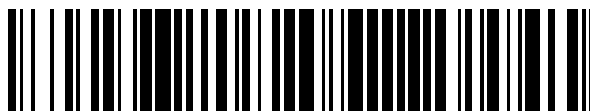


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 877**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2006 E 10013989 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2343307**

54 Título: **Compuestos oligonucleótidos inmuno reguladores (IRO) para modular la respuesta inmune basada en receptor semejante a Toll**

30 Prioridad:

12.10.2005 US 726034 P

21.03.2006 US 784243 P

13.09.2006 US 825440 P

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

04.09.2015

73 Titular/es:

IDERA PHARMACEUTICALS (100.0%)

345 Vassar Street

Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

KANDIMALLA, EKAMBAR R.;

DAQING, WANG;

LI, YUKUI;

YU, DONG;

FUGANG, ZHU;

LAKSHMI, BHAGAT y

AGRAWAL, SUDHIR

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 544 877 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos oligonucleótidos inmuno reguladores (IRO) para modular la respuesta inmune basada en receptor semejante a Toll

Solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U.S. No. de Serie 60/726.034, presentada el 12 de octubre, 2005; Solicitud Provisional U.S. No. de Serie 60/784.243, presentada el 21 de marzo, 2006; y Solicitud Provisional U.S. No. de Serie 60/825.440, presentada el 13 de septiembre, 2006.

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

- 10 La invención se refiere generalmente al campo de la inmunología e inmunoterapia, y más específicamente a composiciones de oligonucleótido inmuno regulador (IRO) que son útiles para la inhibición y/o supresión de respuestas inmunes mediadas por el Receptor semejante a Toll.

Resumen de la técnica relacionada

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

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

35

Tabla 1:

Molécula de TLR	Agonista
TLR de Superficie Celular:	
TLR2	lipopéptidos bacterianos
TLR4	bacterias gram negativas
TLR5	bacterias móviles
TLR6	bacterias gram positivas
TLR Endosomales:	
TLR3	virus con ARN bicatenario
TLR7	virus con ARN monocatenario
TLR8	virus con ARN monocatenario
TLR9	ADN no metilado

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

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

Aunque la activación de los TLR está implicada en la preparación de una respuesta inmune, una estimulación incontrolada del sistema inmune a través de los TLR puede exacerbar determinadas enfermedades en sujetos inmuno comprometidos. En los últimos años, varios grupos han mostrado el uso de oligodesoxi oligonucleótidos (ODN) sintéticos como inhibidores de citoquinas inflamatorias (Lenert, P. et al. (2003) *DNA Cell Biol.* 22(10): 621-631).

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

Por el contrario, estudios recientes han puesto en entredicho la visión de que ODN que contienen poli G actúan como antagonistas de los TLR. Por ejemplo, US 6.426.334, Agrawal et al., demuestran que la administración de oligonucleótidos CpG que contienen cadenas GGGG tiene actividad antiviral y anticancerosa potente, y además que la administración de estos compuestos causará un incremento en la concentración sérica de IL-12. Además, se sabe que los oligos CpG que contienen secuencias poliG inducen respuestas inmunes a través de la activación de TLR9 (Verthelyi D et al, *J. Immunol.* 166, 2372, 2001; Gursel M et al, *J Leukoc Biol*, 71, 813, 2001, Krug A et al, *Eur J*

Immunol, 31, 2154, 2001) y muestran actividades antitumorales, antivirales (Ballas G K et al, J Immunol, 167, 4878, 2001; Verthelyi D et al, J Immunol, 170, 4717, 2003). Además, también se sabe que los oligonucleótidos poliG inhiben VIH y Rel A (McShan W M, et al, J Biol. Chem., 267(8):5712-21, 1992; Rando, R F et al., J Biol Chem, 270(4):1754-60, 1995; Benimetskaya L, et al., Nucleic Acids Res., 25(13):2648-56, 1997). Además, los ODN que contienen un resto CpG inmuno estimulador y 4 nucleótidos G consecutivos (ODN clase A) inducen la producción de interferón- γ y un desplazamiento de Th1 en la respuesta inmune. Además, en modelos de enfermedad preclínicos, se ha mostrado que los ODN Clase A inducen una respuesta inmune mediada por TLR.

Además, se ha mostrado que los oligonucleótidos que contienen cadenas de guanósina forman estructuras tetraplex, actúan como aptámeros e inhiben la actividad de la trombina (Bock L C et al., Nature, 355:564-6, 1992; Padmanabhan, K et al., J Biol. Chem., 268(24):17651-4, 1993). Así, no está claro si las estructuras monocatenarias o multicatenarias son efectivas para suprimir la activación de TLR9.

Así, existe una necesidad para antagonistas efectivos de los TLR sin una preocupación de que formarán estructuras secundarias.

Resumen breve de la invención

Se describen compuestos oligonucleótidos inmuno reguladores (IRO) como antagonistas de los TLR. Estos IRO tienen una o más modificaciones químicas en la secuencia que flanquea un resto inmuno estimulador y/o en un resto de oligonucleótido que sería inmuno modulador si no fuera por la modificación.

La invención proporciona un antagonista de TLR que comprende un compuesto oligonucleótido inmuno regulador (IRO) que es un antagonista de uno o más TLR que tiene la estructura



en la que:

CG es un resto de oligonucleótido que es CpG, C*pG, C*pG* o CpG*, en el que C es citosina, C* es un derivado de nucleótido de pirimidina que es un nucleótido de pirimidina que tiene una base que no es citosina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, G es guanósina, y G* es un derivado de nucleótido de purina que es un nucleótido de purina que tiene una base que no es guanina o adenina y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido;

N_1-N_3 , en cada aparición, es independientemente i) un nucleótido, ii) un derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, o iii) una unión no nucleotídica, siempre que al menos uno de N_1-N_3 es un derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido;

N^1-N^3 , en cada aparición, es independientemente i) un nucleótido, o ii) un derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido;

N_m y N^m , en cada aparición, es independientemente un nucleótido, derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, o unión no nucleotídica;

y además siempre que el compuesto contiene menos de 3 nucleótidos de guanósina consecutivos;

en el que el resto de oligonucleótido sería inmuno estimulador si no fuera por el derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido;

en el que m es un número de 0 a aproximadamente 30;

en el que el compuesto oligonucleótido inmuno regulador no es un oligonucleótido antisentido;

para uso en el tratamiento terapéutico o prevención de una enfermedad mediada por un TLR en un mamífero, en el que la enfermedad es cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías aéreas, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos cutáneos, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno.

