen los extremos 5' y 3' del oligonucleótido, incluyendo nucleótidos modificados y estructuras no nucleotídicas resistentes a la exonucleasa.

Los ejemplos de grupos de bloqueo de extremos incluyen estructuras de caperuza (por ejemplo, una caperuza de 7-metilguanosa), nucleomonómeros invertidos, por ejemplo, con inversiones finales de 3'-3' o 5'-5' (véase, por ejemplo, Ortiagao *et al.* 1992. *Antisense Res. Dev.* 2: 129), metilfosfonato, fosforamidita, grupos no nucleotídicos (por ejemplo, conectores no nucleotídicos, conectores amino, conjugados) y similares. El nucleomonómero 3' terminal puede comprender un resto de azúcar modificado. El nucleomonómero 3' terminal comprende un 3'-O que puede estar opcionalmente sustituido por un grupo de bloqueo que evita la degradación por 3'-exonucleasa del oligonucleótido. Por ejemplo, el 3'-hidroxilo puede esterificarse a un nucleótido a través de un enlace internucleotídico 3'→3'. Por ejemplo, el radical alquiloxi puede ser metoxi, etoxi o isopropoxi y, preferentemente, etoxi. Opcionalmente, el nucleótido unido 3'→3' en el extremo 3' puede estar unido por un enlace sustituto. Para reducir la degradación por nucleasa, el enlace 3'→5' más cercano a 5' puede ser un enlace modificado, por ejemplo, un enlace fosforotioato o un enlace P-alquiloxfosfotriéster. Preferentemente, los dos enlaces 3'→5' más cercanos a 5' son enlaces modificados. Opcionalmente, el resto hidroxilo 5' terminal puede esterificarse con un resto que contiene fósforo, por ejemplo, fosfato, fosforotioato o P-etoxifosfato.

En algunos aspectos, los polinucleótidos pueden comprender tanto ADN como ARN.

En algunos aspectos, al menos una parte de los polinucleótidos contiguos están unidos por un enlace sustituto, por ejemplo, un enlace de fosforotioato. La presencia de enlaces sustitutos puede mejorar la farmacocinética debido a su mayor afinidad por las proteínas séricas.

Las secuencias de CpG, aunque son relativamente poco habituales en ADN humano, se encuentran habitualmente en el ADN de organismos infecciosos tales como bacterias. Aparentemente, el sistema inmunitario humano ha evolucionado para reconocer las secuencias de CpG como una señal de advertencia temprana de infección e iniciar una respuesta inmunitaria inmediata y potente contra los patógenos invasores sin provocar reacciones adversas frecuentemente observadas con otros agentes inmunoestimulantes. Por tanto, los ácidos nucleicos que contienen CpG, basándose en este mecanismo de defensa inmunitaria innato, pueden utilizar una ruta única y natural para la terapia inmunitaria. Los efectos de ácidos nucleicos CpG sobre la modulación inmunitaria se han descrito exhaustivamente en la patente de los Estados Unidos N.º 6.194.388 y solicitudes de patente publicadas, tales como los documentos PCT US95/01570), PCT/US97/19791, PCT/US98/03678; PCT/US98/10408; PCT/US98/04703; PCT/US99/07335; y PCT/US99/09863.

Un "oligonucleótido CpG" es un ácido nucleico que incluye al menos un dinucleótido CpG no metilado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico incluye tres o más dinucleótidos CpG no metilados. Un ácido nucleico que contiene al menos un "dinucleótido CpG no metilado" es una molécula de ácido nucleico que contiene una citosina no metilada en una secuencia de dinucleótido de citosina-guanina (es decir, El "ADN CpG" o ADN que contiene una citosina 5' seguida de guanosa 3' y unida por un enlace fosfato) y activa el sistema inmunitario.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la construcción a nanoescala preferentemente tienen una longitud en el intervalo de 6 a 100 bases. Sin embargo, los ácidos nucleicos de cualquier tamaño superior a 6 nucleótidos (incluso muchos kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria según la invención si están presentes suficientes motivos inmunoestimulantes. Preferentemente, el ácido nucleico inmunoestimulante tiene un tamaño en el intervalo de entre 8 y 100 y en algunas realizaciones entre 8 y 50 u 8 y 30 nucleótidos.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen una cadena principal modificada tal como una cadena principal de fosforotioato (PS). En otras realizaciones, los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen una cadena principal de fosfodiéster (PO). En otras realizaciones más, los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen una cadena principal mixta de PO y PS.

#### **Fijación de modalidades a núcleos de nanopartículas**

Se pueden unir modalidades asociadas con la invención, incluyendo agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico y antígenos, a núcleos de nanopartículas por cualquier medio conocido en la técnica. Se describen en detalle métodos para unir oligonucleótidos a nanopartículas en la publicación de patente de los Estados Unidos

n.º 2010/0129808.

Una nanopartícula puede funcionalizarse para que se una a un polinucleótido. Como alternativa, o adicionalmente, el polinucleótido puede funcionalizarse. Un mecanismo para la funcionalización es el método de alcanotiol, por el que los oligonucleótidos se funcionalizan con alcanotioles en sus extremos 3' o 5' antes de su unión a nanopartículas de oro o nanopartículas que comprenden otros metales, semiconductores o materiales magnéticos. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en Whitesides, Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry, Houston, Tex., páginas 109-121 (1995) y Mucic *et al.* Chem. Commun. 555-557 (1996). Los oligonucleótidos también se pueden unir a nanopartículas usando otros grupos funcionales tales como grupos fosforotioato, como se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.472.881 o alquilsiloxanos sustituidos, como se describe en Burwell, Chemical Technology, 4, 370-377 (1974) y Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191 (1981). En algunos casos, los polinucleótidos se unen a nanopartículas al terminar el polinucleótido con un tionucleósido 5' o 3'. En otros casos, se usa un proceso de envejecimiento para unir polinucleótidos a nanopartículas como se describe en las patentes de los Estados Unidos n.º 6.361.944, 6.506.569, 6.767.702 y 6.750.016 y las publicaciones PCT n.º WO 1998/004740, WO 2001/000876, WO 2001/051665 y WO 2001/073123.

En algunos casos, el ácido nucleico y/o el antígeno están unidos covalentemente al núcleo de nanopartículas, tal como a través de un enlace oro-tiol. Se puede incluir una secuencia espaciadora entre el sitio de unión y el resto de control de absorción y/o el resto de unión. En algunos ejemplos de la divulgación, una secuencia espaciadora comprende o consiste en un oligonucleótido, un péptido, un polímero o un oligoetileno.

Se pueden diseñar construcciones a nanoescala con múltiples químicas. Por ejemplo, se puede usar un enlace DTPA (ditiol fosforamidita). El DTPA resiste la liberación intracelular de erupciones por los tioles y puede servir para aumentar la relación de señal con respecto a ruido.

Los conjugados producidos por los métodos descritos en el presente documento son considerablemente más estables que los producidos por otros métodos. Esta mayor estabilidad se debe al aumento de la densidad de los oligonucleótidos en las superficies de un núcleo de nanopartículas o que forman la superficie de la corona. Al realizar las adiciones de sal en presencia de un tensioactivo, por ejemplo, aproximadamente dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,01 %, Tween o polietilenglicol (PEG), el proceso de envejecimiento de la sal se puede realizar en aproximadamente una hora.

La densidad de superficie puede depender del tamaño y tipo de nanopartículas y de la longitud, secuencia y concentración de los oligonucleótidos. Se puede determinar empíricamente una densidad de superficie adecuada para estabilizar las nanopartículas y las condiciones necesarias para obtenerla para una combinación deseada de nanopartículas y oligonucleótidos. En general, una densidad de superficie de al menos 10 picomoles/cm será adecuada para proporcionar conjugados estables de nanopartículas-oligonucleótidos. Preferentemente, la densidad de superficie es de al menos 15 picomoles/cm. Ya que la capacidad de los oligonucleótidos de los conjugados para hibridar con dianas puede disminuir si la densidad de superficie es demasiado grande, opcionalmente la densidad de superficie no es mayor de aproximadamente 35-40 picomoles/cm<sup>2</sup>. También se proporcionan métodos en donde el oligonucleótido se une a la nanopartícula a una densidad de superficie de al menos 10 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 15 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 20 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 25 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 30 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 35 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 40 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 45 pmol/cm, al menos 50 pmol/cm<sup>2</sup> o 50 pmol/cm<sup>2</sup> o más.

#### 45 **Productos terapéuticos**

Algunos aspectos de la divulgación se refieren a la administración de construcciones a nanoescala a un sujeto para su uso terapéutico y/o de diagnóstico. Las partículas pueden administrarse solas o en cualquier vehículo farmacéutico apropiado, tal como un líquido, por ejemplo solución salina, o un polvo, para administración *in vivo*. También se pueden administrar conjuntamente con partículas transportadoras mayores o dentro de dispositivos de administración. Las partículas pueden formularse. Las formulaciones pueden administrarse en soluciones farmacéuticamente aceptables, que habitualmente pueden contener concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. En algunas realizaciones, las construcciones a nanoescala asociadas con la invención se mezclan con una sustancia tal como una loción (por ejemplo, aquaphor) y se administran a la piel de un sujeto, por lo que las construcciones a nanoescala se administran a través de la piel del sujeto. Debería apreciarse que cualquier método de administración de nanopartículas conocido en la técnica puede ser compatible con aspectos de la invención.

Para su uso en terapia, se puede administrar una cantidad eficaz de partículas a un sujeto por cualquier modo que suministre las partículas a la célula deseada. La administración de composiciones farmacéuticas puede realizarse por cualquier medio conocido por el experto en la materia. Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, oral, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, mucosa, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación, ocular, vaginal, dérmica, rectal y por inyección directa.

Por tanto, la invención, en un aspecto, implica el descubrimiento de que los agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico son muy eficaces en la mediación de los efectos inmunoestimulantes. Estos agonistas de

complejos que interactúan con el ácido nucleico son útiles terapéutica y profilácticamente para estimular el sistema inmunitario para tratar el cáncer, enfermedades infecciosas, alergia, asma, enfermedad autoinmunitaria y otros trastornos y para ayudar a proteger contra infecciones oportunistas después de quimioterapia contra el cáncer. Las respuestas inmunitarias celulares y humorales, fuertes pero equilibradas, que resultan de, por ejemplo, la estimulación agonista de TLR, reflejan el propio sistema de defensa natural del cuerpo contra patógenos invasores y células cancerosas.

Por tanto, los agonistas de los complejos que interactúan con el ácido nucleico útiles en algunos aspectos de la invención como una vacuna para el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar o un sujeto que tiene alergia o asma, una infección con un organismo infeccioso o un cáncer en el que se ha identificado un antígeno de cáncer específico. Los agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico también se pueden proporcionar sin el antígeno o alérgeno para protección contra la infección, alergia o cáncer, y en este caso las dosis repetidas pueden permitir protección a más largo plazo. Un sujeto en riesgo como se usa en el presente documento es un sujeto que tenga cualquier riesgo de exposición a un patógeno causante de infección o un cáncer o un alérgeno o un riesgo de desarrollar cáncer. Por ejemplo, un sujeto en riesgo puede ser un sujeto que está planeando viajar a un área donde se encuentra un tipo particular de agente infeccioso o puede ser un sujeto que, por estilo de vida o procedimientos médicos, está expuesto a fluidos corporales que pueden contener organismos infecciosos o directamente al organismo o incluso cualquier sujeto que viva en un área donde se haya identificado un organismo infeccioso o un alérgeno. Los sujetos en riesgo de desarrollar infección también incluyen poblaciones generales a las que una agencia médica recomienda vacunación con un antígeno de organismo infeccioso particular. Si el antígeno es un alérgeno y el sujeto desarrolla respuestas alérgicas a ese antígeno particular y el sujeto puede estar expuesto al antígeno, es decir, durante la temporada de polen, entonces ese sujeto está en riesgo de exposición al antígeno.

Un sujeto que tiene una infección es un sujeto que ha sido expuesto a un patógeno infeccioso y tiene niveles detectables agudos o crónicos del patógeno en el cuerpo. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de CpG pueden usarse con o sin un antígeno para montar una respuesta inmunitaria sistémica o mucosa específica de antígeno que sea capaz de reducir el nivel de o erradicar el patógeno infeccioso. Una enfermedad infecciosa, como se usa en el presente documento, es una enfermedad que surge de la presencia de un microorganismo extraño en el cuerpo. Es particularmente importante desarrollar estrategias de vacuna y tratamientos eficaces para proteger las superficies mucosas del cuerpo, que son el sitio primario de entrada de patógenos.

Un sujeto que tiene una alergia es un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una reacción alérgica en respuesta a un alérgeno. Una alergia se refiere a la hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Las condiciones alérgicas incluyen, pero sin limitación, eccema, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, conjuntivitis, asma bronquial, urticaria (habones) y alergias alimentarias, y otras afecciones atópicas.

Un sujeto que tiene un cáncer es un sujeto que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. Los cánceres o tumores incluyen, pero sin limitación, cáncer de las vías biliares; cáncer de cerebro; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias intraepiteliales; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y no microcítico); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas. En una realización, el cáncer es tricoleucemia, leucemia mielógena crónica, leucemia cutánea de linfocitos T, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de células de vejiga o carcinoma de colon.

Un sujeto significará un ser humano o animal vertebrado incluyendo, pero sin limitación, un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pavo, pollo, primate, por ejemplo, mono, y peces (especies acuícolas), por ejemplo, salmón. Por tanto, la invención también se puede usar para tratar cáncer y tumores, infecciones y alergia/asma en sujetos no humanos.

Como se usa en el presente documento, los términos tratar, tratado o tratando cuando se usan con respecto a un trastorno tal como una enfermedad infecciosa, cáncer, alergia o asma se refieren a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto al desarrollo de la enfermedad (por ejemplo, a infección con un patógeno) o, en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle la enfermedad (por ejemplo, se infecte con el patógeno), así como un tratamiento después de que el sujeto haya desarrollado la enfermedad para combatir la enfermedad (por ejemplo, reducir o eliminar la infección) o prevenir el empeoramiento de la enfermedad.

Un antígeno como se usa en el presente documento es una molécula capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Los antígenos incluyen, pero sin limitación, células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, miméticos peptídicos y no peptídicos de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glucolípidos, hidratos de carbono, virus y extractos víricos y organismos multicelulares como parásitos y alérgenos. El término antígeno incluye en general cualquier tipo de molécula que un sistema inmunitario del hospedador reconozca como extraño. Los antígenos incluyen, pero sin limitación, antígenos de cáncer, antígenos microbianos y alérgenos.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "antígeno canceroso" y "antígeno tumoral" se usan indistintamente para hacer referencia a antígenos que son expresados diferencialmente por células cancerosas y, por lo tanto, pueden aprovecharse para dirigirse a células cancerosas. Los antígenos de cáncer son antígenos que pueden estimular potencialmente respuestas inmunitarias aparentemente específicas de tumor. Algunos de estos antígenos están codificados, aunque no necesariamente expresados, en células normales. Estos antígenos pueden caracterizarse como los que normalmente son inactivos (es decir, no expresados) en células normales, los que se expresan solo en ciertas etapas de diferenciación y los que se expresan temporalmente, tales como antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos cancerosos están codificados por genes celulares mutantes, tales como oncogenes (por ejemplo, oncogén ras activado), genes supresores (por ejemplo, p53 mutante), proteínas de fusión resultantes de supresiones internas o translocaciones cromosómicas. Otros antígenos de cáncer más pueden estar codificados por genes víricos tales como los transportados por virus tumorales de ARN y ADN. Un antígeno canceroso es un compuesto, tal como un péptido o una proteína, asociado con una superficie celular tumoral o cancerosa y que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria cuando se expresa en la superficie de una célula presentadora de antígenos en el contexto de una molécula del MHC. Se pueden preparar antígenos cancerosos a partir de células cancerosas ya sea preparando extractos en bruto de células cancerosas, por ejemplo, como se describe en Cohen, *et al.*, 1994, *Cancer Research*, 54:1055, purificando parcialmente los antígenos, mediante tecnología recombinante o mediante síntesis de novo de antígenos conocidos.

Un antígeno microbiano como se usa en el presente documento es un antígeno de un microorganismo e incluye, pero sin limitación, virus, bacterias, parásitos y hongos. Dichos antígenos incluyen el microorganismo intacto, así como aislados naturales y fragmentos o derivados del mismo, y también compuestos sintéticos que son idénticos o similares a antígenos de microorganismos naturales e inducen una respuesta inmunitaria específica para ese microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno de microorganismo natural si induce una respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) a un antígeno de microorganismo natural. Dichos antígenos se usan de manera rutinaria en la técnica y son bien conocidos por los expertos habituales en la materia.

Los ejemplos de virus que se han encontrado en seres humanos incluyen, pero sin limitación: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tal como VIH-1 (también denominado HDTV-III, LAVE o HTLV-III/IV, o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que provocan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus paragripal, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo, virus del Hantaan, virus b unga, flebovirus y virus del Nairo); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes; *Poxviridae* (virus variola, virus vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no-A, no B (clase 1 = transmitida internamente; clase 2 = transmitida por vía parenteral (es decir, Hepatitis C); virus Norwalk y relacionados, y astrovirus).

Las bacterias tanto gramnegativas como grampositivas actúan como antígenos en animales vertebrados. Dichas bacterias grampositivas incluyen, pero sin limitación, especies de *Pasteurella*, especies de *Staphylococcus* y especies de *Streptococcus*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero sin limitación, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero sin limitación, *Helicobacter pyloris*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps. anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patógena, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

Los ejemplos de hongos incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen *Plasmodium spp.* tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax* y *Toxoplasma gondii*. Los parásitos transmitidos por la sangre y/o tisulares incluyen *Plasmodium spp.*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania spp.*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense* (enfermedad del sueño africana), *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) y *Toxoplasma gondii*.

Otros microorganismos médicamente relevantes se han descrito exhaustivamente en la bibliografía, por ejemplo, véase C.G.A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983.

5 Un alérgeno se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insectos, polvo de caspa animal, esporas y fármacos fúngicos (por ejemplo, penicilina). Los ejemplos de alérgenos animales y vegetales naturales incluyen, pero sin limitación, proteínas específicas de los siguientes géneros: *Canis* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (por ejemplo, *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (por ejemplo, *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); aliso, *Alnus* (*Alnus gultinoasa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europa*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (por ejemplo, *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por ejemplo, *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); *Blattella* (por ejemplo, *Blattella germanica*); *Apis* (por ejemplo, *Apis multiflorum*); *Cupressus* (por ejemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (por ejemplo, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* y *Juniperus ashei*); *Thuya* (por ejemplo, *Thuya orientalis*); *Chamaecyparis* (por ejemplo, *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (por ejemplo, *Periplaneta americana*); *Agropyron* (por ejemplo, *Agropyron repens*); *Secale* (por ejemplo, *Secale cereale*); *Triticum* (por ejemplo, *Triticum aestivum*); *Dactylis* (por ejemplo, *Dactylis glomerata*); *Festuca* (por ejemplo, *Festuca elatior*); *Poa* (por ejemplo, *Poa pratensis* o *Poa compressa*); *Avena* (por ejemplo, *Avena sativa*); *Holcus* (por ejemplo, *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (por ejemplo, *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (por ejemplo, *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (por ejemplo, *Agrostis alba*); *Phleum* (por ejemplo, *Phleum pratense*); *Phalaris* (por ejemplo, *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (por ejemplo, *Paspalum notatum*); *Sorghum* (por ejemplo, *Sorghum halepensis*); y *Bromus* (por ejemplo, *Bromus inermis*).

25 Las construcciones a nanoescala de la invención también pueden recubrirse o administrarse junto con un agente antimicrobiano. Un agente antimicrobiano, como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto de origen natural o sintético que es capaz de matar o inhibir microorganismos infecciosos. El tipo de agente antimicrobiano útil dependerá del tipo de microorganismo con el que el sujeto está infectado o en riesgo de infectarse. Los agentes antimicrobianos incluyen, pero sin limitación, agentes antibacterianos, agentes antivíricos, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios. Expresiones tales como "agente antiinfeccioso", "agente antibacteriano", "agente antivírico", "agente antifúngico", "agente antiparasitario" y "parasitocida" tienen significados bien establecidos para los expertos habituales en la materia y se definen en textos médicos convencionales. En resumen, los agentes antibacterianos matan o inhiben las bacterias e incluyen antibióticos, así como otros compuestos sintéticos o naturales que tienen funciones similares. Los antibióticos son moléculas de bajo peso molecular que son producidas como metabolitos secundarios por células, tales como microorganismos. En general, los antibióticos interfieren con una o más funciones o estructuras bacterianas que son específicas para el microorganismo y que no están presentes en células hospedadoras. Los agentes antivíricos pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse y son útiles para destruir o inhibir virus. Se usan agentes antifúngicos para tratar infecciones fúngicas superficiales, así como infecciones fúngicas sistémicas oportunistas y primarias. Los agentes antiparasitarios matan o inhiben parásitos.

40 Los agentes antibacterianos matan o inhiben el crecimiento o la función de bacterias. Una gran clase de agentes antibacterianos son los antibióticos. Los antibióticos que son eficaces para matar o inhibir una amplia gama de bacterias, se denominan antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos son predominantemente eficaces contra las bacterias de la clase grampositiva o gramnegativa. Estos tipos de antibióticos se denominan antibióticos de espectro estrecho. Otros antibióticos que son eficaces contra un solo organismo o enfermedad y no contra otros tipos de bacterias, se denominan antibióticos de espectro limitado. Los agentes antibacterianos se clasifican en ocasiones según su modo de acción primario. En general, son agentes antibacterianos inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la síntesis de ácido nucleico o funcionales e inhibidores competitivos.

50 Los agentes antivíricos son compuestos que previenen la infección de las células por virus o la replicación del virus dentro de la célula. Existen muchos menos fármacos antivíricos que antibacterianos porque el proceso de replicación vírica está tan estrechamente relacionado con la replicación del ADN dentro de la célula hospedadora, que los agentes antivíricos inespecíficos serían con frecuencia tóxicos para el hospedador. Hay varias etapas dentro del proceso de infección vírica que pueden ser bloqueadas o inhibidas por agentes antivíricos. Estas etapas incluyen unión del virus a la célula hospedadora (inmunoglobulina o péptidos de unión), desprendimiento de la envoltura del virus (por ejemplo, amantadina), síntesis o traducción de ARNm vírico (por ejemplo, interferón), replicación de ARN o ADN vírico (por ejemplo, análogos de nucleótidos), maduración de nuevas proteínas víricas (por ejemplo, inhibidores de proteasa) y gemación y liberación del virus.

60 Las construcciones de la invención también pueden administrarse junto con un anticuerpo terapéutico o de diagnóstico. En una realización, el anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en Ributaxina, Herceptin, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART ID 10 Ab, SMART ABL 364 Ab, rituxan, bevacizumab e ImmuRAIT-CEA.



Los agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico también son útiles para tratar y prevenir enfermedades autoinmunitarias. La enfermedad autoinmunitaria es una clase de enfermedades en las que los propios anticuerpos de un sujeto reaccionan con tejido del hospedador o en las que los linfocitos T efectores inmunitarios son autorreactivos a péptidos endógenos propios y provocan destrucción del tejido. Por tanto, se monta una respuesta inmunitaria contra los propios antígenos de un sujeto, denominados autoantígenos. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (LES), encefalomiелitis autoinmunitaria, miastenia grave (MG), tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pénfigo (por ejemplo, pénfigo vulgar), enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, esclerodermia con anticuerpos anticolágeno, enfermedad mixta del tejido conectivo, polimiositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad asociada a autoinmunidad, glomerulonefritis (por ejemplo, glomerulonefritis semilunar, glomerulonefritis proliferativa), pénfigo ampolloso, síndrome de Sjogren, resistencia a la insulina y diabetes mellitus autoinmunitaria.

Un "autoantígeno" como se usa en el presente documento se refiere a un antígeno de un tejido hospedador normal. El tejido hospedador normal no incluye células cancerosas. Por tanto, una respuesta inmunitaria montada contra un autoantígeno, en el contexto de una enfermedad autoinmunitaria, es una respuesta inmunitaria indeseable y contribuye a la destrucción y al daño del tejido normal, mientras que una respuesta inmunitaria montada contra un antígeno de cáncer es una respuesta inmunitaria deseable y contribuye a la destrucción del tumor o cáncer. Por tanto, en algunos aspectos de la invención destinados al tratamiento de trastornos autoinmunitarios, no se recomienda que los ácidos nucleicos inmunoestimulantes de CpG se administren con autoantígenos, particularmente los que son las dianas del trastorno autoinmunitario.

En otros casos, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG pueden administrarse con dosis bajas de autoantígenos. Varios estudios en animales han demostrado que la administración mucosa de dosis bajas de antígeno puede dar como resultado un estado de hiposensibilidad inmunitaria o "tolerancia". El mecanismo activo parece ser una desviación inmunitaria mediada por citocinas lejos de una respuesta Th1 hacia una predominantemente Th2 y Th3 (es decir, dominada por TGF- $\beta$ ). La supresión activa con dosis bajas de administración de antígeno también puede suprimir una respuesta inmunitaria no relacionada (supresión circunstancial) que es de considerable interés en la terapia de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide y LES. La supresión circunstancial implica la secreción de citocinas supresoras, contrarreguladoras de Th1, en el entorno local donde se liberan citocinas proinflamatorias y Th1 de una manera específica de antígeno o inespecífica de antígeno. "Tolerancia", como se usa en el presente documento, se usa para hacer referencia a este fenómeno. De hecho, la tolerancia oral ha sido eficaz en el tratamiento de varias enfermedades autoinmunitarias en animales, incluyendo: encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), miastenia grave autoinmunitaria experimental, artritis inducida por colágeno (AIC) y diabetes mellitus insulino dependiente. En estos modelos, la prevención y supresión de la enfermedad autoinmunitaria se asocia con un cambio en las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno de una respuesta Th1 a Th2/Th3.

También se desvela en el presente documento un kit que incluye una o más de las composiciones analizadas previamente. Un "kit", como se usa en el presente documento, normalmente define un paquete o un conjunto que incluye una o más de las composiciones desveladas en el presente documento y/u otras composiciones asociadas con la invención, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Cada una de las composiciones del kit, si está presente, puede proporcionarse en forma líquida (por ejemplo, en solución) o en forma sólida (por ejemplo, un polvo seco). En determinados casos, algunas de las composiciones pueden ser constituyentes o procesables de otra forma (por ejemplo, en una forma activa), por ejemplo, mediante la adición de un disolvente adecuado u otras especies, que pueden proporcionarse o no con el kit. Los ejemplos de otras composiciones que pueden estar asociadas con la invención incluyen, pero sin limitación, disolventes, tensioactivos, diluyentes, sales, tampones, emulsionantes, agentes quelantes, cargas, antioxidantes, agentes aglutinantes, agentes de carga, conservantes, agentes de secado, antimicrobianos, agujas, jeringas, materiales de envasado, tubos, frascos, matraces, vasos de precipitados, placas, fritas, filtros, anillos, abrazaderas, envolturas, parches, recipientes, cintas, adhesivos y similares, por ejemplo, para usar, administrar, modificar, ensamblar, almacenar, envasar, preparar, mezclar, diluir y/o conservar los componentes de las composiciones para un uso particular, por ejemplo, para una muestra y/o un sujeto.

En algunas realizaciones, un kit asociado con la divulgación en el presente documento incluye uno o más núcleos de nanopartículas, tal como un núcleo de nanopartículas que comprende oro. Un kit también puede incluir uno o más agonistas de complejos que interactúan con el ácido nucleico. Un kit también puede incluir uno o más antígenos.

Un kit desvelado en el presente documento puede, en algunos casos, incluir instrucciones en cualquier forma que se proporcionen en relación con las composiciones desveladas en el presente documento de tal manera que un experto habitual en la materia reconocería que las instrucciones deben asociarse con las composiciones desveladas en el presente documento. Por ejemplo, las instrucciones pueden incluir instrucciones para el uso, modificación, mezcla, dilución, conservación, administración, ensamblaje, almacenamiento, envasado y/o preparación de las composiciones y/u otras composiciones asociadas con el kit. En algunos casos, las instrucciones también pueden incluir instrucciones para el uso de las composiciones, por ejemplo, para un uso particular, por ejemplo, para una muestra. Las instrucciones pueden proporcionarse en cualquier forma reconocible por un experto habitual en la materia como un vehículo adecuado para contener dichas instrucciones, por ejemplo, comunicaciones escritas o publicadas, verbales,

audibles (por ejemplo, telefónicas), digitales, ópticas, visuales (por ejemplo, cinta, DVD, etc.) o electrónicas (incluyendo Internet o comunicaciones basadas en la web), proporcionadas de cualquier manera.

5 También se desvelan en el presente documento métodos para promover una o más realizaciones analizadas en el presente documento. Como se usa en el presente documento, "promover" incluye todos los métodos para hacer negocios, incluyendo, pero sin limitación, métodos de comercialización, publicidad, asignación, licencia, contratación, instrucción, educación, investigación, importación, exportación, negociación, financiación, préstamo, comercio, venta, reventa, distribución, reparación, reemplazo, aseguración, demanda, obtención de patentes o similares que están asociados con los sistemas, dispositivos, aparatos, artículos, métodos, composiciones, kits, etc. como se analiza en el presente documento. Los métodos de promoción pueden ser realizados por cualquier parte, incluyendo, pero sin limitación, partes personales, empresas (públicas o privadas), asociaciones, sociedades, fideicomisos, agencias contractuales o subcontractuales, instituciones educativas tales como facultades y universidades, instituciones de investigación, hospitales u otras instituciones clínicas, agencias gubernamentales, etc. Las actividades promocionales pueden incluir comunicaciones de cualquier forma (por ejemplo, comunicaciones escritas, orales y/o electrónicas, tales como, pero sin limitación, por correo electrónico, telefónicas, por Internet, basadas en la web, etc.) que estén claramente asociadas con la divulgación en el presente documento.

20 En un conjunto de ejemplos, el método de promoción puede incluir una o más instrucciones. Como se usa en el presente documento, las "instrucciones" pueden definir un componente de la utilidad instructiva (por ejemplo, directrices, guías, advertencias, etiquetas, notas, preguntas frecuentes, etc.) y normalmente implican instrucciones escritas en o asociadas con la presente divulgación y/o con el envase. Las instrucciones también pueden incluir comunicaciones instructivas en cualquier forma (por ejemplo, oral, electrónica, audible, digital, óptica, visual, etc.), proporcionadas de cualquier manera tal que un usuario reconozca claramente que las instrucciones deben estar asociadas con divulgaciones en el presente documento.

25 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que de ninguna manera deberían interpretarse como limitantes adicionales.

## 30 Ejemplos

### Ejemplo 1:

#### Materiales y métodos

#### 35 *Síntesis de SNA inmunoestimulantes*

Se logra síntesis de SNA inmunoestimulantes (isSNA) como se describe en otra parte<sup>7-12</sup> con las siguientes modificaciones esenciales. En resumen, se mezclan 20 ml de coloide de oro de 13 nm con Tween 20 al 10 % y secuencia agonista de TLR de ácido nucleico modificado con sulfhidrilo (TLR 3, 7/8, 9) a la concentración apropiada, tal como 5  $\mu$ M, y se deja reaccionar durante una noche. Se puede lograr adición de antígeno de manera similar a los métodos descritos en otra parte.<sup>10</sup> Se puede lograr purificación de los SNA mediante ultracentrifugación repetida a 75.000xg durante 30 min.

#### 45 *Líneas celulares*

Se obtuvieron líneas celulares RAW 264.7 de la ATCC. Se obtuvieron macrófagos RAW-Blue de InVivoGen. Se obtuvieron células Ramos-Blue y THP1-XBlue de InVivoGen. Todas se cultivaron según las recomendaciones del distribuidor.

#### 50 Resultados y análisis

Se descubrió que las construcciones a nanoescala de la divulgación mejoran notablemente la potencia en los macrófagos sobre los agonistas no formulados de complejos que interactúan con el ácido nucleico (oligonucleótidos CpG) en solución (Figura 2). Los macrófagos RAW-Blue se sembraron en placas a 65.000 células por pocillo y se permitió que se adhirieran durante una noche. El día de los experimentos, las células se trataron con AST-008-ps o CpG 1826-ps a la concentración indicada de oligo durante 30 min (panel superior), 4 h (panel central) o durante una noche (panel inferior). Para puntos temporales de 30 min y 4 h, se aspiró todo el sobrenadante, las células se lavaron y se administró medio de cultivo completo sin agentes de ensayo. En el punto temporal de una noche, se determinó el estado de activación de las células usando el kit de ensayo QuantiBlue. Los resultados muestran que, particularmente en puntos temporales cortos, AST-008-ps demuestra una CE50 significativamente menor que CpG 1826-ps de 188 nM en comparación con 17800 nM (reducción de 9-1000 veces una desviación típica de la media). A las 4 h, AST-008-ps demuestra una CE50 menor (32 nM frente a 57 nM) y un mayor estado de activación que CpG 1826-ps. Esta diferencia se redujo después de incubación durante una noche, momento en el cual las CE50 no eran estadísticamente diferentes entre sí. Esto sugiere que en condiciones donde el tiempo de residencia del agente con la célula diana es limitado, particularmente a 30 minutos o menos, la formulación AST-008-ps puede dar como resultado una activación inmunitaria más rápida y robusta.

También se demostró que las construcciones a nanoescala de la divulgación mejoraron notablemente la potencia en los macrófagos sobre los agonistas no formulados de complejos que interactúan con el ácido nucleico (oligonucleótidos CpG) en solución después de incubación durante una noche (Figura 3). Los macrófagos RAW-Blue se sembraron en placas a 65.000 células por pocillo y se permitió que se adhirieran durante una noche. El día de los experimentos, AST-007-po, AST-007-ps, AST-008-po, AST-008-ps, CpG 1826-po, CpG 1826-ps se incubaron con las células durante una noche. El grado de activación se determinó después usando el kit de ensayo QuantiBlue. Los resultados muestran que para compuestos que contienen solo enlaces fosfodiéster (-po) (panel superior), AST-007-po y AST-008-po son ~50-150 veces más potentes según lo determinado por sus valores de CE50 que CpG 1826-po (191 nM y 194 nM en comparación con 16032 nM, respectivamente). Con compuestos modificados con fosforotioato (-ps, panel inferior), AST-007-ps y AST-008-ps son aproximadamente equivalentes a CpG 1826-ps, con una CE50 de 29 nM, 27 nM y 20 nM, respectivamente.

Se examinaron los niveles de secreción de citocinas después de la exposición a las construcciones a nanoescala de la divulgación frente a agonistas no formulados de complejos que interactúan con el ácido nucleico (oligonucleótidos CpG) en solución. Se examinó el efecto sobre la inducción de citocinas para ambos oligonucleótidos que tienen enlaces internucleotídicos de fosfodiéster y fosforotioato tanto en la nanopartícula como en los grupos agonistas de TRL (Figura 4). Los macrófagos RAW-Blue se sembraron en placas a 65.000 células por pocillo y se permitió que se adhirieran durante una noche. El día de los experimentos, los compuestos indicados se incubaron con las células durante una noche. El grado de secreción de citocinas se determinó recogiendo el sobrenadante y midiendo la concentración de las citocinas indicadas por ELISA (TNF-alfa-panel superior, IL-12-panel inferior derecho, IL-6-panel inferior izquierdo). Los resultados muestran que es posible una secreción de citocinas significativamente mayor a dosis menores usando AST-008-ps y AST-008-po que CpG 1826-ps, CpG 1826-po y los controles indicados. Por ejemplo, para lograr más de 2000 pg/ml de TNF-alfa, se necesitaba menos de 100 nM de AST-008-ps y se necesitaba menos de 1000 nM de AST-007-po, pero se requería más de 1000 nM de CpG 1826-ps.

A continuación, se examinó la activación de TLR9 en respuesta a estimulación con una nanoescala de la divulgación que tenía un oligonucleótido CpG de fosfodiéster en comparación con oligonucleótidos CpG de fosfodiéster y fosforotioato en solución (Figura 5). Se sembraron y activaron células Ramos-Blue o THP1-XBlue según el protocolo recomendado por el fabricante usando los compuestos y controles indicados. Notablemente, AST-007-po, AST-008-po y AST-009-po demuestran activación comparable a dosis similares que CpG 7909-ps, un agonista de TLR 9 conocido y optimizado. Además, la activación parecía depender de TLR 9, ya que las células THP1-XBlue insensibles al agonista de TLR 9 no demostraron ninguna activación.