En una realización, la enfermedad está mediada por TLR7, TLR8 y/o TLR9.

En una realización, el antagonista de TLR comprende un compuesto oligonucleótido inmuno regulador (IRO) que es un antagonista para uno o más TLR que comprende al menos dos oligonucleótidos unidos por un conector no

nucleotídico en sus extremos 3' en el que el conector no nucleotídico puede estar unido al hidroxilo 3', azúcar funcionalizado o nucleobase funcionalizada, en el que al menos un oligonucleótido tiene la estructura



en la que:

- 5 CG es un resto de oligonucleótido que es CpG, C*pG, C*pG* o CpG*, en el que C es citosina, C* es un derivado de nucleótido de pirimidina que es un nucleótido de pirimidina que tiene una base que no es citosina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, G es guanosina, y G* es un derivado de nucleótido de purina que es un nucleótido de purina que tiene una base que no es guanina o adenina y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido;

- 10 N_1-N_3 , en cada aparición, es independientemente i) un nucleótido, ii) un derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, o iii) una unión no nucleotídica, siempre que al menos uno de N_1-N_3 es un derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido;

- 15 N^1-N^3 , en cada aparición, es independientemente i) un nucleótido, o ii) un derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido;

- 20 N_m y N^m , en cada aparición, es independientemente un nucleótido, derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, o unión no nucleotídica;

y además siempre que el compuesto contiene menos de 3 nucleótidos de guanosina consecutivos;

en el que el resto de oligonucleótido sería inmuno estimulador si no fuera por el derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido;

- 25 en el que m es un número de 0 a aproximadamente 30.

En una realización, N_1 es un derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido.

En una realización, los al menos dos oligonucleótidos no son oligonucleótidos antisentido.

En una realización, el antagonista de TLR suprime la actividad de TLR 7, TLR8 y/o TLR9.

- 30 En una realización, el conector no nucleotídico que une los al menos dos oligonucleótidos se selecciona del grupo que consiste en Glicerol (1,2,3-Propanotriol), 1,2,4, Butanotriol, 2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, 2-(hidroximetil)1,4-butanodiol, 1,3,5-Pentanotriol, 1,1,1-Tris(hidroximetil)etano, 1,1,1-Tris(hidroximetil)nitrometano, 1,1,1-Tris(hidroximetil)propano, 1,2,6-Hexanotriol, 3-Metil-1,3,5-pentanotriol, 1,2,3-Heptanotriol, 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida, cis-1,3,5-Ciclohexanotriol, Cis-1,3,5-Tri(hidroximetil)ciclohexano, 3,5-Di(hidroximetil)fenol, 1,3,5-Trihidroxil-benceno, 3,5-Di(hidroximetil)benceno, 1,3-Di(hidroxietoxi)-2-hidroxil-propano, 1,3-Di(hidroxipropoxi)-2-hidroxil-propano, 2-Desoxi-D-ribosa, 1,2,4-Trihidroxil-benceno, D-Galactoal, 1,6-anhidro- β -D-Glucosa, ácido 1,3,5-Tris(2-hidroxietil)-Cianúrico, ácido gálico, 3,5,7-Trihidroxiflavona, 4,6-Nitropirrogalol, Etilen glicol, 1,3-Propanodiol, 1,2-Propanodiol, 1,4-Butanodiol, 1,3-Butanodiol, 2,3-Butanodiol, 1,4-Butanodiol, 1,5-Pentanodiol, 2,4-Pentanodiol, 1,6-Hexanodiol, 1,2-Hexanodiol, 1,5-Hexanodiol, 2,5-Hexanodiol, 1,7-Heptanodiol, 1,8-Octanodiol, 1,2-Octanodiol, 1,9-Nonanodiol, 1,12-Dodecanodiol, Trietilen glicol, Tetraetilen glicol, 2-(1-Aminopropil)-1,3-propanodiol, ó 1,2-Didesoxiribosa.

- 35 En una realización, el conector no nucleotídico que une los al menos dos oligonucleótidos es Glicerol (1,2,3-Propanotriol).

- 45 En una realización, el derivado de nucleótido de pirimidina es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi- β -D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, 2'-desoxi-2'-arabinocitidina sustituida, 2'-O-arabinocitidina sustituida, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina.

En una realización, el derivado de nucleótido de purina es 2'-desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, 2'-desoxi-2'-arabinoguanosina-sustituida, 2'-O-arabinoguanosina-sustituida-, 2'-desoxiinosina.

- 50 En una realización, uno de los oligonucleótidos tiene la secuencia seleccionada de TCTGACGTTCT (SEQ ID NO: 86), TCTGACG₁TTCT (SEQ ID NO: 87), TCTGACG₄TTCT (SEQ ID NO: 88), TCTCTGACGTT (SEQ ID NO: 89), TCTGUCGTTCT (SEQ ID NO: 93), TCTGUCG₁TTCT (SEQ ID NO: 94), TCTGACG₁TT (SEQ ID NO: 96),

UGUCG₁TTCT (SEQ ID NO: 100) y UGACG₁TTCT (SEQ ID NO: 101), en las que A, G o U subrayada está sustituida en la posición 2' con OMe, G₁ es 7-deaza-dG, G₄ es araG, y X₂ es glicerol.