Se determinó que una construcción a nanoescala de la divulgación tenía un aumento de potencia múltiple frente a varias secuencias de oligo CpG diferentes (Figura 6). Se sembraron y activaron células Ramos-Blue según el protocolo recomendado por el fabricante usando los compuestos y controles indicados. Se ensayaron Oligo 1826 (panel superior) y 1668 (panel inferior). Notablemente, los compuestos de SNA demuestran valores de CE50 significativamente menores que los oligos libres, independientemente de la química, en comparación con los controles. Esto sugiere que, para estas secuencias, la formulación de SNA de oligos es varias veces más potente.

Se examinaron los efectos de la modulación del tamaño del núcleo de nanopartículas (Figura 7). Se sembraron células Raw Blue en placas y se trataron con los agonistas indicados con diferentes tamaños de núcleos de oro, que varían de 3,5 nm a 13 nm usando los oligos indicados. Los resultados muestran que los tamaños de núcleo de oro más pequeños parecen demostrar el potencial para mejorar la actividad agonista *in vitro*.

Se observó que las construcciones a nanoescala de la divulgación tienen una activación más rápida y sostenida que el oligo CpG (Figura 8). Las células se sembraron en placas como se describe y la activación se midió usando QuantiBlue. Los resultados muestran que a 6 nM de oligo, los PS SNA demuestran significativamente más activación que los oligos 1668 PS libres.

Se examinó la capacidad de las modificaciones de fosforotioato para modular la actividad agonista de una manera dependiente de secuencia (Figura 9). Se sembraron células Raw Blue en placas y se trataron con los agonistas indicados. Se ensayaron Oligo 1826 (panel superior) y 1668 (panel inferior). Los resultados muestran que las modificaciones internas de fosforotioato (C\*G) y dos enlaces de fosforotioato 5' (5'PS2) tienen un efecto sobre la actividad de SNA inmunoestimulantes que parece ser dependiente de secuencia.

Se evaluó la capacidad de la densidad de carga de oligonucleótidos para afectar a la actividad agonista (Figura 10). V2 indica que la construcción estaba completamente recubierta de oro antes de la adición de oligo al núcleo de oro. Se ensayaron oligonucleótidos de fosfodiéster (panel superior) y oligonucleótidos de fosforotioato (panel inferior). Los datos muestran que la densidad del oligonucleótido en la superficie del oro modulará la actividad de la construcción inmunoestimulante.

Se estudió un ciclo temporal de activación de construcciones a nanoescala de CpG PO/PO (Figura 11). Las construcciones ensayadas no se activan hasta >4 h de incubación. Se sembraron células Raw Blue en placas y se trataron con los agonistas indicados. Los resultados muestran que los PO y PO SNA no activan de manera robusta

las células RAW Blue adherentes hasta más de 4 horas de incubación.

Las construcciones a nanoescala de 5'Chol CpG PO mostraron activación en un intervalo bajo de nM, mientras que 5'C18 anuló la actividad (Figura 12). Una modificación de colesterol 5' (5'Chol) puede aumentar la potencia del agonista, particularmente a bajas concentraciones de una manera independiente de la dosis de oligo. La modificación del extremo 5' con una molécula C18 (5'C18) parece eliminar la actividad por completo.

Los macrófagos previamente sembrados en placas están más sensibilizados para activación posterior (Figura 13). Los macrófagos RAW Blue que se sembraron en placas durante una noche antes de la adición de los compuestos agonistas (parte superior) demuestran en general mayor activación que cuando las células se siembran en placas al mismo tiempo que se añade el compuesto agonista (parte inferior).

Se demostraron bajos niveles de secreción de IFN-gamma por macrófagos (Figura 14). Los macrófagos RAW-Blue se sembraron en placas a 65.000 células por pocillo y se permitió que se adhirieran durante una noche. El día de los experimentos, los compuestos indicados se incubaron con las células durante una noche. El grado de secreción de citocinas (ya sea 24 horas-panel izquierdo o 48 horas-panel derecho después del tratamiento) se determinó recogiendo el sobrenadante y midiendo la concentración de las citocinas indicadas por ELISA. Los resultados muestran que los macrófagos RAW Blue estimulados con estos compuestos no producen IFN-gamma en una cantidad apreciable.

## **Ejemplo 2 Inmuno-oncología e inmunoterapias**

Los SNA inmunoterapéuticos (es decir, AST-008) proporcionan una plataforma tecnológica novedosa y versátil. Su administración de inmunomodulador multivalente optimiza las respuestas, mientras que se ha observado una reducción profunda del tumor en un modelo de linfoma. Adicionalmente, desencadenan una respuesta de linfocitos T potente y equilibrada *in vivo* mayor que la del oligonucleótido libre o alumbre. Los SNA pueden presentar conjuntamente antígeno de vacuna terapéutico y adyuvante en una sola nanopartícula y tienen actividad mejorada y cinética más rápida que los oligodesoxinucleótidos CpG inmunoestimulantes libres. Asimismo, los SNA tienen el potencial de dirigirse simultáneamente a múltiples receptores inmunoestimulantes (por ejemplo, TLR 3, 4, 7/8, 9). Pueden usarse, por ejemplo, en inmunoterapia y vacunas (profilácticas o terapéuticas) contra el cáncer.

En la Figura 15 se muestra un esquema de un SNA inmunoterapéutico (AST-008). Los SNA pueden presentar conjuntamente un antígeno de vacuna terapéutico y adyuvante en una sola nanopartícula y pueden dirigirse simultáneamente a múltiples receptores inmunoestimulantes (por ejemplo, TLR 3, 4, 7/8, 9).

En la Figura 16 se muestra un esquema que demuestra cómo AST-008 puede entrar en endosomas a través de endocitosis desencadenada. Una vez que AST-008 está en los endosomas, se puede usar para estimulación versátil del sistema inmunitario. Dentro del endosoma, AST-008 estimula la señalización del sistema inmunitario a través del receptor TLR 9, una diana molecular para terapia de SNA, que conduce a respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. AST-008 también puede dirigirse a TLR 3, 4, 7/8, lo que da como resultado respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.

AST-008 induce respuestas proinflamatorias mayores que los oligodesoxinucleótidos (oligo) CpG correspondientes *in vitro*. Se realizó un ensayo que demuestra este hallazgo. Los datos se muestran como un conjunto de gráficos en las Figuras 17A y 17B. La Figura 17A muestra los niveles de expresión de TNF, IL-12 e IL-6 inducidos por oligo CTL, SNA CTL, CpG 1826 y AST-008. La Figura 17B presenta la activación de NF-κB derivada de los agentes indicados.

AST-008 también se dirige a ganglios linfáticos de drenaje después de la administración de una sola dosis subcutánea. AST-008 se tiñó de plata para mejorar la dispersión de la luz del núcleo de oro y después se contratiñó con eosina. Se utilizó un aumento de campo brillante 4X. Los datos se muestran en la Figura 18.

Las estructuras de la divulgación son útiles para estimular una respuesta inmunitaria robusta *in vivo*. Por ejemplo, la Figura 19 es un gráfico que ilustra la actividad *in vivo* de AST-008. A los ratones se les administró una inyección en embolada en la vena de la cola (intravenosa) de 50 µl de solución de 5,1 nmol (AST-008-po, AST-008-ps, CpG 1826-po, CpG 1826-ps, GpC-po SNA, GpC-ps SNA, GpC-po o GpC-ps) y después se analizaron para determinar la expresión de IL-12 1, 3 y 6 horas después de la inyección (24 ratones por grupo, 3 por cada punto temporal). Los niveles de IL-12 se expresan como el factor sobre PBS. La arquitectura AST-008 mejora la inducción de IL-12 en aproximadamente 20 veces con respecto a oligodesoxinucleótidos libres y el efecto se mantuvo durante más de seis horas después de la administración inicial. Las Figuras 20A-20C consisten en un par de gráficos y un diagrama que demuestran que AST-008 induce una respuesta equilibrada de Th1/Th2 (Figura 20A) y una mayor respuesta de anticuerpos IgG2a (Figura 20B) que el alumbre o los oligonucleótidos CpG. Los resultados se tabulan en la Figura 20C. \*\* p<0,01. Las Figuras 21A-21B muestran que AST-008 induce respuestas celulares más eficazmente que el alumbre o los oligonucleótidos CpG. La Figura 21A representa esquemáticamente el protocolo: los esplenocitos se cultivaron durante 28 días, se expusieron el día 0 y el día 21 y después se volvieron a estimular con SIINFEKL y se exploraron para INF-γ con ELISPOT el día 28. La Figura 21B es un gráfico que representa los resultados. \*\*\*\*p <0,0001.

Se ha mostrado que las estructuras también producen una respuesta antitumoral drástica *in vivo*. Las Figuras 22A-22B demuestran que AST-008 induce una respuesta inmunitaria de eliminación tumoral profunda en un modelo de linfoma *in vivo*. La figura 22A ilustra el protocolo: se inyectó en los flancos derechos de ratones C57BL/6  $1 \times 10^6$  E.G7-OVA linfoma (11 por grupo). Los ratones se expusieron después tres veces con 100  $\mu$ g de OVA s.c., 1,8  $\mu$ g de OVA257-264 s.c. y 0,92 nmol de oligo en AST-008 y se sacrificaron a 2000 mm<sup>3</sup>. La Figura 13B es un gráfico de los resultados. \* p <0,05 usando ANOVA de dos vías. Las Figuras 23A-23B muestran que AST-008 presenta actividad antitumoral superior y supervivencia más larga que los oligodesoxinucleótidos CpG. Los gráficos muestran el volumen tumoral (Figura 23A) y el porcentaje de supervivencia (Figura 23B) después de inyectarse a los ratones C57BL/6  $1 \times 10^6$  E.G7-OVA linfoma en sus flancos derechos (11 por grupo) y después se expusieron tres veces con PBS, PBS y OVA, CpG 1826 y OVA o AST-008 y OVA. \*p <0,05.

Tabla 1: Clave de símbolos

Nombre	Secuencia Oligo (5'-3')	Formulación	SEQ ID NO:
AST-007-po, CpG 1668 PO SNA	TCCATGACGTTCCCTGATGCT/iSp18//iSp18//iSp18//3 TioMC3-D/	Conjugado con núcleo de oro de 13 nm a través de enlace tio-oro	36
AST-008-po, CpG 1826 PO SNA	TCCATGACGTTCCCTGACGTT/iSp18//iSp18//3TioM C3-D/	Conjugado con núcleo de oro de 13 nm a través de enlace tio-oro	37
AST-009-po, CpG 7909 PO SNA	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT/iSp18//iSp18//3TioMC3-D/	Conjugado con núcleo de oro de 13 nm a través de enlace tio-oro	38
AST-007-ps, CpG 1668 PS SNA	tccatgacgttcctgatgct/iSp18//iSp18//iSp18//3tioMC3-D/	Conjugado con núcleo de oro de 13 nm a través de enlace tio-oro, relleno con tetraetilenglicol	39
AST-008-ps, CpG 1826 PS SNA	tccatgacgttcctgacgtt/iSp18//iSp18//iSp18//3TioMC3-D/	Conjugado con núcleo de oro de 13 nm a través de enlace tio-oro, relleno con tetraetilenglicol	40
AST-009-ps, CpG 7909 PS SNA	tcgctgcttttgcgcttttgcgctt/iSp18//iSp18//3TioMC3-D/	Conjugado con núcleo de oro de 13 nm a través de enlace tio-oro, relleno con tetraetilenglicol	41
CpG 1826-po	TCCATGACGTTCCCTGACGTT	Libre	42
CpG 1826-ps	Tccatgacgttcctgacgtt	Libre	43
CpG 1668-po	TCCATGACGTTCCCTGATGCT	Libre	44
CpG 1668-ps	Tccatgacgttcctgatgct	Libre	45
CpG 7909-po	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	Libre	46
CpG 7909-ps	Tcgctgcttttgcgcttttgcgctt	Libre	47
rpIV-po	GCTTTCTTGTTGGTGTAGGTC	Libre	48
rpIV-ps	Gctttcttggtgtaggct	Libre	49
Ctrl-SNA-po, rpIV SNA PO	Secuencia que no contiene motivos CpG, todos los enlaces de fosfodiéster	Conjugado con núcleo de oro de 13 nm a través de enlace tio-oro	

(continuación)

Nombre	Secuencia Oligo (5'-3')	Formulación	SEQ ID NO:
Ctrl-SNA-ps, rplV SNA PS	Secuencia que no contiene motivos CpG, todos los enlaces de fosforotioato	Conjugado con núcleo de oro de 13 nm a través de enlace tio-oro	
La minúscula indica enlaces de fosforotioato La mayúscula indica enlaces de fosfodiéster El prefijo "Ctrl" indica oligo usado sin motivos CpG presentes /iSp18/espaciador interno-18 /3TioMC3-D/grupo sulfhidrilo terminal			

Referencias

- 5 1. Koff WC *et al.* Science 340:1232910-1 (2013)
2. Cluff CW. Monophosphoryl Lipid A (MPL) as an Adjuvant for Anti-Cancer Vaccines: Clinical Results. Lipid A in Cancer Therapy, Jeannin J Ed. Landes Bioscience (2000)
- 10 3. Krieg AM. Proc Am Thorac Soc 4:289 (2007)
4. Schmidt C. Nat Biotechnol 25:825 (2007)
5. Ellis RD *et al.* PLOS One 10:e46094 (2012)
- 15 6. Garçon N *et al.* Expert Rev. Vaccines 6:723 (2007)
7. Rosi NL *et al.* Science 312:1027 (2006)
- 20 8. Lytton-Jean AK *et al.* JACS 127:12754 (2005)
9. Hurst SJ *et al.* Anal. Chem. 78:8313 (2006)
- 25 10. Patel PC *et al.* PNAS 105:17222 (2008)
11. Seferos DS *et al.* Nano Lett 9:308 (2009)
12. Giljohann *et al.* Angew. Chem. Int. Ed. 49:3280 (2010)

30 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> AuraSense, LLC
- 35 <120> CONSTRUCCIONES ESFÉRICAS A BASE DE ÁCIDO NUCLEICO COMO AGENTES INMUNOESTIMULANTES PARA USO PROFILÁCTICO Y TERAPÉUTICO
- <130> A1005.70002WO00
- <140> Todavía sin asignar
- 40 <141> 25-07-2014
- <150> US 61/858.558
- <151> 25-07-2013
- 45 <160> 49
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 50 <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 55 <223> Polinucleótido sintético

## ES 2 750 608 T3

	<400> 1 tccatgacgt tcctgacgtt	20
5	<210> 2 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 2 gctttcttgt tggtaggt c	21
15	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 3 tccatgacgt tcctgatgct	20
25	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 4 gctttcttgt tggtaggt c	21
40	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 5 tccatgacgt tcctgatgct	20
50	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
55	<400> 6 tccatgacgt tcctgatgct	20
60	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	

## ES 2 750 608 T3

	<400> 7 tccatgacgt tcctgatgct	20
5	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 8 tccatgacgt tcctgatgct	20
15	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 9 tccatgacgt tcctgacggt	20
25	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 10 tccatgacgt tcctgacggt	20
40	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 11 tccatgacgt tcctgacggt	20
	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 12 tccatgacgt tcctgacggt	20
60	<210> 13 <211> 18 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	



# ES 2 750 608 T3

	<400> 13 ccgucuguug ugugacuc	18
5	<210> 14 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 14 gccaccgagc cgaaggcacc	20
15	<210> 15 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
25	<400> 15 uauauauaua uauauauaua	20
30	<210> 16 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
35	<400> 16 uuuuuuuuu uuuuuuuuu	20
40	<210> 17 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 17 uuuuuuuuu uuuuuuuuu	20
50	<210> 18 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
55	<400> 18 ugugugugug ugugugugug	20
60	<210> 19 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	

# ES 2 750 608 T3

	<400> 19 uuguuguugu uguuguugu	20
5	<210> 20 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 20 uuuguuuugu uguuuuuug	20
15	<210> 21 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
25	<400> 21 uuuuuuuuuu auuuuuuuau uuau	24
30	<210> 22 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
35	<400> 22 uuguuuuuuu guuuuuugu uugu	24
40	<210> 23 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 23 gcccgucugu ugugugacuc	20
50	<210> 24 <211> 18 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
55	<400> 24 guccuugaag uccuuga	18
60	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	

ES 2 750 608 T3

	<400> 25 ggtgcatcga tgcagggggg	20
5	<210> 26 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 26 tccatggacg ttcctgagcg tt	22
15	<210> 27 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
25	<400> 27 tcgtcgttcg aacgacgttg at	22
30	<210> 28 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
35	<400> 28 tcgtcgacga tccgcgcgcg cg	22
40	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 29 ggggcaacg ttgagggggg	20
50	<210> 30 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
55	<400> 30 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt	24
60	<210> 31 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	

# ES 2 750 608 T3

	<400> 31 tcgtcgtgt cgtttgcg tt	22
5	<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 32 gggggacgat cgtcggggg	20
15	<210> 33 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
25	<400> 33 ggggacgacg tcgtggggg g	21
30	<210> 34 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
35	<400> 34 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg	22
40	<210> 35 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 35 tcgtcgtcgt tcgaacgacg ttgat	25
50	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
55	<400> 36 tccatgacgt tcctgatgct	20
60	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	

# ES 2 750 608 T3

	<400> 37 tccatgacgt tcctgacggt	20
5	<210> 38 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 38 tcgctggttt gtcgtttgt cggt	24
15	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
25	<400> 39 tccatgacgt tcctgatgct	20
30	<210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
35	<400> 40 tccatgacgt tcctgacggt	20
40	<210> 41 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 41 tcgctggttt gtcgtttgt cggt	24
50	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
55	<400> 42 tccatgacgt tcctgacggt	20
60	<210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	

ES 2 750 608 T3

	<400> 43 tccatgacgt tcctgacgt	20
5	<210> 44 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 44 tccatgacgt tcctgatgct	20
15	<210> 45 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 45 tccatgacgt tcctgatgct	20
25	<210> 46 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 46 tcgctgtttt gtcgtttgt cggt	24
40	<210> 47 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 47 tcgctgtttt gtcgtttgt cggt	24
50	<210> 48 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
55	<400> 48 gctttcttgt tggtaggt c	21
60	<210> 49 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	

<400> 49  
gctttcttgt tggtaggt c

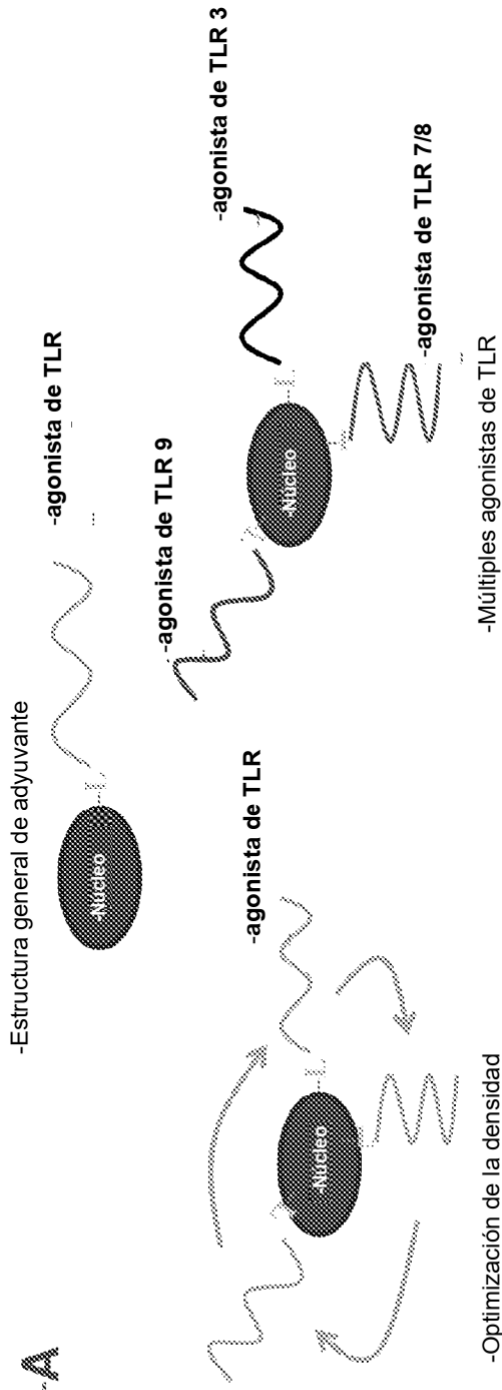
21

## REIVINDICACIONES

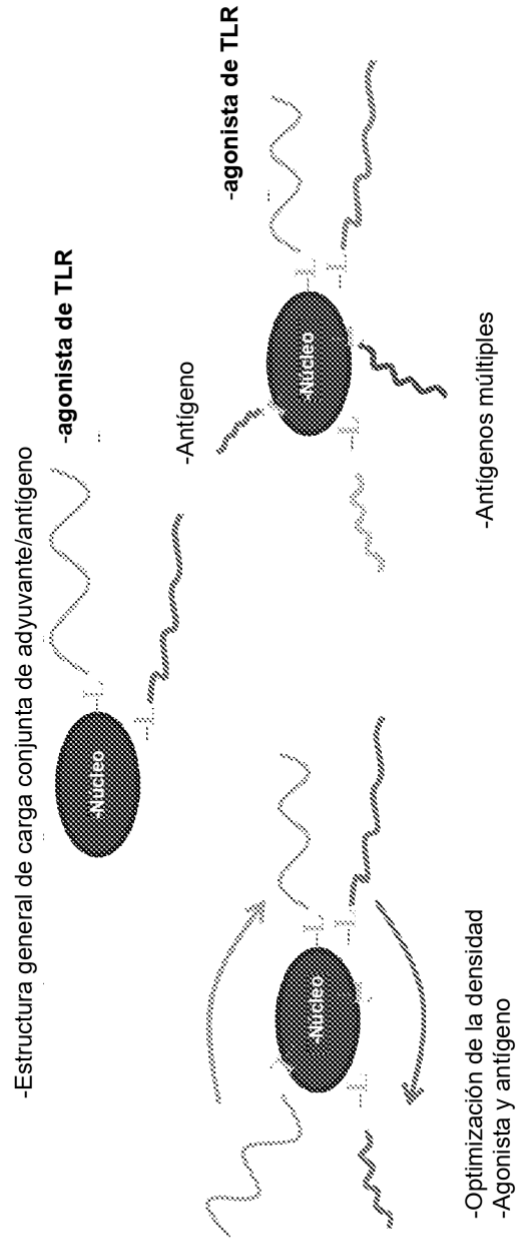
1. Una construcción a nanoescala que comprende:  
 una corona de un agonista de complejos que interactúan con el ácido nucleico, en donde el agonista de los complejos  
 5 que interactúan con el ácido nucleico es un oligonucleótido inmunoestimulante, en donde la densidad de superficie del  
 agonista de los complejos que interactúan con el ácido nucleico es de al menos 0,3 pmol/cm<sup>2</sup>, en donde el agonista  
 es la SEQ ID NO: 30, en donde el diámetro de la construcción a nanoescala es de 1 nm a 90 nm en diámetro medio,  
 en donde el agonista contiene un espaciador que consiste en oligoetileno y en donde la construcción a nanoescala  
 10 contiene un núcleo de nanopartículas en el centro de la corona.
2. La construcción a nanoescala de la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido inmunoestimulante se conjuga con  
 un conector en el extremo 3'.
3. La construcción a nanoescala de la reivindicación 1 que comprende un antígeno incorporado en la corona, en donde  
 15 la densidad de superficie del antígeno es de al menos 0,3 pmol/cm<sup>2</sup>.
4. La construcción a nanoescala de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el núcleo de nanopartículas  
 en el centro de la corona es metálico y en donde el núcleo metálico se selecciona opcionalmente de la lista que  
 20 consiste en oro, plata, platino, aluminio, paladio, cobre, cobalto, indio, níquel y mezclas de los mismos.
5. La construcción a nanoescala de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el núcleo de nanopartículas  
 en el centro de la corona no es metálico.
6. La construcción a nanoescala de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la construcción a nanoescala  
 25 es degradable.
7. La construcción a nanoescala de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el diámetro de la construcción  
 a nanoescala es de 1 nm a 40 nm de diámetro medio.
8. La construcción a nanoescala de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la corona es una corona  
 30 esférica.
9. La construcción de nanoescala según cualquier reivindicación anterior en donde la densidad de superficie del  
 agonista de complejos que interactúan con el ácido nucleico no es mayor de 35-40 pmol/cm<sup>2</sup>.
- 35 10. La construcción a nanoescala según cualquier reivindicación anterior en donde la corona es una cubierta exterior  
 compuesta de moléculas de ácido nucleico dispuestas en una posición geométrica y que constituyen una forma  
 esférica alrededor del núcleo de nanopartículas.
- 40 11. Una vacuna que comprende una construcción a nanoescala de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un  
 vehículo.
12. Una construcción a nanoescala según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en la administración  
 45 de un agente terapéutico a una célula.
13. Una composición que comprende la construcción a nanoescala de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10  
 para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa, cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una alergia o  
 una enfermedad alérgica, en donde la composición se administra a un sujeto en una cantidad efectiva para estimular  
 50 una respuesta inmunitaria.
14. Una composición que comprende la construcción a nanoescala de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o  
 la vacuna de la reivindicación 11 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, en donde la  
 composición o la vacuna se administran al sujeto en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria.
- 55 15. La composición para su uso de la reivindicación 13 en donde el cáncer se selecciona de: cáncer de las vías biliares;  
 cáncer de cerebro; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial;  
 cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias intraepiteliales; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por  
 ejemplo, microcítico y no microcítico); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovario; cáncer de páncreas;  
 60 cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; cáncer renal; otros  
 carcinomas y sarcomas; leucemia de células pilosas; leucemia mielógena crónica; leucemia cutánea de linfocitos T;  
 mieloma múltiple; linfoma folicular; melanoma maligno; carcinoma de células escamosas; carcinoma de células  
 renales; carcinoma de próstata; carcinoma de células de la vejiga; o carcinoma de colon.
- 65 16. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 12-15 en donde la construcción a nanoescala se  
 administra al sujeto por una vía seleccionada de: oral, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, mucosa,  
 intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación, ocular, vaginal, dérmica, rectal y por inyección directa.