En una realización, el antagonista de TLR se selecciona de

- (i) 5'-(TCTGACTTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 86-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 86-5'),
- 5 (ii) 5'-(TCTGACG₁TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 87-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 87-5'),
- (iii) 5'-(TCTGACG₄TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 88-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 88-5'),
- (iv) 5'-(TCTCTGACGTT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 89-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 89-5'),
- (v) 5'-(TCTGUCGTTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 93-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 93-5'),
- (vi) 5'-(TCTGUCG₁TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 94-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 94-5'),
- 10 (vii) 5'-(TCTGACG₁TT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 96-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 96-5'),
- (viii) 5'-(UGUCG₁TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 100-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 100-5'),
- (ix) 5'-(UGACG₁TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 101-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 101-5'),

y

- (x) un compuesto bajo (i) a (ix) unido a una proteína vehicular inmunogénica,
- 15 en el que A, G o U subrayada está sustituida en la posición 2' con OMe, G₁ es 7-deaza-dG, G₄ es araG, y X₂ es glicerol.

En una realización, el antagonista de TLR es para administración en combinación con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas de TLR, antagonistas de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o moléculas co-estimuladoras.

En una realización, el antagonista de TLR es para administración parenteral, administración por administración mucosal, administración oral, administración sublingual, administración transdérmica, administración tópica, administración por inhalación, administración intranasal, administración por aerosol, administración intraocular, administración intratraqueal, administración intrarectal, administración vaginal, administración por pistola de genes, administración por parche dérmico o administración en forma de gotas oculares o lavado bucal.

Un compuesto IRO puede proporcionarse en una composición farmacéutica que comprende el compuesto IRO y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente memoria se describe un método para modificar un oligonucleótido que estimula TLR que comprende un resto de oligonucleótido inmuno estimulador que comprende incorporar modificaciones químicas en el resto de oligonucleótido inmuno estimulador y/o en la secuencia que flanquea el resto de oligonucleótido inmuno estimulador, en el que la actividad inmuno estimuladora del resto de oligonucleótido inmuno estimulador se suprime por las modificaciones químicas.

Un compuesto IRO es útil en un método para inhibir una respuesta inmune mediada por TLR en un vertebrado, comprendiendo el método administrar al vertebrado el compuesto IRO en una cantidad farmacéuticamente efectiva, en el que la ruta de administración es parenteral, administración mucosal, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, por pistola de genes, parche dérmico o en forma de gotas oculares o lavado bucal. La inhibición de la estimulación de TLR puede comprender administrar un compuesto IRO descrito en la presente memoria, en el que el TLR se selecciona de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, y TLR9.

Un compuesto IRO es útil en un método para inhibir la actividad de un agonista de TLR que comprende administrar el compuesto IRO, en el que el IRO se administra al mismo tiempo, antes de o después del agonista de TLR. El agonista de TLR puede seleccionarse de un agonista de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, y TLR9.

Un compuesto IRO descrito en la presente memoria es útil en un método para tratar terapéuticamente a un vertebrado que tiene una enfermedad mediada por un TLR, comprendiendo dicho método administrar al vertebrado el compuesto IRO en una cantidad farmacéuticamente efectiva. La enfermedad puede ser cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías aéreas, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos cutáneos, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno.

El compuesto IRO puede administrarse en combinación con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas de TLR, antagonistas de TLR, péptidos,

proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o moléculas co-estimuladoras. La ruta de administración puede ser parenteral, administración mucosal, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, por pistola de genes, parche dérmico o en forma de gotas oculares o lavado bucal.

- 5 Un compuesto IRO descrito en la presente memoria es útil en un método para prevenir cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías aéreas, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos cutáneos, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno en un vertebrado, comprendiendo dicho método administrar al vertebrado el compuesto IRO en una cantidad farmacéuticamente efectiva. El compuesto IRO puede administrarse en combinación con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas de TLR, antagonistas de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o moléculas co-estimuladoras. La ruta de administración puede ser parenteral, administración mucosal, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, por pistola de genes, parche dérmico o en forma de gotas oculares o lavado bucal.