**Figura 1 A**



**Figura 1 B**



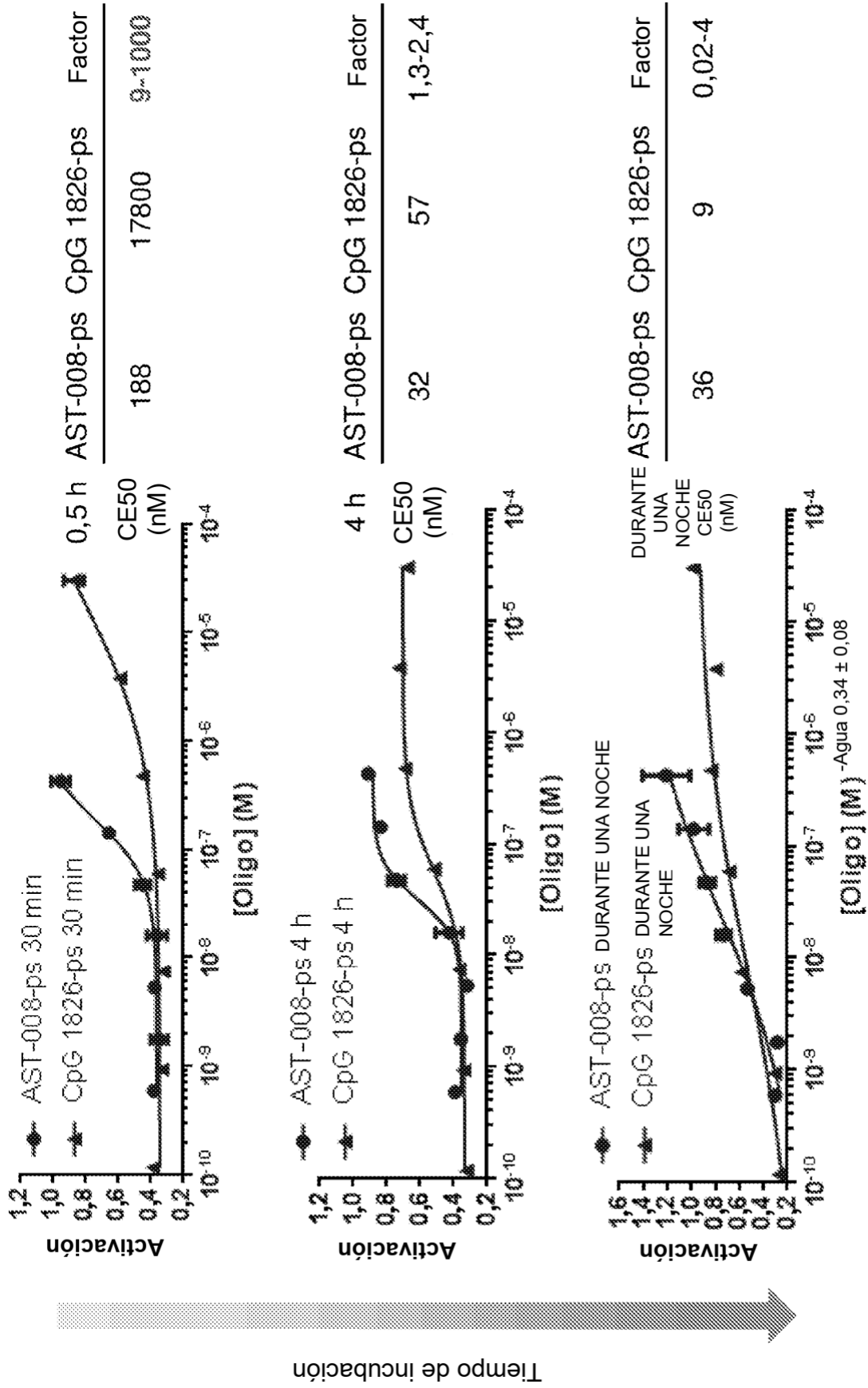


Figura 2

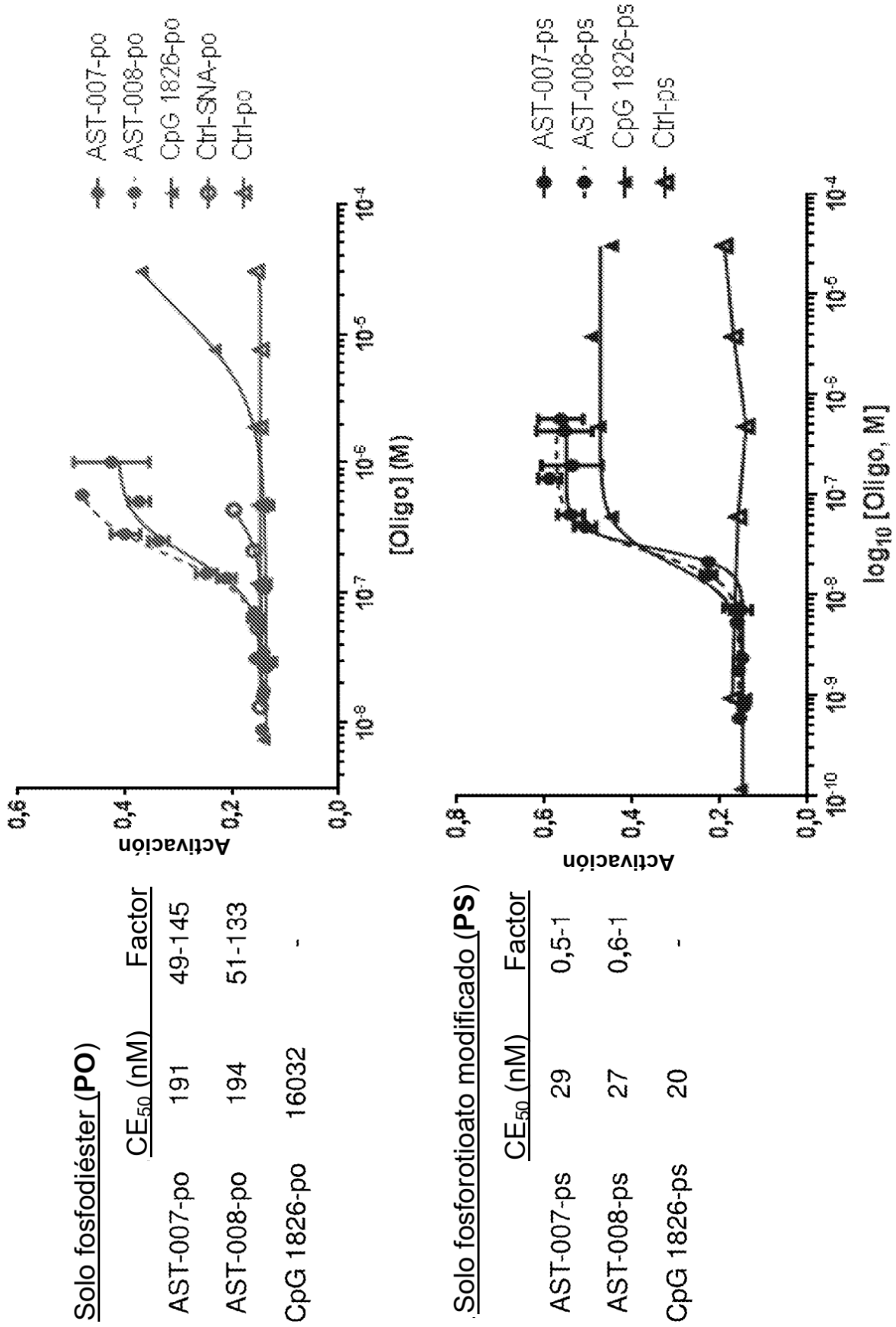


Figura 3

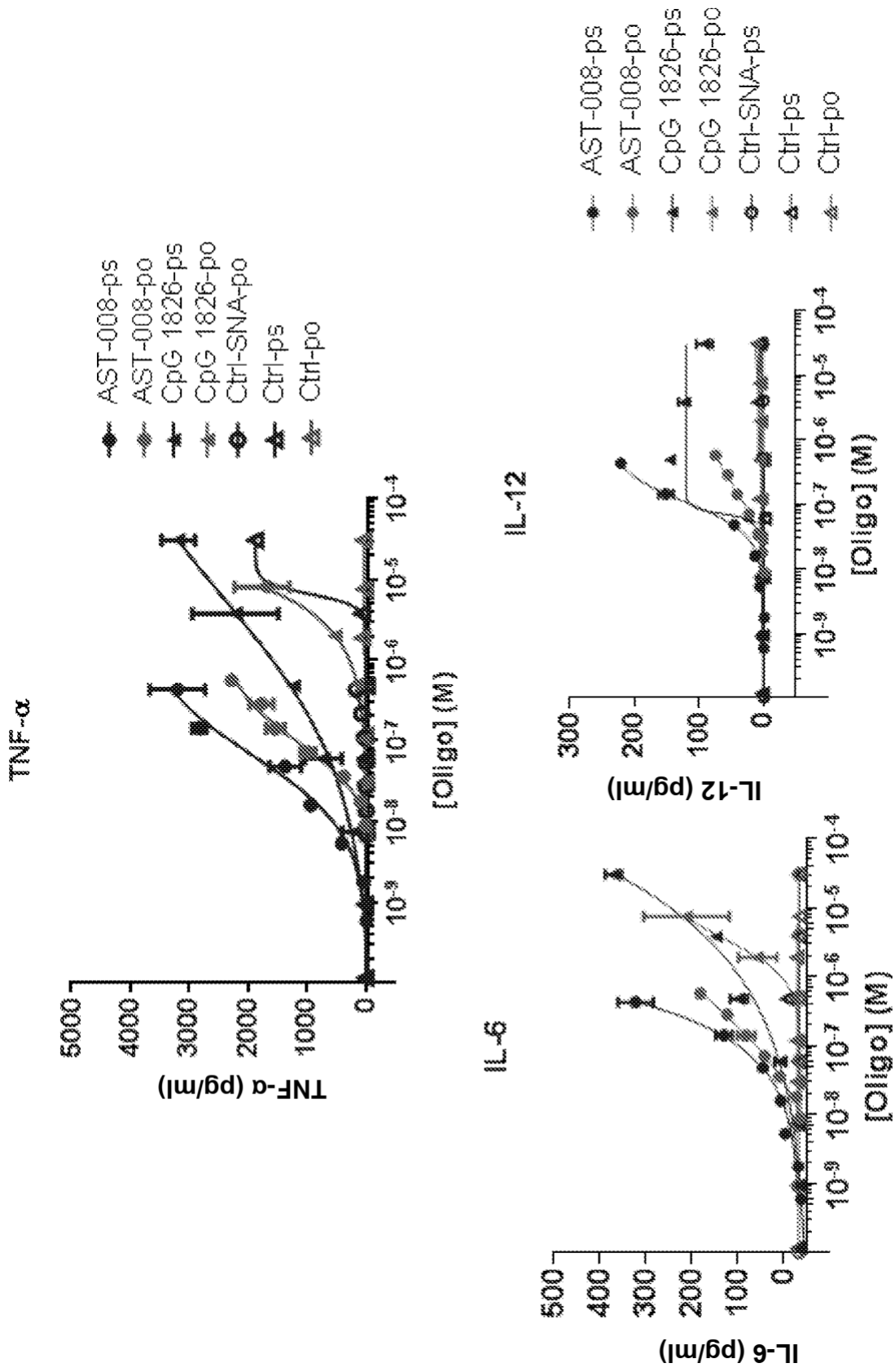


Figura 4

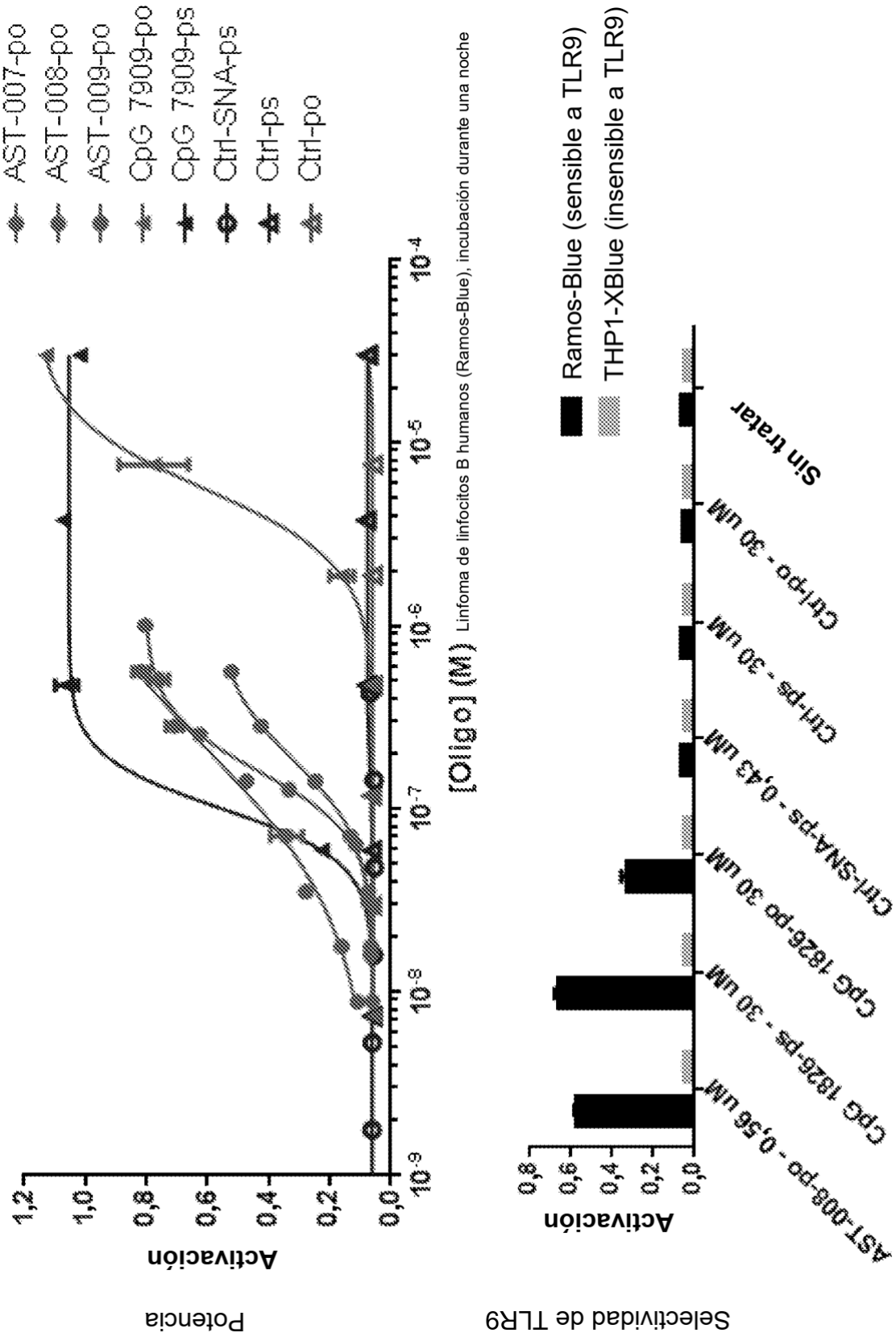


Figura 5

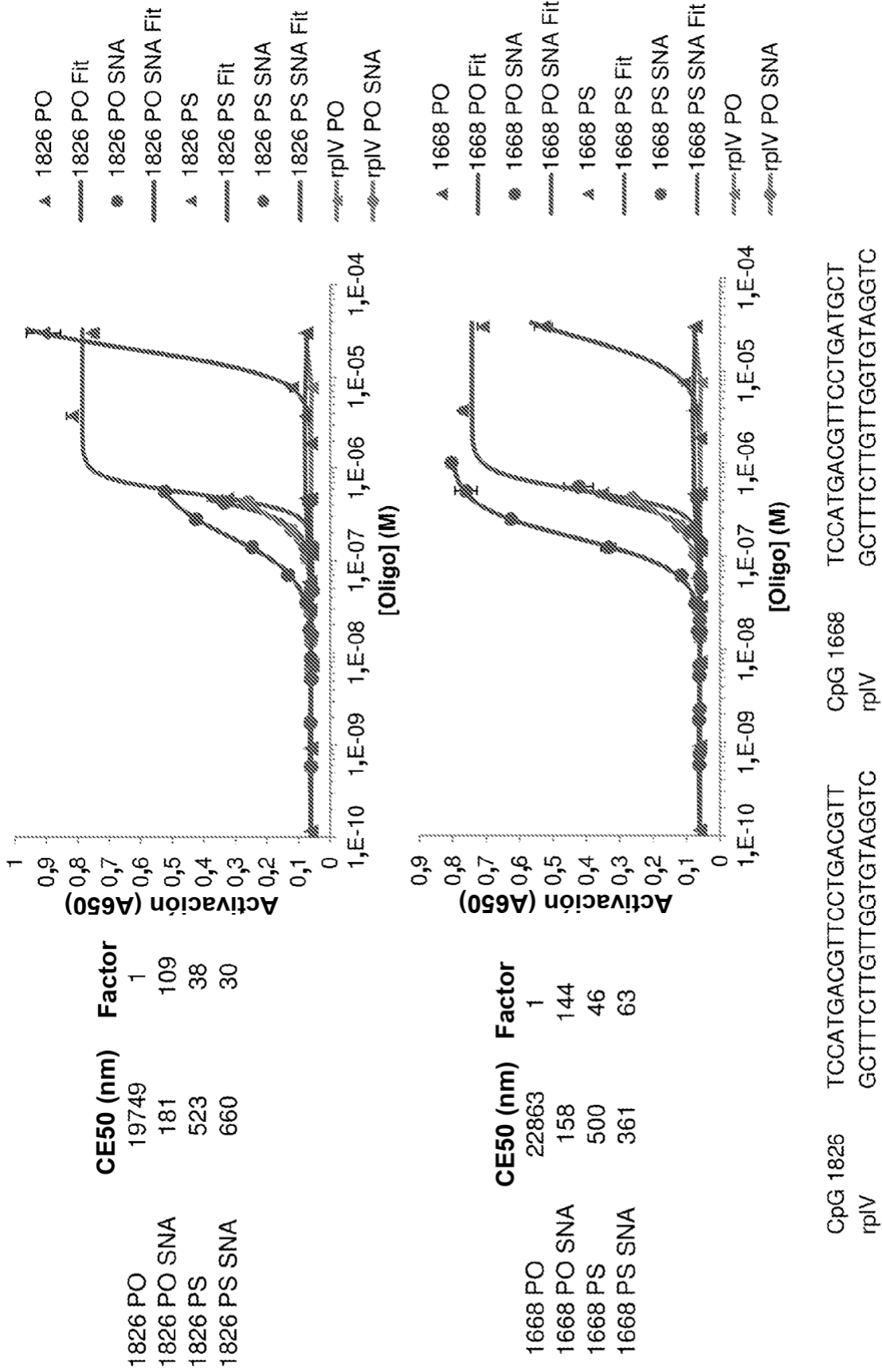


Figura 6

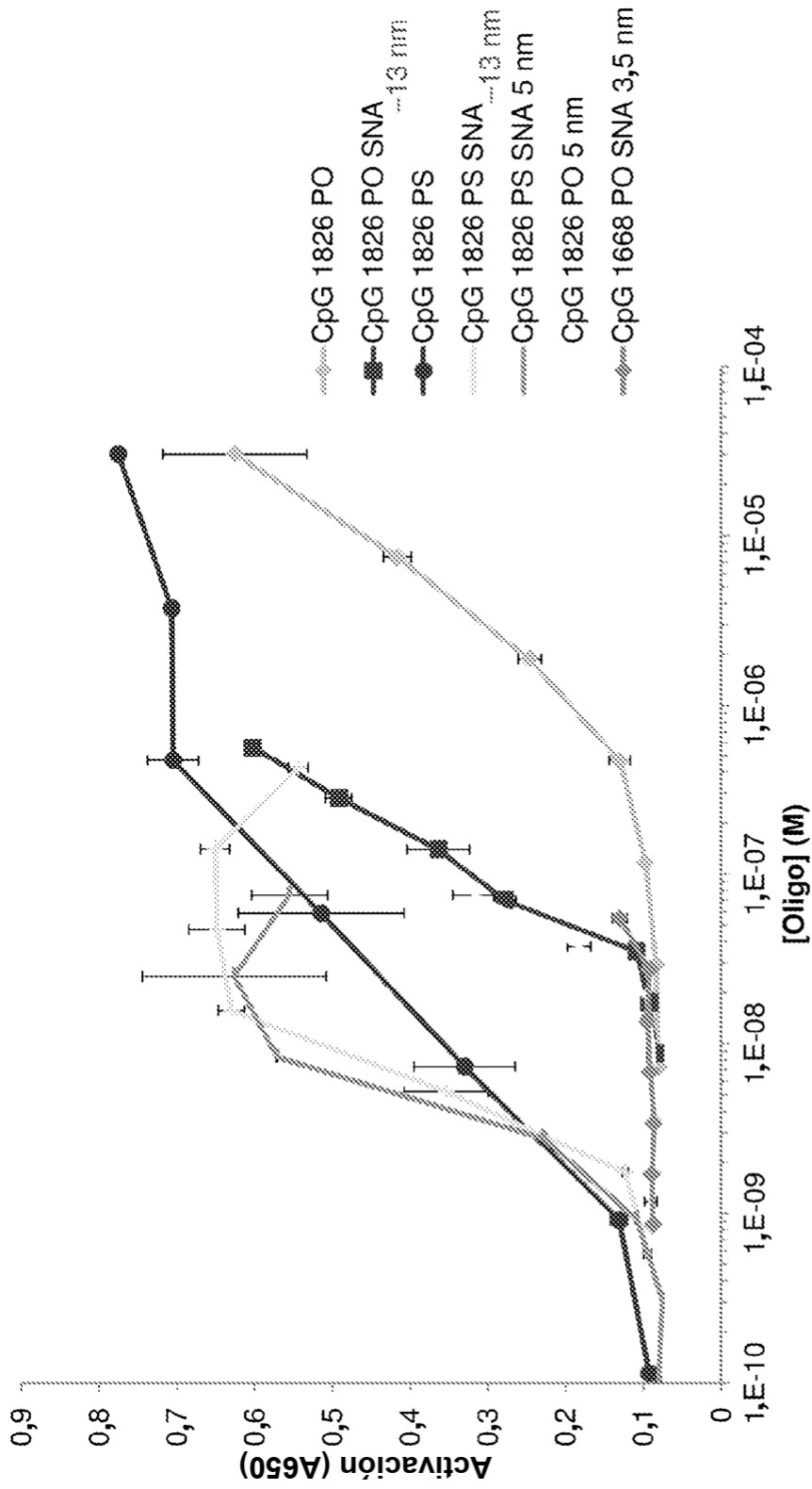
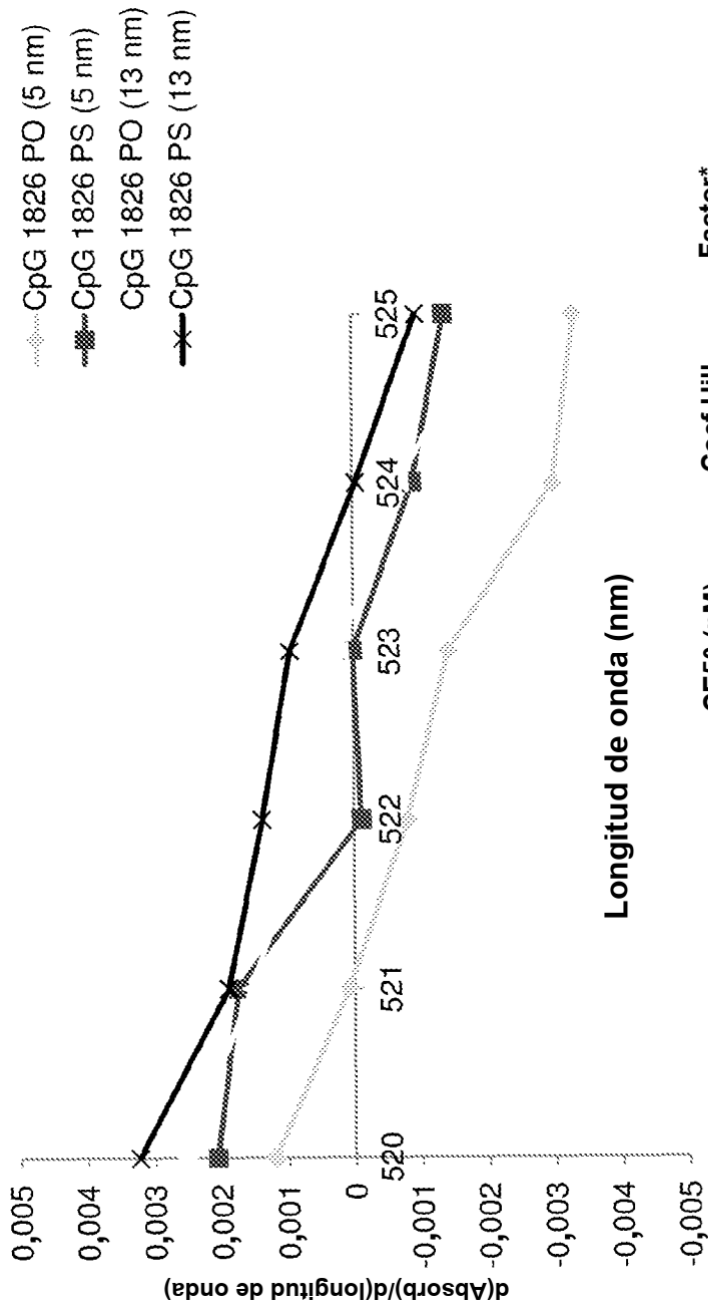


Figura 7



	<u>CE50 (nm)</u>	<u>Coef Hill</u>	<u>Factor*</u>
CpG 1826 PO	10370	0,8	-
CpG 1826 PO SNA 5 nm	44	3,6	234
CpG 1826 PO SNA 13 nm	141	1,3	74
CpG 1826 PS	18	0,6	-
CpG 1826 PS SNA 5 nm	3	4,9	5,5
CpG 1826 PS SNA 13 nm	5	6,0	3,4

\*en relación con oligo libre con química coincidente

**Figura 7 continuación**



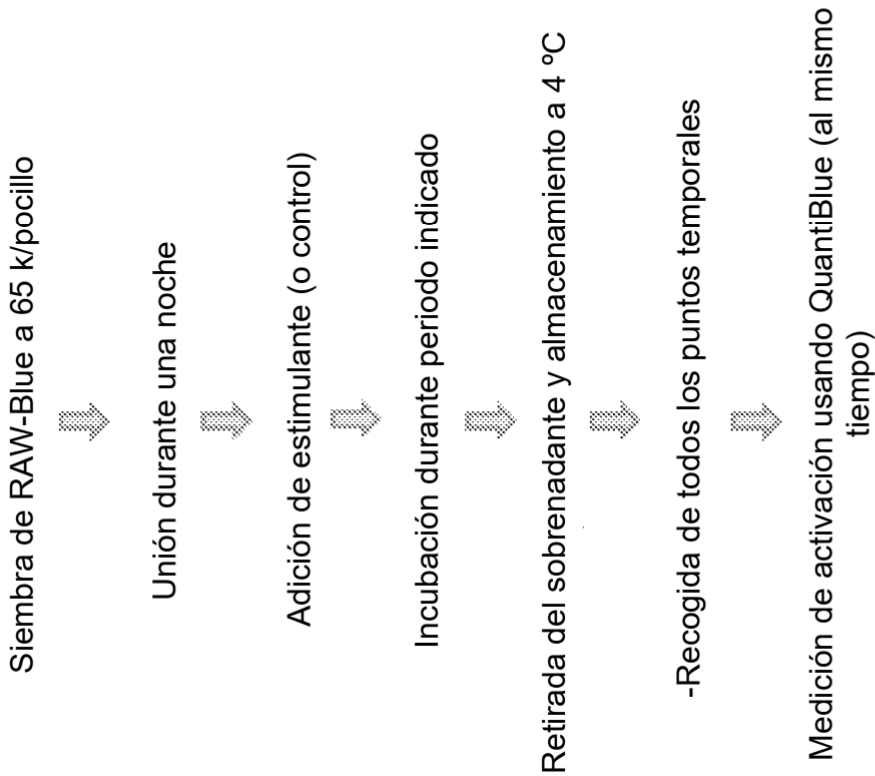
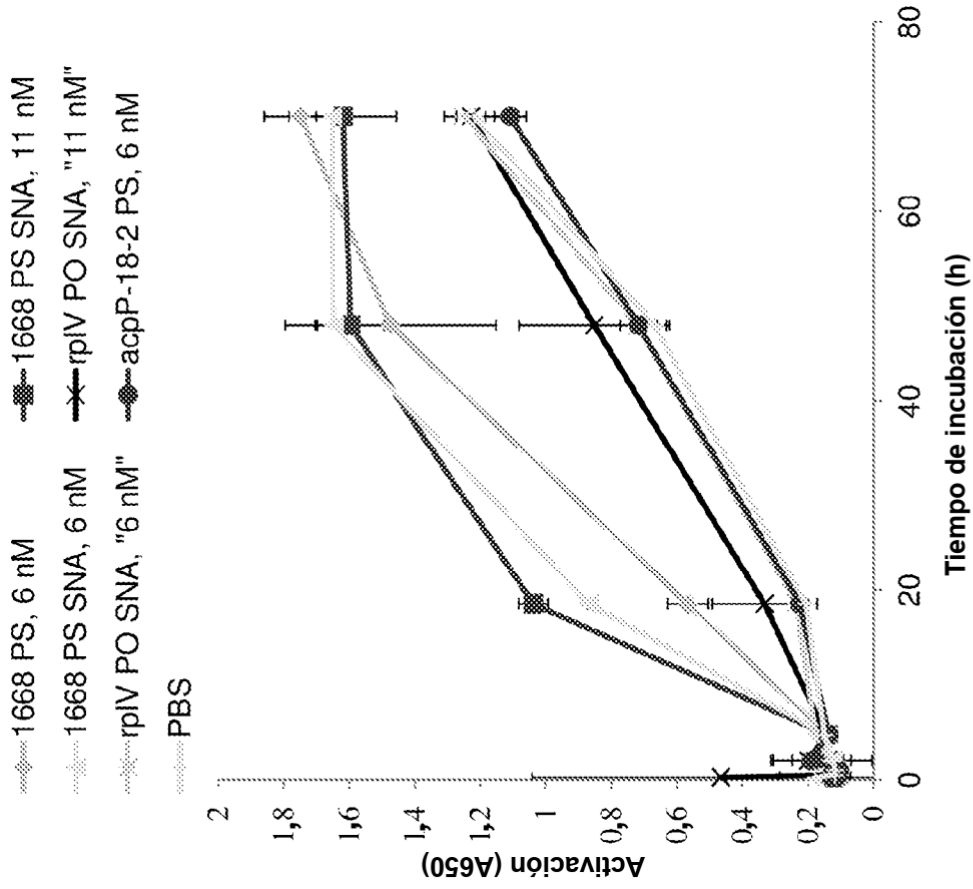