Descripción breve de los dibujos

- 15 La Figura 1 demuestra la inhibición de IRO de la actividad agonista de TLR9 de un IMO.
 La Figura 2 demuestra la especificidad de un compuesto IRO como un antagonista de TLR9 frente a TLR3.
 La Figura 3 demuestra la inhibición dependiente de la dosis por un IRO.
 Las Figuras 4A-4D demuestran que la pre-administración y administración simultánea de IRO puede inhibir un agonista de TLR9.
- 20 Las Figuras 5A y 5B demuestran que dos oligonucleótidos CpG unidos en sus extremos 5' muestran propiedades inhibitoras de TLR.
 La Figura 6 demuestra que un IRO inhibió la actividad agonista de TLR9 en cultivos de células humanas.
 La Figura 7 demuestra un efecto IRO en respuestas inmunes Th2 y Th1 inducidas por OVA.
 La Figura 8 demuestra que un IRO revirtió propiedades inhibitoras de Th2 e inhibió respuestas inmunes Th1 inducidas por un IMO.
- 25 La Figura 9 demuestra respuestas de anticuerpo a un IMO y un IRO.
 La Figura 10 representa el protocolo de administración que se usó para identificar y caracterizar actividad IRO in vivo.
 La Figura 11 demuestra actividad inhibitora temprana de IRO seleccionados en TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, y TLR9 in vivo.
- 30 La Figura 12 demuestra actividad inhibitora temprana de IRO seleccionados en TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, y TLR9 in vivo.
 La Figura 13 demuestra actividad inhibitora temprana de IRO seleccionados en TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, y TLR9 in vivo.
- 35 La Figura 14 demuestra actividad antagonista a largo plazo de IRO seleccionados en TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, y TLR9 in vivo.
 La Figura 15 demuestra actividad antagonista a largo plazo de IRO seleccionados en TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, y TLR9 in vivo.
- 40 La Figura 16 demuestra actividad antagonista a largo plazo de IRO seleccionados en TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, y TLR9 in vivo.
 La Figura 17 demuestra que un IRO inhibe la proliferación de linfocitos B de ratón de tipo salvaje (BALB/c) y propenso a lupus (MRL-1pr) in vitro.
 Las Figuras 18A a 18C demuestran que un IRO inhibió la producción de IL-6 e IL-12 por linfocitos B de ratón de tipo salvaje (BALB/c) y propenso a lupus (MRL-1pr) células de bazo de ratón propenso a lupus (NZBW) in vitro.
- 45 Las Figuras 19A a 19E demuestran que los ratones MRL-1pr a los que se inyectó un IRO redujeron los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti-ADN en suero y proteína en orina.
 La Figura 20 demuestra que un IRO inhibe IgG2a anti-ADN en suero en ratones NZBW.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere al uso terapéutico de oligonucleótidos como agentes inmuno moduladores para aplicaciones en inmunoterapia. Específicamente, la invención se refiere a compuestos Oligonucleótido Inmuno Regulador (IRO) como antagonistas de receptores semejantes a Toll (TLR) para inhibir y/o suprimir una respuesta inmune mediada por TLR. Estos IRO tienen secuencias únicas que inhiben o suprimen la señalización mediada por TLR en respuesta a ligandos o agonistas de TLR endógenos y/o exógenos. Las referencias citadas en la presente memoria reflejan el nivel de conocimiento en el campo. Cualquier conflicto entre las enseñanzas de las referencias citadas y esta especificación deberá resolverse a favor de la última.

Los compuestos IRO descritos en la presente memoria son útiles en métodos para suprimir una respuesta inmune causada por TLR y pueden usarse para aplicaciones en inmunoterapia tales como, pero no limitado a, tratamiento de cáncer, trastornos autoinmunes, asma, alergias respiratorias, alergias alimentarias, alergias cutáneas, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis, pleuresía, infecciones crónicas, enfermedades inflamatorias, síndrome inflamatorio del intestino, sepsis, e infecciones bacterianas, parasitarias, y virales en aplicaciones en adultos y pediátricas humanas y veterinarias. Así, los compuestos IRO descritos en la presente memoria tienen niveles óptimos de efecto inmuno modulador para inmunoterapia. Además, los compuestos IRO descritos en la presente memoria son útiles en combinación, por ejemplo, con vacunas de ADN, antígenos, anticuerpos, y alérgenos; y en combinación con agentes quimioterapéuticos (tanto quimioterapia tradicional como terapias modernas dirigidas) y/o oligonucleótidos antisentido para la prevención y tratamiento de enfermedades.

Definiciones

El término "oligonucleótido" se refiere generalmente a un polinucleósido que comprende una pluralidad de unidades de nucleósido unidas. Dichos oligonucleótidos pueden obtenerse de fuentes de ácido nucleico existentes, incluyendo ADN genómico o ADNc, pero preferiblemente se producen por métodos sintéticos. En realizaciones preferidas, cada unidad de nucleósido puede englobar varias modificaciones y sustituciones químicas comparado con los oligonucleótidos de tipo salvaje, incluyendo pero no limitado a base de nucleósido modificada y/o unidad de azúcar modificada. Los ejemplos de modificaciones químicas son conocidos para el experto en la técnica y se describen, por ejemplo en Uhlmann E et al. (1990) Chem. Rev. 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; y Hunziker, J. et al. (1995) Mod. Syn. Methods 7:331-417; y Crooke, S. et al. (1996) Ann. Rev. Pharm. Tox. 36:107-129. Los residuos de nucleósidos pueden acoplarse entre sí mediante cualquiera de las numerosas uniones internucleósido conocidas. Dichas uniones internucleósido incluyen, sin limitación, uniones internucleósido fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidato con puente, metileno fosfonato con puente, fosforotioato con puente, y sulfona. El término "oligonucleótido" también engloba polinucleósidos que tienen una o más uniones internucleósido estereoespecíficas (por ejemplo, uniones (*R*)- o (*S*)-fosforotioato, alquilfosfonato, o fosfotriéster). Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" se pretende expresamente que incluyan polinucleósidos y dinucleósidos que tienen cualquiera de dichas uniones internucleósido, comprenda o no la unión un grupo fosfato. En determinadas realizaciones preferidas, estas uniones internucleósido pueden ser uniones fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato, o combinaciones de éstas.

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

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

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

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

El término "agonista" se refiere generalmente a una sustancia que se une a un receptor de una célula e induce una respuesta. Un agonista frecuentemente mimetiza la acción de una sustancia natural tal como un ligando.

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

5 El término "adyuvante" se refiere generalmente a una sustancia que, cuando se añade a un agente inmunogénico tal como vacuna o antígeno, aumenta o potencia una respuesta inmune al agente en el huésped receptor después de la exposición a la mezcla.

El término "inflamación de las vías aéreas" incluye generalmente, sin limitación, asma.

10 El término "alergeno" se refiere generalmente a un antígeno o parte antigénica de una molécula, habitualmente una proteína, que incita una respuesta alérgica después de la exposición de un sujeto. Típicamente, el sujeto es alérgico al alergeno como se indica, por ejemplo, por el ensayo de pápulas y reacción eritematosa o cualquier método conocido en la técnica. Se dice que una molécula es un alergeno incluso si sólo un pequeño subconjunto de sujetos presenta una respuesta inmune alérgica después de exposición a la molécula.

El término "alergia" se refiere generalmente a una respuesta inmune inapropiada caracterizada por inflamación e incluye, sin limitación, alergias alimentarias y alergias respiratorias.

15 El término "antígeno" se refiere generalmente a una sustancia que es reconocida y unida selectivamente por un anticuerpo o por un receptor de antígeno de células T, lo que resulta en la inducción de una respuesta inmune. Los antígenos pueden incluir pero no están limitados a péptidos, proteínas, nucleósidos, nucleótidos y combinaciones de éstos. Los antígenos pueden ser naturales o sintéticos e inducen generalmente una respuesta inmune que es específica para ese antígeno.

20 El término "trastorno autoinmune" se refiere generalmente a trastornos en los que los componentes "propios" experimentan el ataque del sistema inmune.

25 El término "enfermedad mediada por TLR" o "trastorno mediado por TLR" significa generalmente cualquier afección patológica para la que la activación de uno o más TLR es un factor contribuyente. Dichas afecciones incluyen pero no están limitadas a, cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías aéreas, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos cutáneos, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno.

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

30 El término "vehículo" engloba generalmente cualquier excipiente, diluyente, material de relleno, sal, tampón, estabilizador, solubilizador, aceite, lípido, vesícula que contiene lípido, microesferas, encapsulación liposomal, u otro material muy conocido en la técnica para uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del vehículo, excipiente, o diluyente dependerán de la ruta de administración para una aplicación particular. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describe, por ejemplo en, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18a Edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

El término "co-administración" se refiere generalmente a la administración de al menos dos sustancias diferentes lo suficientemente cercanas en el tiempo como para modular una respuesta inmune. La co-administración se refiere a la administración simultánea, así como al orden espaciado en el tiempo de hasta varios días de diferencia, de al menos dos sustancias diferentes en cualquier orden, bien en una única dosis o dosis separadas.

40 El término "complementario" significa generalmente que tiene la capacidad de hibridar con un ácido nucleico. Dicha hibridación es habitualmente el resultado de enlaces de hidrógeno entre cadenas complementarias, preferiblemente para formar parejas de bases de Watson-Crick o Hoogsteen, aunque otros modos de enlace de hidrógeno, así como apilamiento de bases también pueden dar lugar a hibridación.

45 El término una "cantidad efectiva" o una "cantidad suficiente" se refiere generalmente a una cantidad suficiente para efectuar un efecto biológico deseado, tal como resultados beneficiosos. Así, una "cantidad efectiva" o "cantidad suficiente" dependerá del contexto en el que se está administrando. En el contexto de la administración de una composición que modula una respuesta inmune frente a un antígeno co-administrado, una cantidad efectiva de un compuesto IRO y antígeno es una cantidad suficiente para conseguir la modulación deseada comparado con la respuesta inmune obtenida cuando el antígeno se administra solo. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones.

55 El término "en combinación con" significa generalmente, en el curso del tratamiento de una enfermedad o trastorno en un paciente, administrar un compuesto IRO y un agente útil para tratar la enfermedad o trastorno que no disminuya el efecto inmuno modulador del compuesto IRO. Dicho tratamiento de combinación también puede incluir más de una única administración de un compuesto IRO y/o independientemente un agente. La administración del compuesto IRO y/o el agente puede ser por la misma ruta o rutas diferentes.

El término "individuo" o "sujeto" o "vertebrado" se refiere generalmente a un mamífero, tal como un ser humano. Los mamíferos incluyen generalmente, pero no están limitados a, seres humanos, primates no humanos, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado, vacas, cerdos, ovejas y conejos.

5 El término "nucleósido" se refiere generalmente a compuestos que consisten en un azúcar, habitualmente ribosa o desoxirribosa, y una base de purina o pirimidina.

El término "nucleótido" se refiere generalmente a un nucleósido que comprende un grupo fosfato unido al azúcar.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "nucleósido de pirimidina" se refiere a un nucleósido en el que el componente de base del nucleósido es una base de pirimidina (por ejemplo, citosina (C) o timina (T) o uracilo (U)). De manera similar, el término "nucleósido de purina" se refiere a un nucleósido en el que el componente de base del nucleósido es una base de purina (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)).

Los términos "análogo" o "derivado" pueden usarse indistintamente para hacer referencia generalmente a cualquier nucleótido o nucleósido de purina y/o pirimidina que tiene una base y/o azúcar modificado. Una base modificada es una base que no es guanina, citosina, adenina timina o uracilo. Un azúcar modificado es cualquier azúcar que no es ribosa ó 2'desoxirribosa y puede usarse en el núcleo para un oligonucleótido.

15 El término "inhibir" o "suprimir" se refiere generalmente a una disminución en una respuesta o diferencia cualitativa en una respuesta, que podría surgir de otra manera a partir de la incitación y/o estimulación de una respuesta.

El término "conector no nucleotídico" se refiere generalmente a cualquier unión o resto que puede unir o puede unirse a los oligonucleótidos distinto de una unión que contiene fósforo. Preferiblemente, dicho conector tiene una longitud de aproximadamente 2 angstroms a aproximadamente 200 angstroms.

20 El término "unión nucleotídica" se refiere generalmente a una unión directa 3'-5' que conecta directamente los grupos hidroxilo 3' y 5' de dos nucleósidos a través de una unión que contiene fósforo.

25 Los términos "resto de oligonucleótido" significa una secuencia de oligonucleótido, incluyendo un dinucleótido. Un "resto de oligonucleótido que sería inmuno estimulador, si no fuera por una o más modificaciones" significa un resto de oligonucleótido que es inmuno estimulador en un oligonucleótido parental, pero no en un oligonucleótido derivado, en el que el oligonucleótido derivado se basa en el oligonucleótido parental, pero tiene una o más modificaciones.

Los términos CpG, C*pG, C*pG* y CpG* se refieren a restos de oligonucleótido que son inmuno estimuladores y comprenden citosina o un análogo de citosina y una guanina o un análogo de guanina.