Figura 8

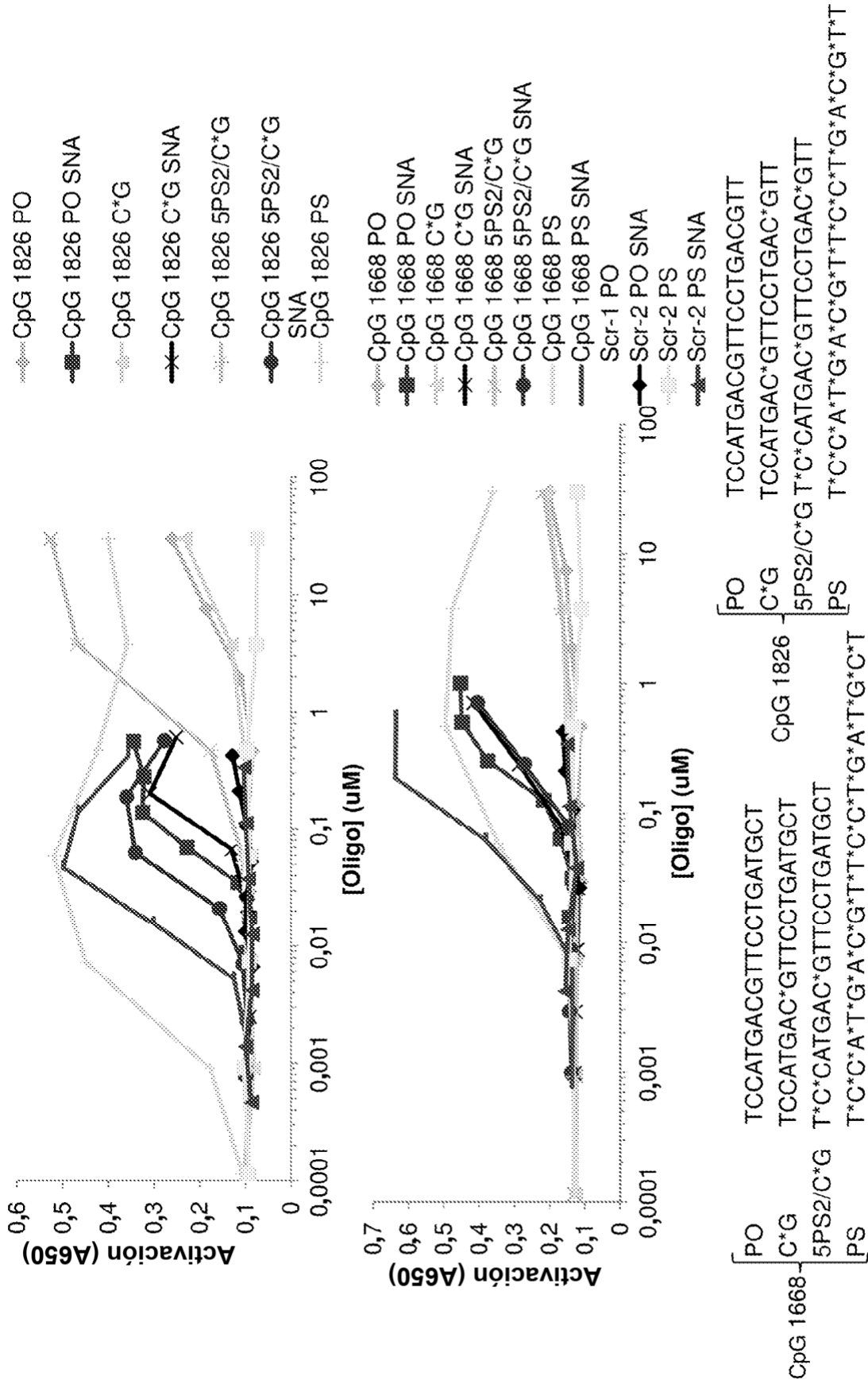


Figura 9

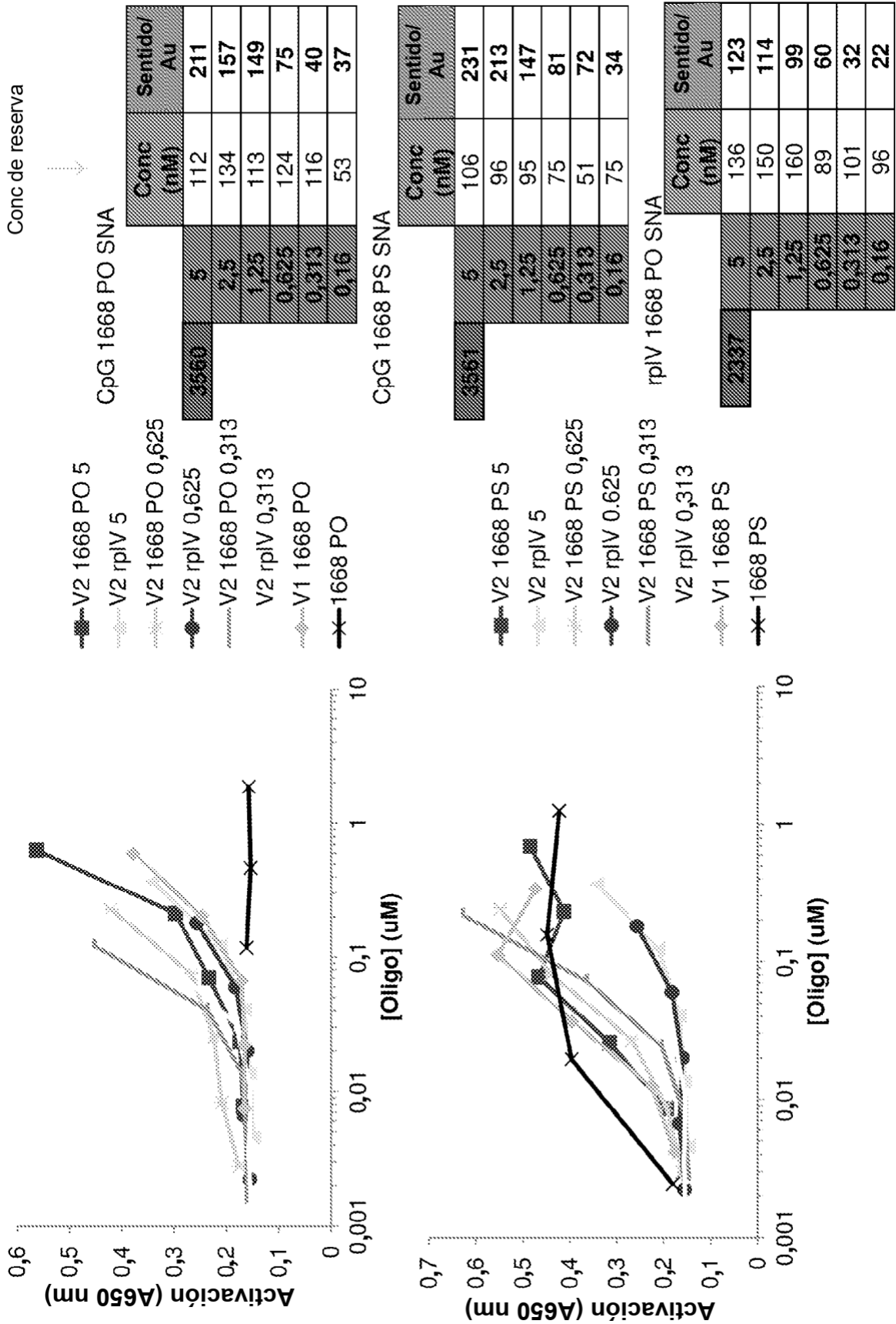


Figura 10

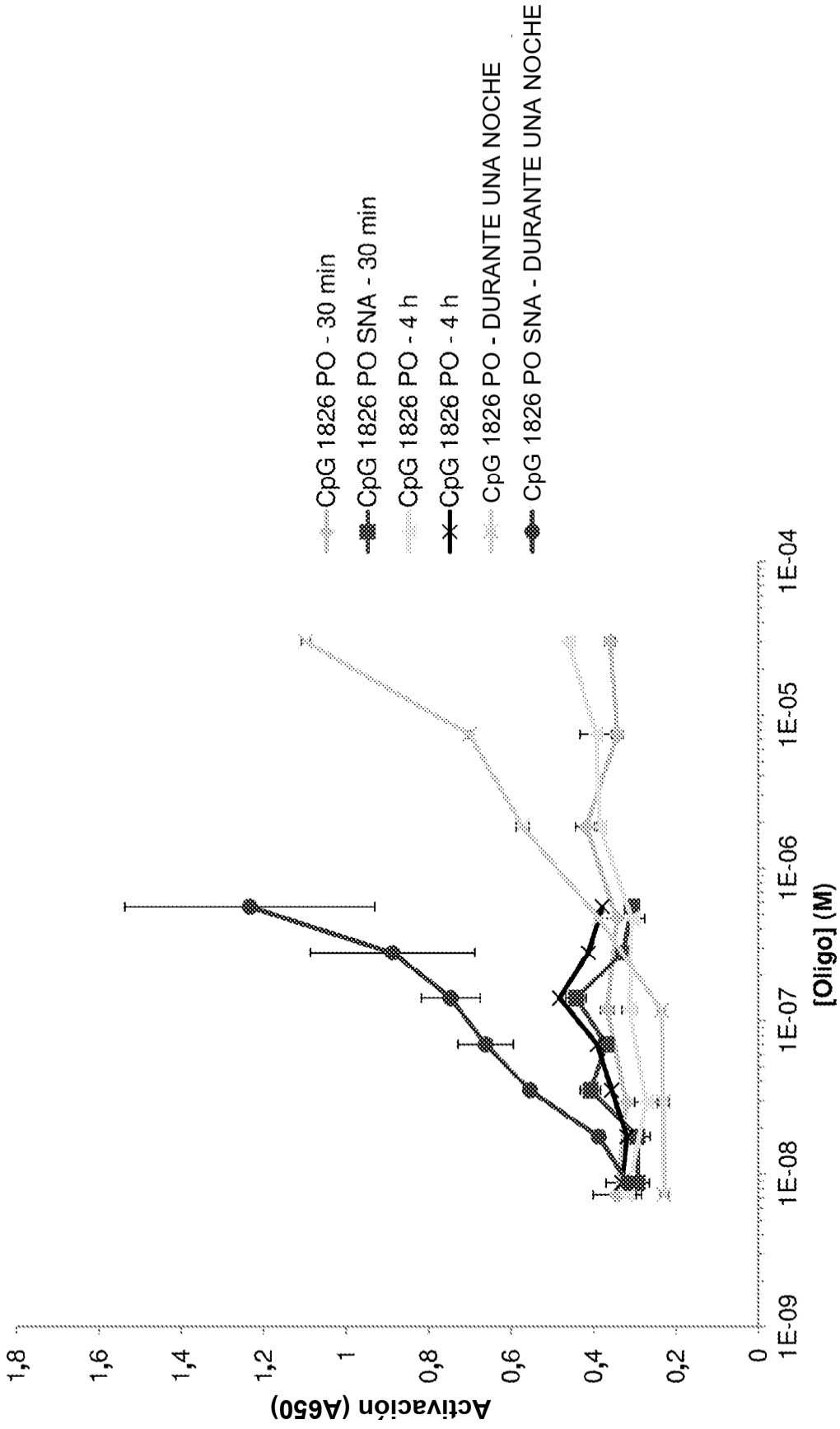


Figura 11

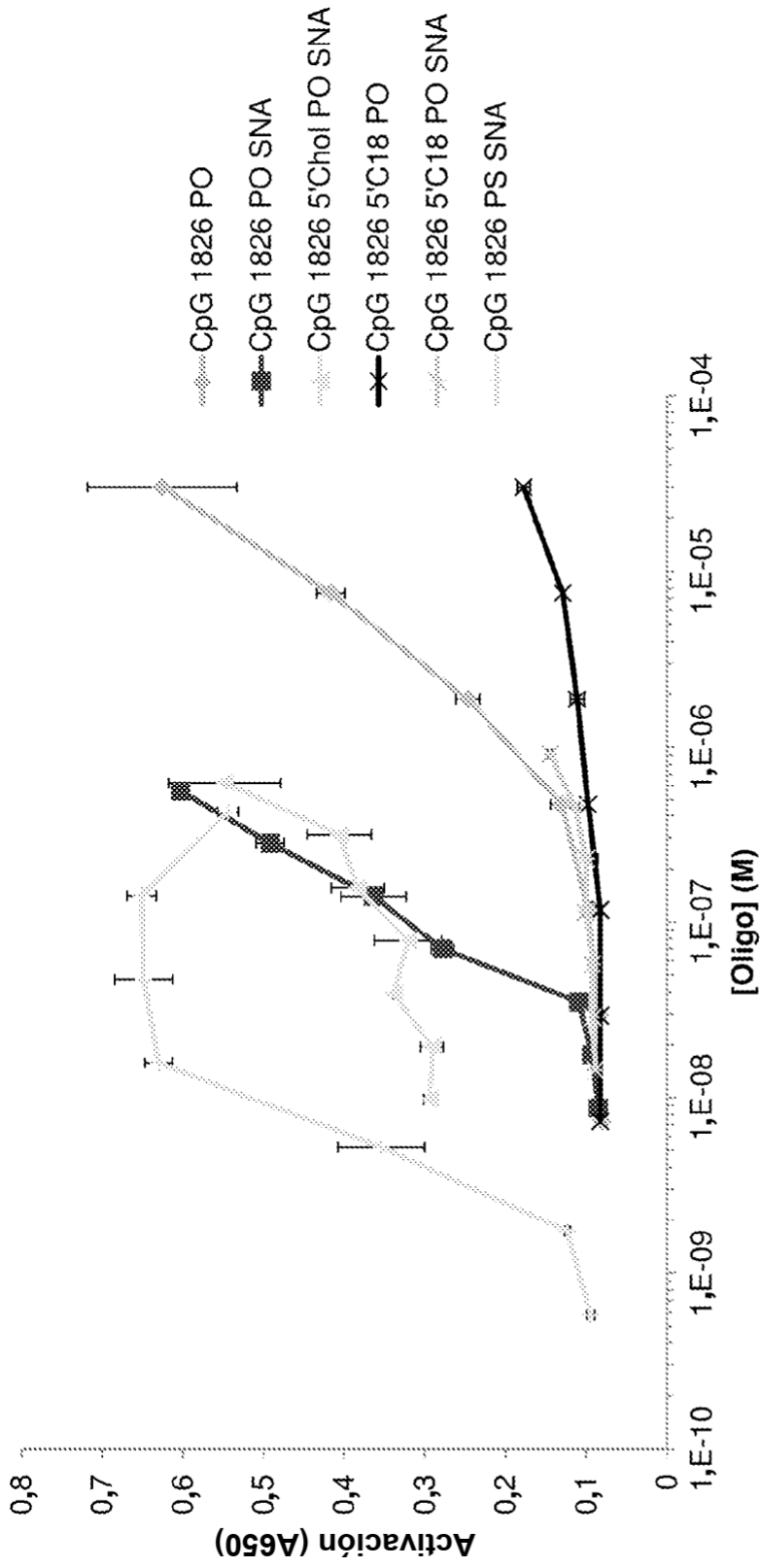


Figura 12

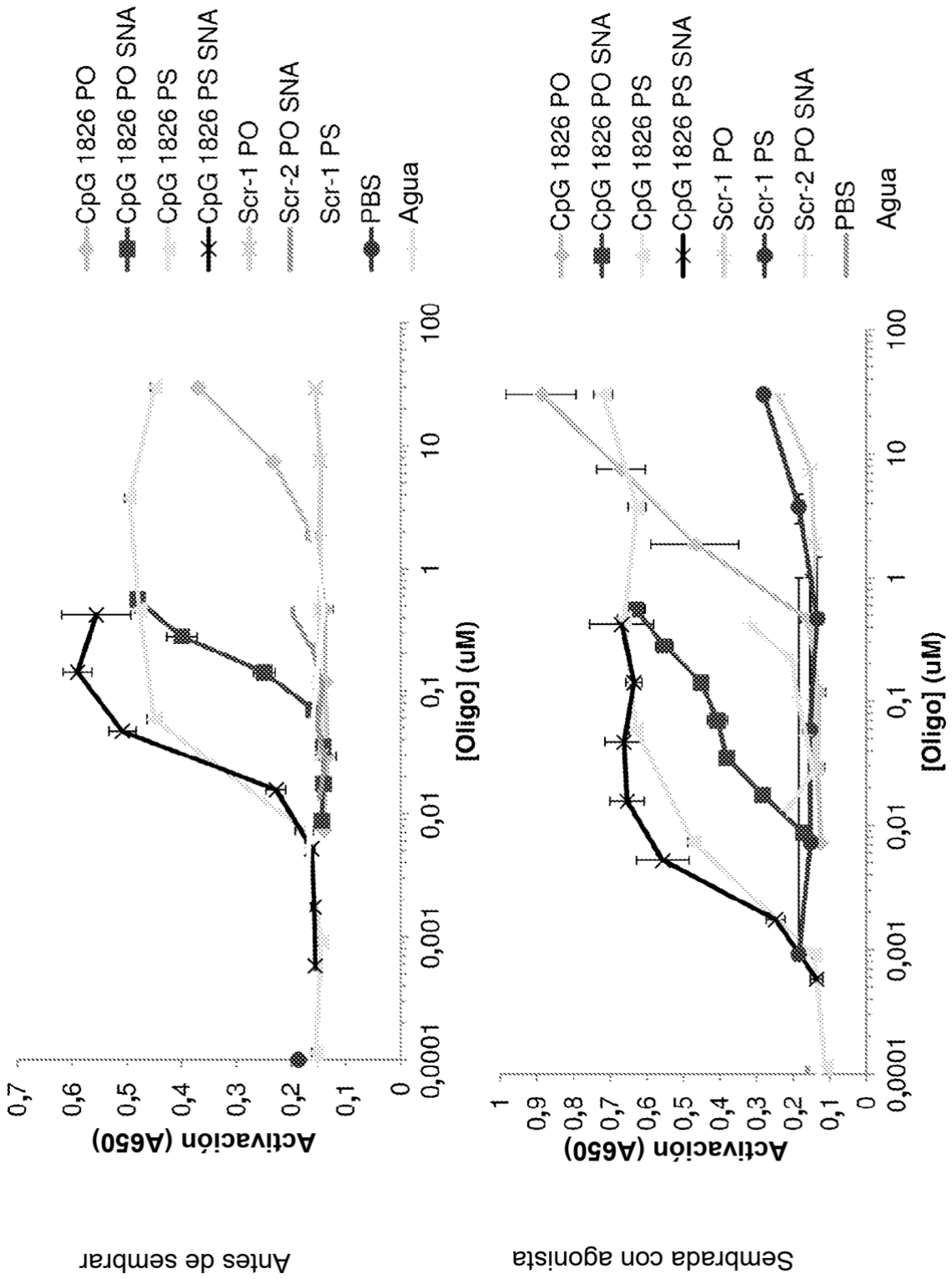


Figura 13