30 El término "tratamiento" se refiere generalmente a una estrategia que pretende obtener un resultado beneficioso o deseado, que puede incluir el alivio de síntomas, o retraso o mejoría de la progresión de una enfermedad.

35 El término "IRO" se refiere a un compuesto oligonucleótido inmuno regulador que es un antagonista para uno o más TLR, en el que el compuesto comprende un resto de oligonucleótido y al menos una modificación, en el que el resto de oligonucleótido sería inmuno estimulador (por ejemplo, CpG no metilado), si no fuera por la una o más modificaciones que suprimen la actividad del resto de oligonucleótido, siempre que el compuesto contenga menos de 4 nucleótidos de guanosina consecutivos y preferiblemente menos de 3 nucleótidos de guanosina consecutivos. Dichas modificaciones pueden estar en el extremo 5' del oligonucleótido, en una secuencia que flanquea el resto de oligonucleótido, y/o en el resto de oligonucleótido. Estas modificaciones resultan en un compuesto IRO que suprime la estimulación inmune modulada por TLR. Dichas modificaciones pueden estar en las bases, residuos de azúcar y/o el núcleo fosfato de los nucleótidos/nucleósidos que flanquean el resto de oligonucleótido o en el resto de oligonucleótido.

40 En realizaciones preferidas, cuando la modificación es una 2' alquilación o alcoxilación, la modificación no es adyacente en 5' al resto de oligonucleótido; cuando la modificación es una unión internucleósido no cargada la modificación no es adyacente en 5' al resto de oligonucleótido; y cuando la modificación es una 3' alquilación o alcoxilación, la modificación no es adyacente en 5' ó 3' al resto de oligonucleótido.

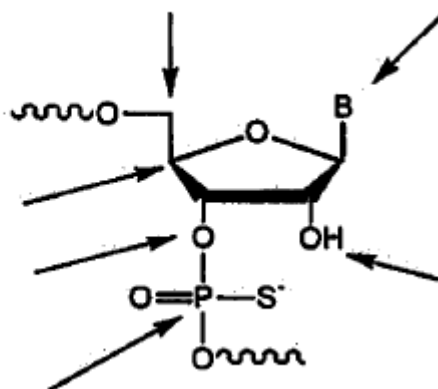
45 En realizaciones preferidas, el compuesto IRO no es un oligonucleótido antisentido.

50 La estructura general de los compuestos IRO puede representarse como 5'-N_m-N₃N₂N₁CGN¹N²N³-N^m-3' en la que CG es un resto inmuno estimulador y C es citosina o un derivado de nucleótido de pirimidina o conector no nucleotídico, y G es guanosina, un derivado de nucleótido de purina o conector no nucleotídico; N1-N3, en cada aparición, es independientemente un nucleótido, derivado de nucleótido o conector no nucleotídico; Nm, en cada aparición, es independientemente un nucleótido, derivado de nucleótido o conector no nucleotídico; siempre que al menos uno de N1 a N3 y/o C y/o G es un derivado de nucleótido o conector no nucleotídico; y además siempre que el compuesto contenga menos de 4 nucleótidos de guanosina consecutivos y preferiblemente menos de 3 guanosinas consecutivas, en

el que la actividad inmuno estimuladora del CG se suprime por el derivado de nucleótido o conector no nucleotídico; y en el que m es un número de 0 a aproximadamente 30.

Los compuestos IRO pueden comprender al menos dos oligonucleótidos unidos covalentemente por una unión nucleotídica, o un conector no nucleotídico, en sus extremos 5', 3' ó 2' o por azúcar funcionalizado o por nucleobase funcionalizada a través de un conector no nucleotídico o una unión nucleotídica. Dichos compuestos IRO pueden ser lineales o ramificados. Como un ejemplo no limitativo, el conector puede estar unido al grupo hidroxilo 3'. En dichas realizaciones, el conector comprende un grupo funcional, que está unido al hidroxilo 3' mediante una unión basada en fosfato como, por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, o por uniones no basadas en fosfato. Los sitios posibles de conjugación para el ribonucleótido se indican en la Fórmula I, siguiente, en la que B representa una base heterocíclica y en la que la flecha que apunta a P indica cualquier unión a fósforo.

Fórmula I



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

En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un hidrocarburo alifático o aromático, pudiendo incluir cualquiera de los dos opcionalmente, bien en la cadena lineal que conecta los oligoribonucleótidos o unidos a ésta, uno o más grupos funcionales incluyendo, pero no limitado a, hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea, o tiourea. La molécula pequeña puede ser cíclica o acíclica. Los ejemplos de conectores que son moléculas pequeñas incluyen, pero no están limitados a, aminoácidos, carbohidratos, ciclodextrinas, adamantano, colesterol, haptenos y antibióticos. Sin embargo, para los propósitos de describir el conector no nucleotídico, el término "molécula pequeña" no se pretende que incluya un nucleósido.

En algunas realizaciones, el conector no nucleotídico es un conector alquilo o conector amino. El conector alquilo puede ser ramificado o no ramificado, cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado, quiral, aquiral o mezcla racémica. Los conectores alquilo pueden tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunas realizaciones, dichos conectores alquilo tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 átomos de carbono. Algunos conectores alquilo incluyen uno o más grupos funcionales incluyendo, pero no limitado a, hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea, y tioéter. Dichos conectores alquilo pueden incluir, pero no están limitados a, conectores 1,2 propanodiol, 1,2,3 propanotriol, 1,3 propanodiol, trietilen glicol hexaetilen glicol, polietilen glicol (por ejemplo, $[-O-CH_2-CH_2-]_n$ ($n = 1-9$)), conectores metilo, conectores etilo, conectores propilo, conectores butilo, o conectores hexilo. En algunas realizaciones, dichos conectores alquilo pueden incluir péptidos o aminoácidos.

En algunas realizaciones, el conector no nucleotídico puede incluir, pero no está limitado a, los listados en la Tabla 2.

Tabla 2: Conectores no Nucleotídicos Representativos

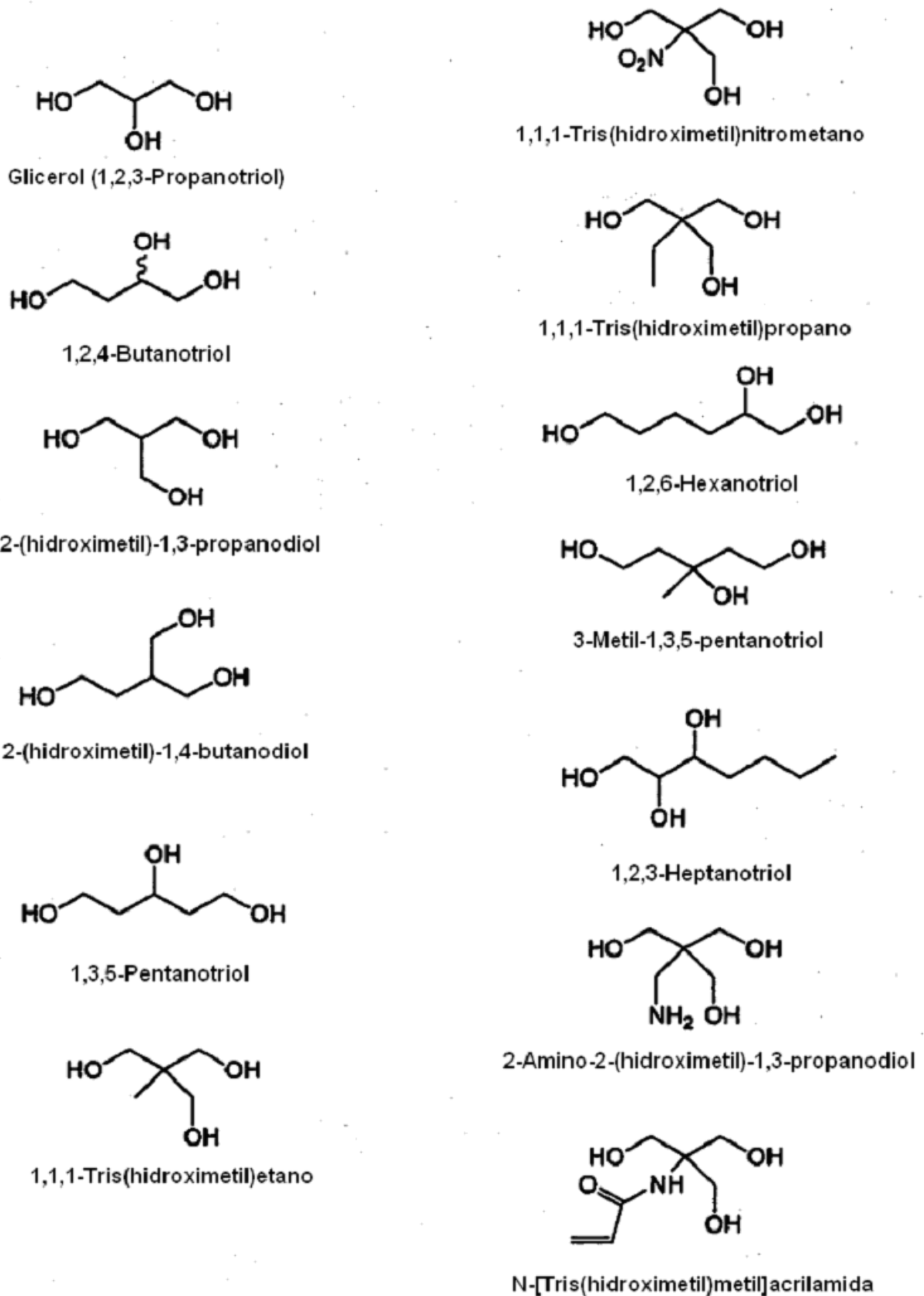
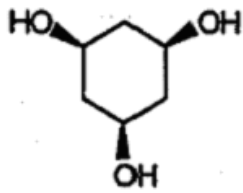
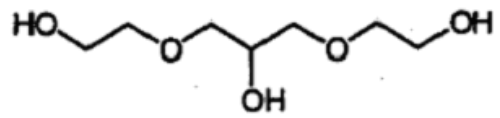


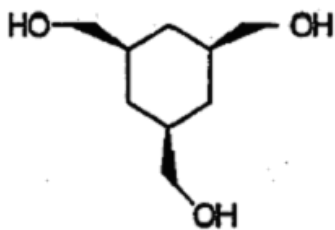
Tabla 2: Continuación



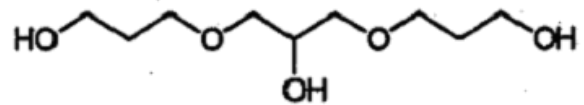
cis-1,3,5-Ciclohexanotriol



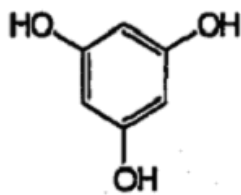
1,3-Di(hidroxietero)-2-hidroxi-propano



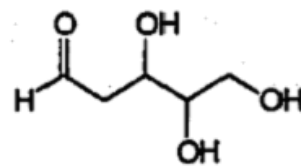
cis-1,3,5-Tri(hidroxiometil)ciclohexano



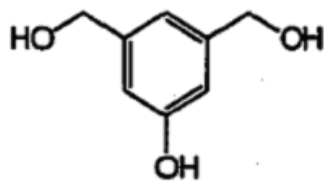
1,3-Di(hidroxiopropoxi)-2-hidroxi-propano