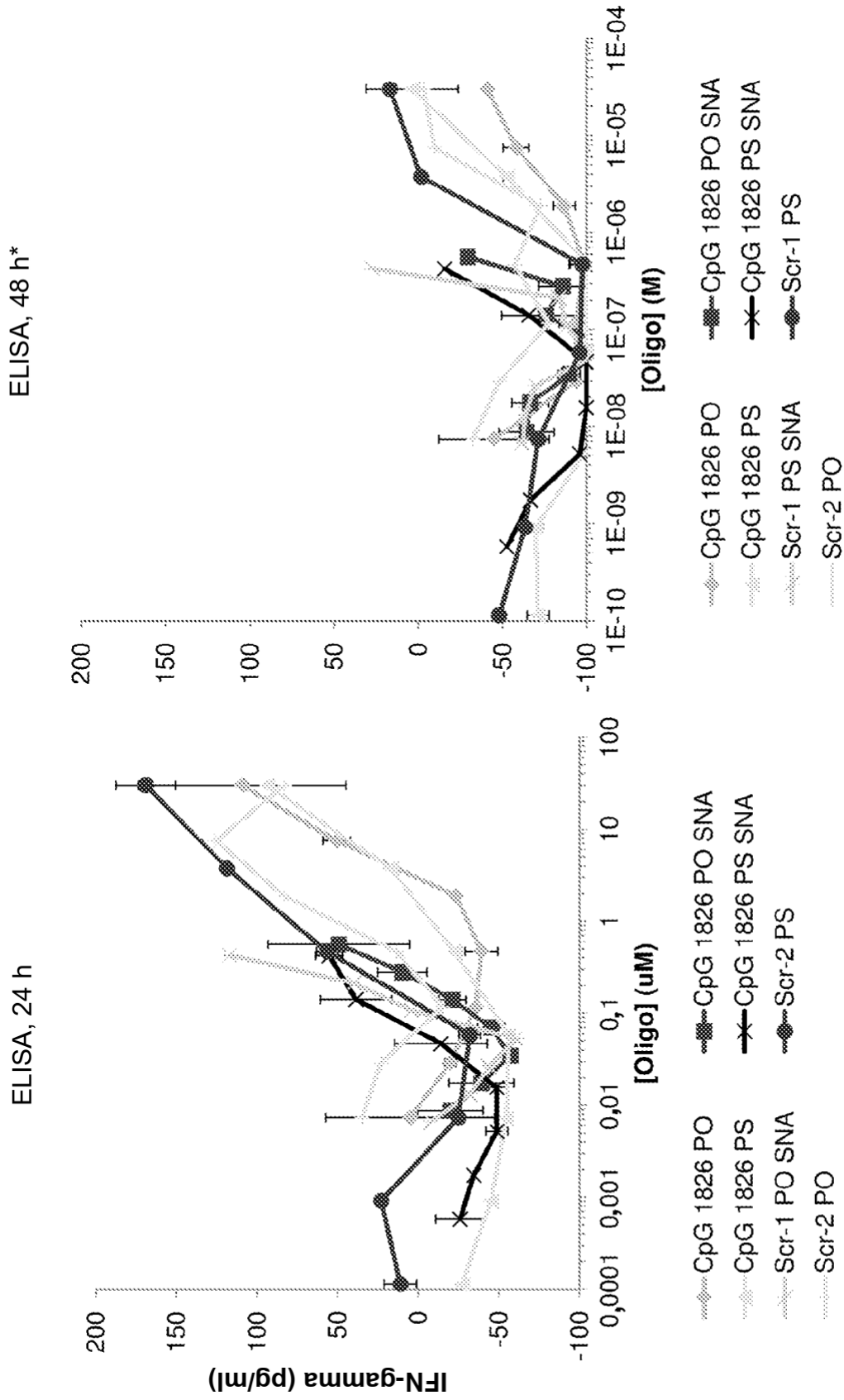


Figure 14

Esquema 1

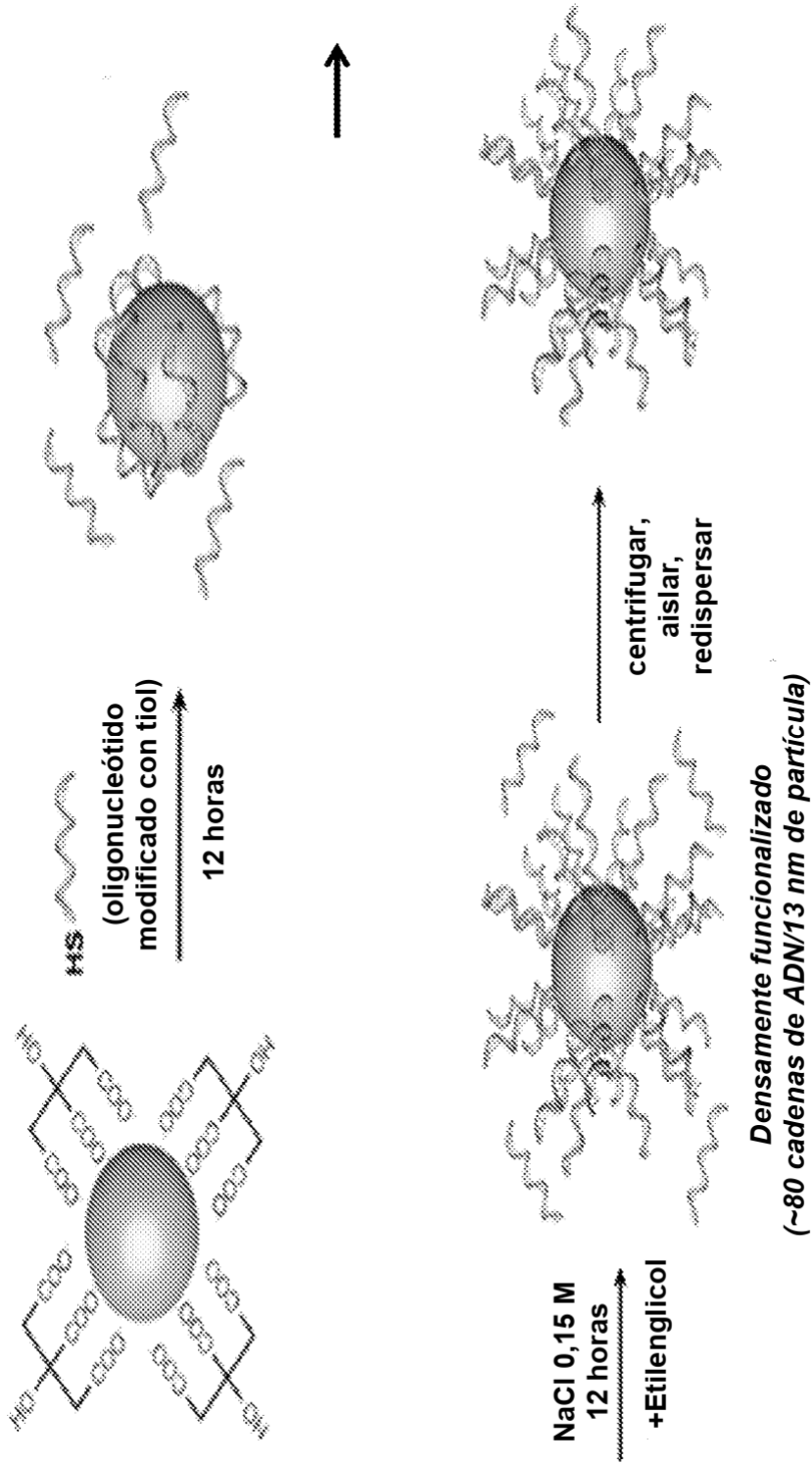
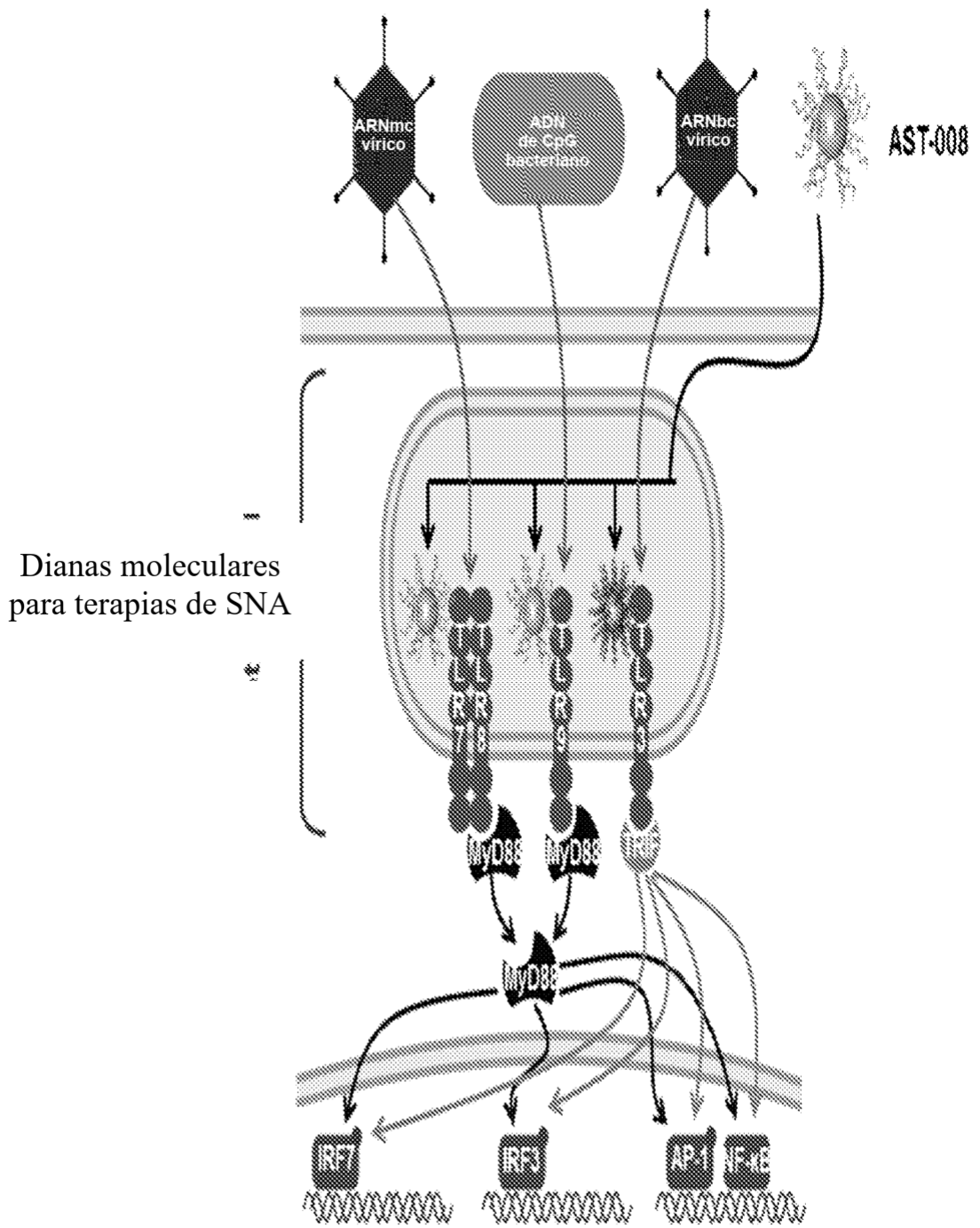


Figura 15





Respuestas inmunitarias innatas y adaptativas

Figura 16

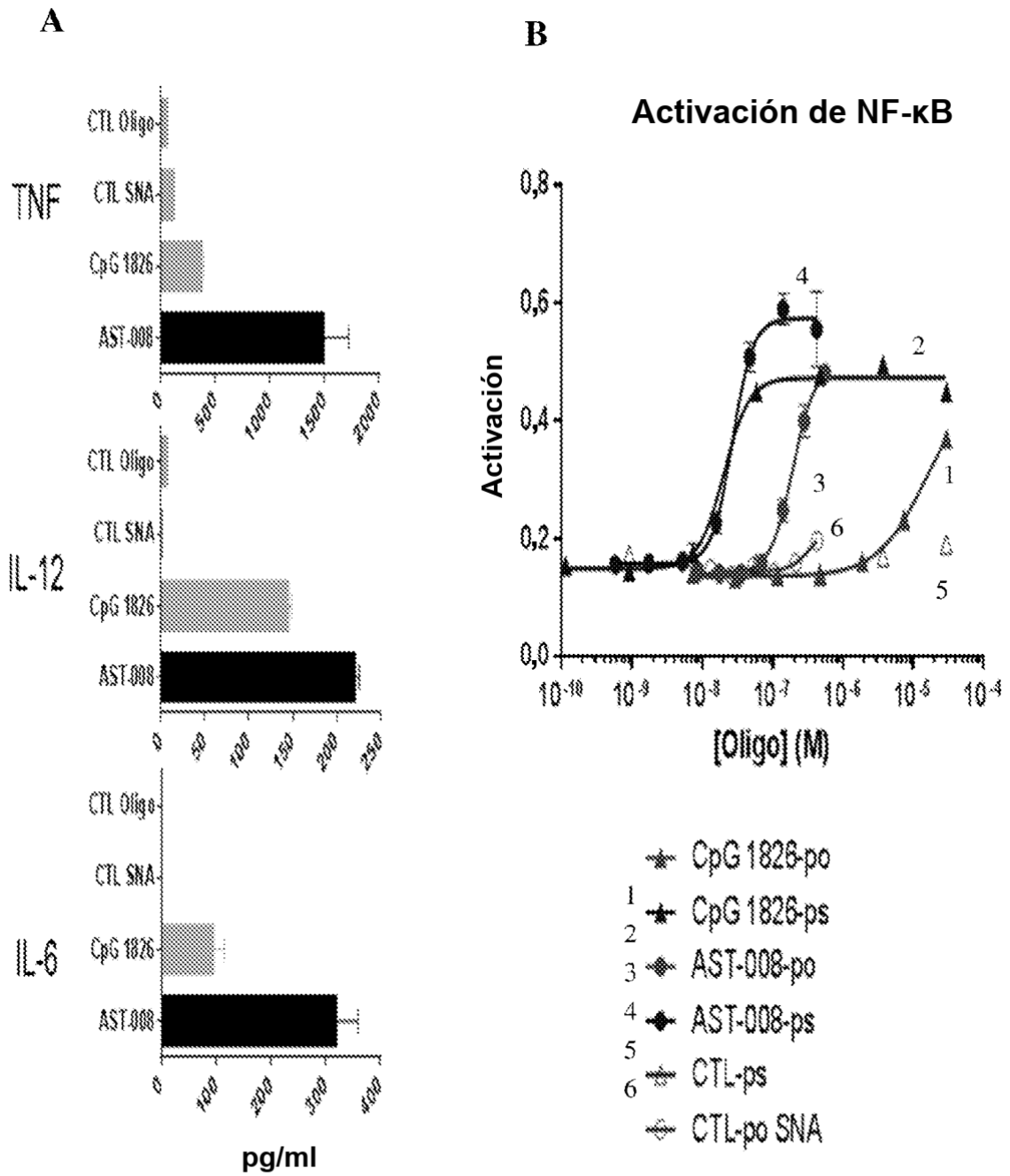
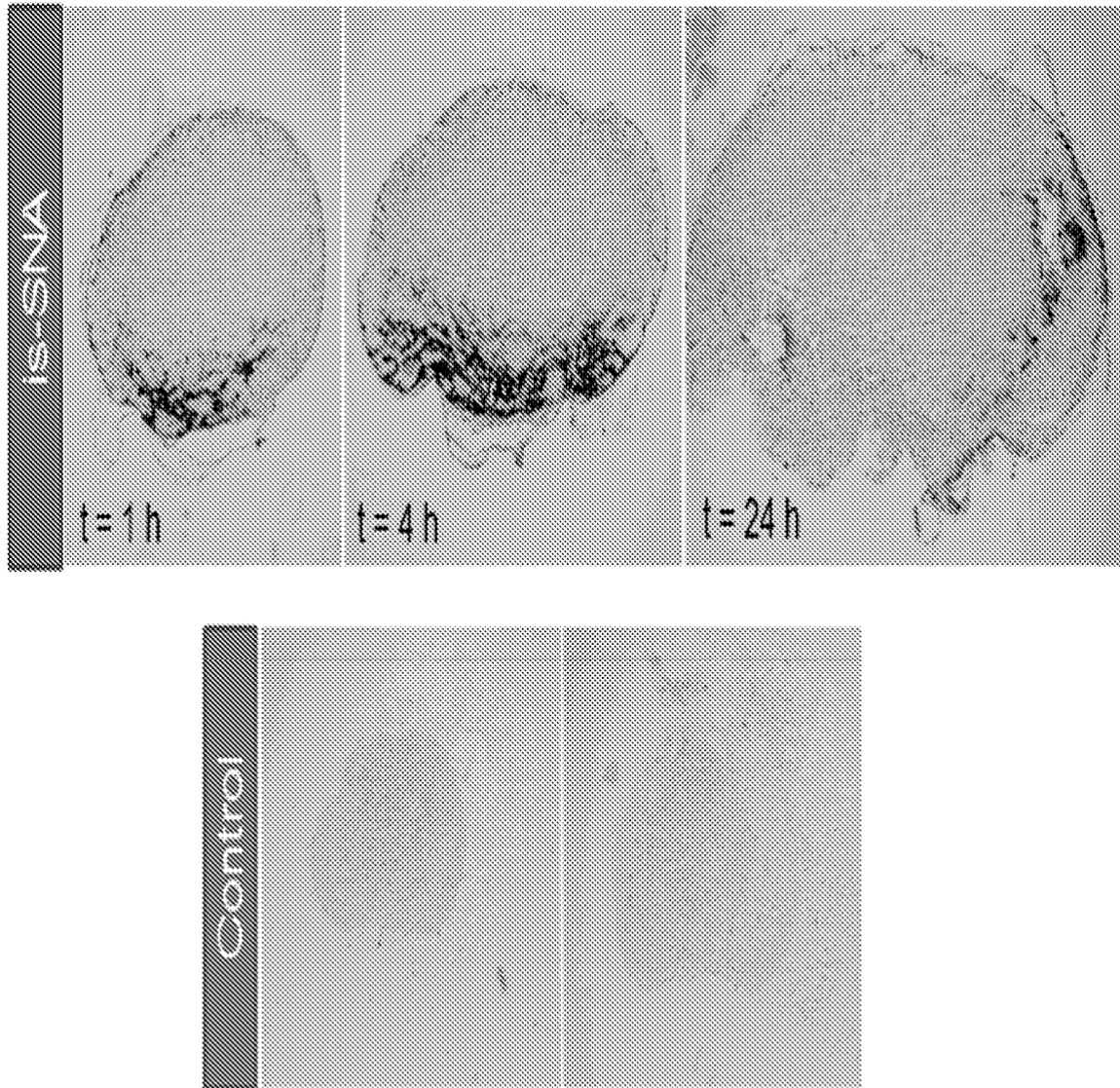


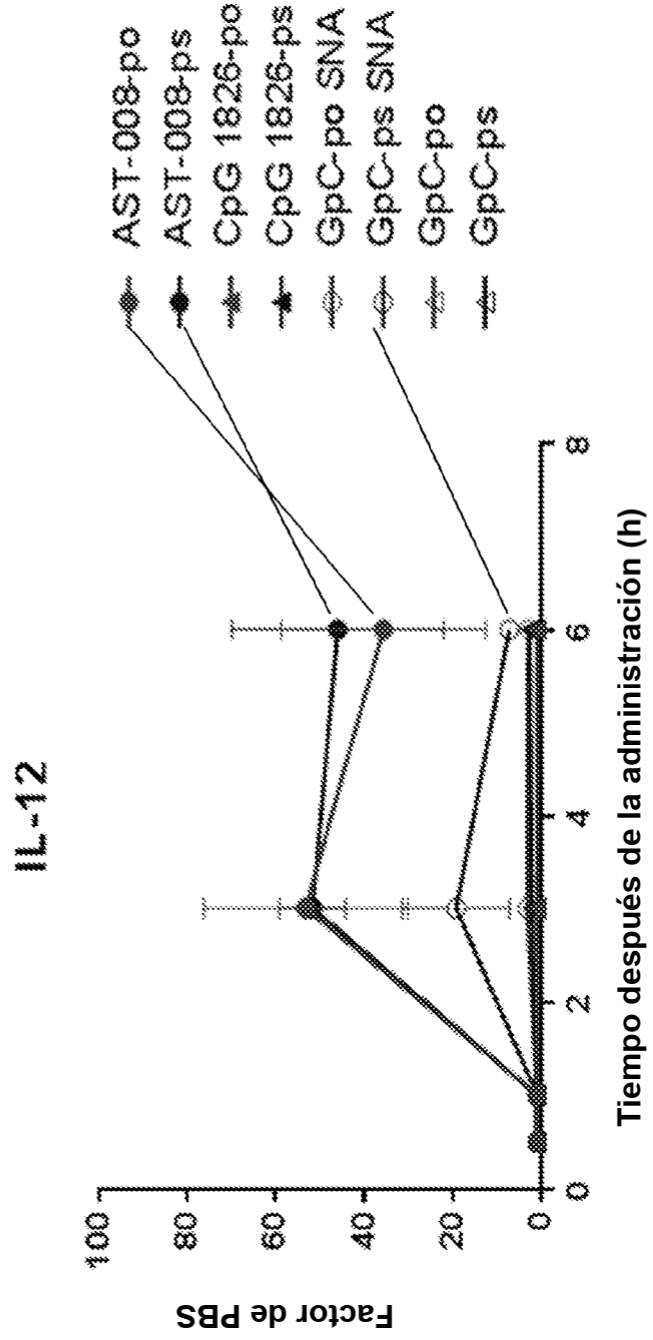
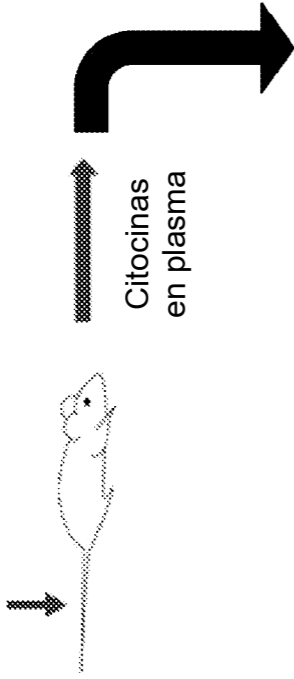
Figura 17



**Figura 18**

**Inyección en la vena de la cola (IV) (t=0)**

- 50 µl de embolada i.v., 5,1 nmol
- N=24 por grupo (3/punto temporal)



**Figura 19**

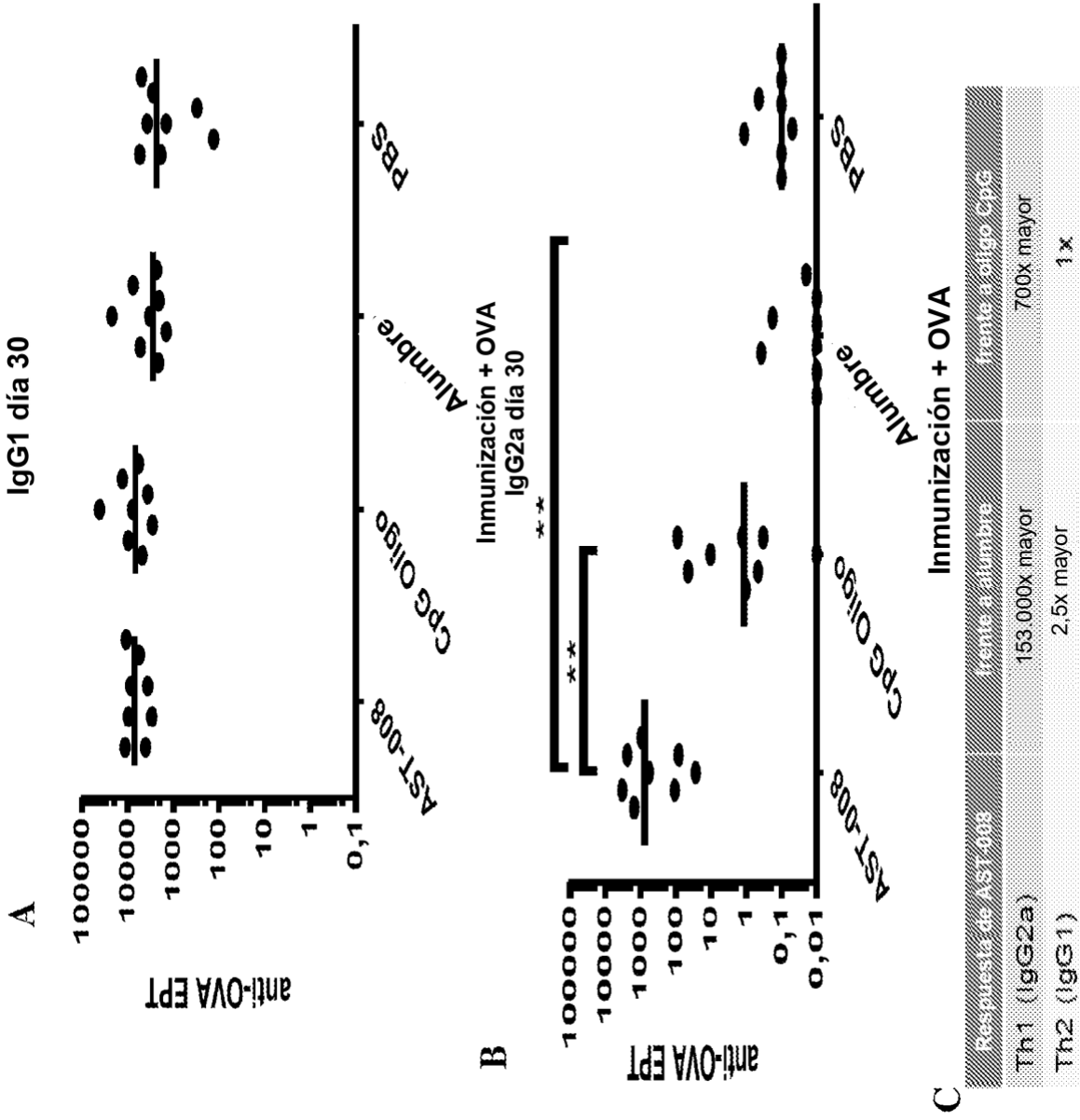


Figura 20



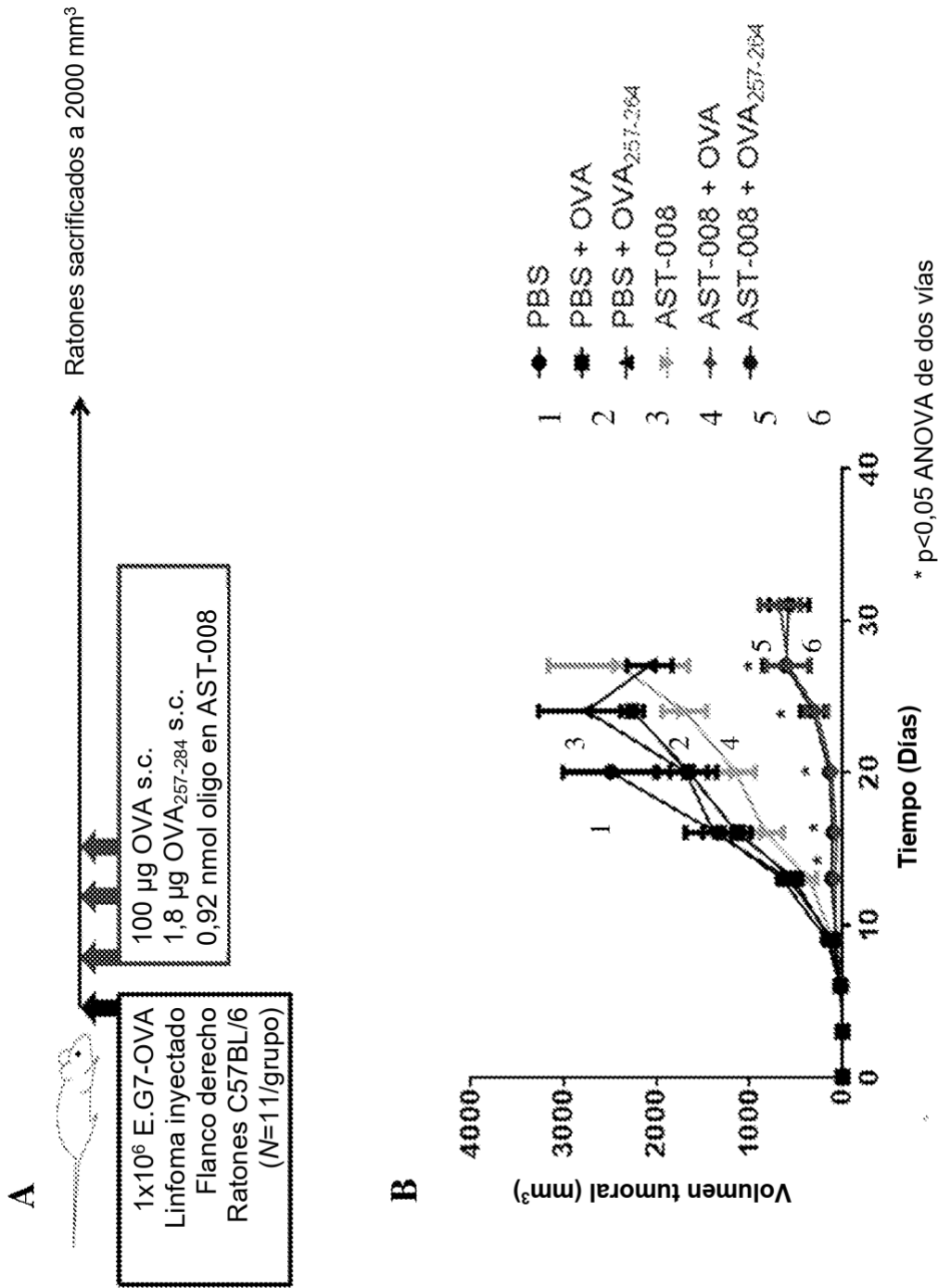


Figura 22

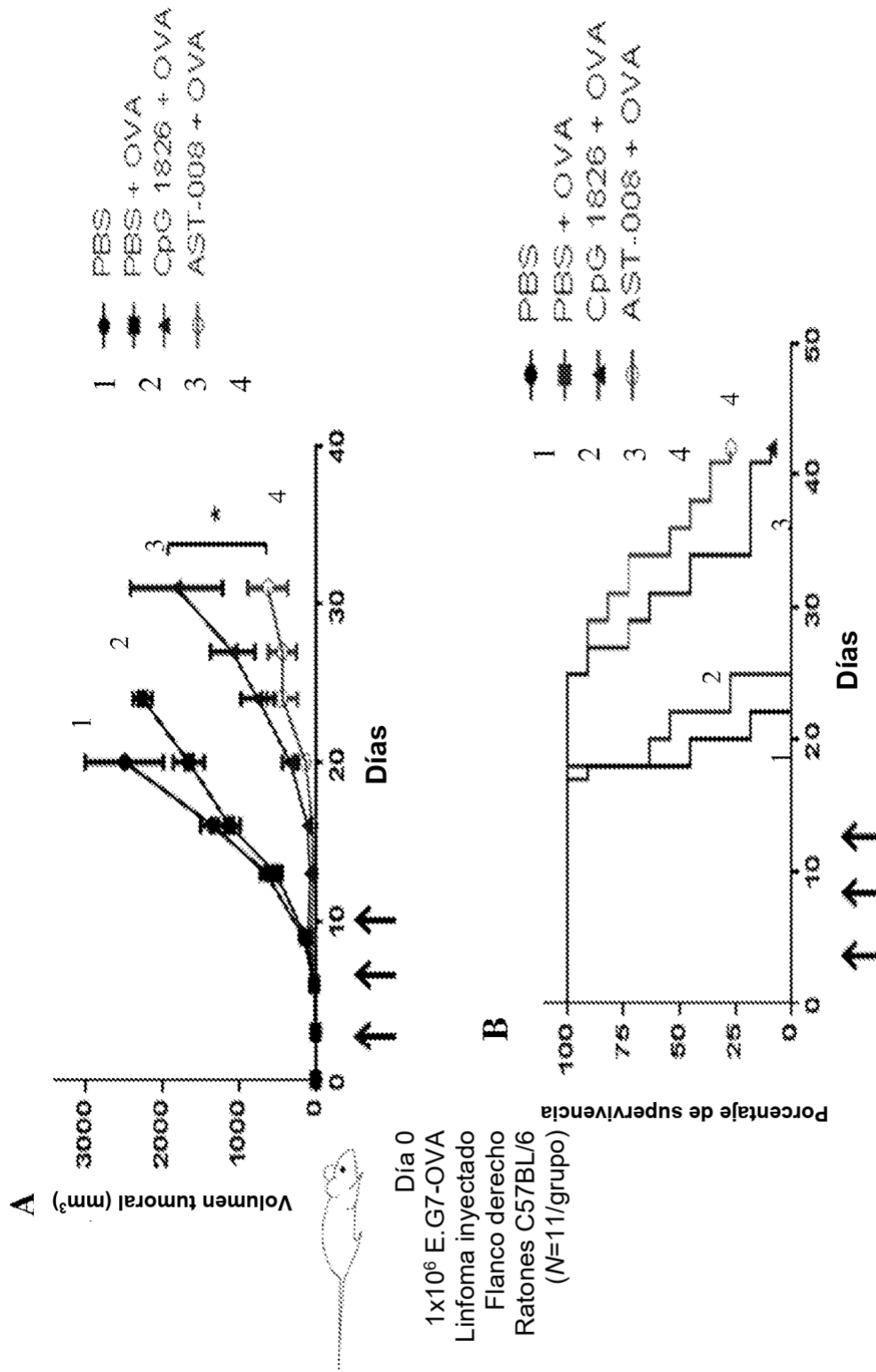


Figura 23