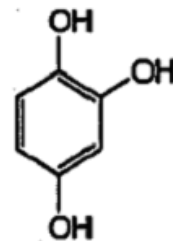
1,3,5-Trihidroxi-benceno



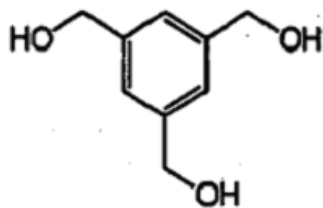
2-Desoxi-D-ribosa



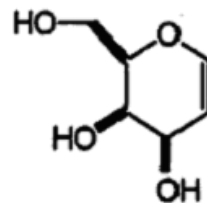
3,5-Di(hidroxiometil)fenol



1,2,4-Trihidroxi-benceno

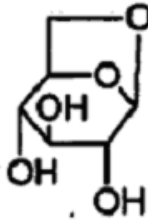


1,3,5-Tri(hidroxiometil)benceno

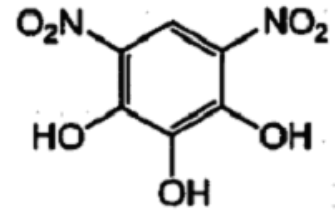


D-Galactal

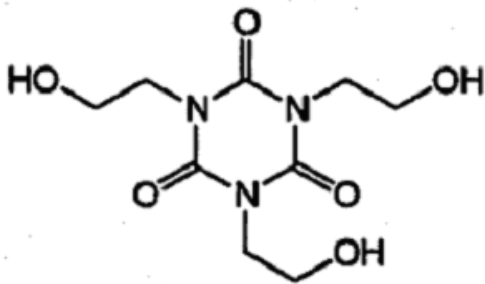
Tabla 2: Continuación



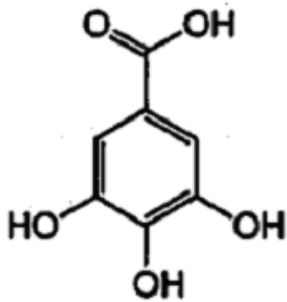
1,6-anhidro- β -D-Glucosa



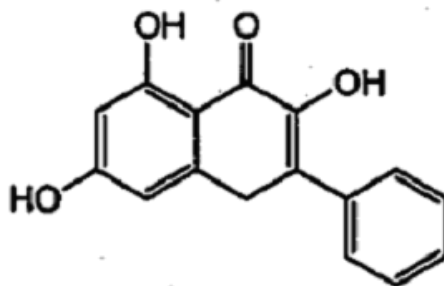
4,6-Nitropirogalol



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

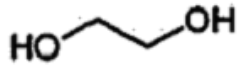


Ácido gálico



3,5,7-Trihidroxiflavona

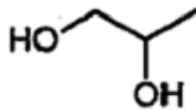
Tabla 2: Continuación



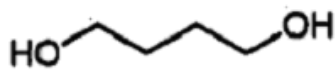
Etilen glicol



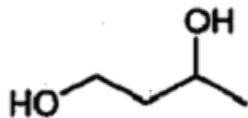
1,3-Propanodiol



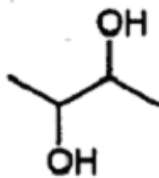
1,2-Propanodiol



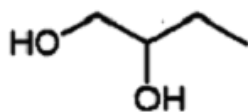
1,4-Butanodiol



1,3-Butanodiol



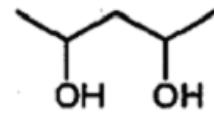
2,3-Butanodiol



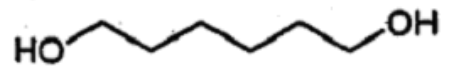
1,4-Butanodiol



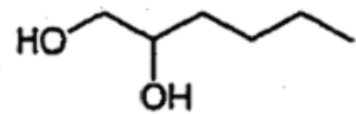
1,5-Pentanodiol



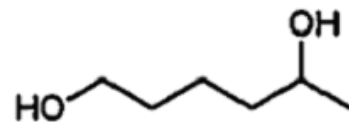
2,4-Pentanodiol



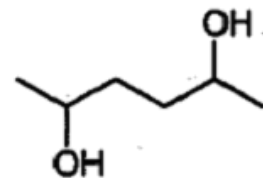
1,6-Hexanodiol



1,2-Hexanodiol



1,5-Hexanodiol



2,5-Hexanodiol

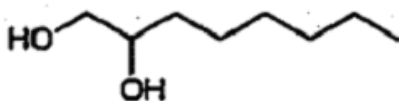
Tabla 2: Continuación



1,7-Heptanodiol



1,8-Octanodiol



1,2-Octanodiol



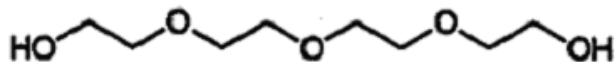
1,9-Nonanodiol



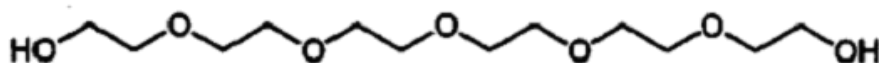
1,12-Dodecanodiol



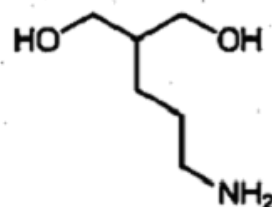
Trietilen glicol



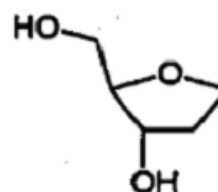
Tetraetilen glicol



Hexaetilen glicol



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



1,2-Didesoxiribosa

El algunas realizaciones, el conector que es una molécula pequeña es glicerol o un homólogo de glicerol de la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$, en la que o y p son independientemente números enteros de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3. En algunas otras realizaciones, el conector que es una molécula pequeña es un derivado de 1,3-diamino-2-hidroxipropano. Algunos de dichos derivados tienen la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$, en la que m es un número

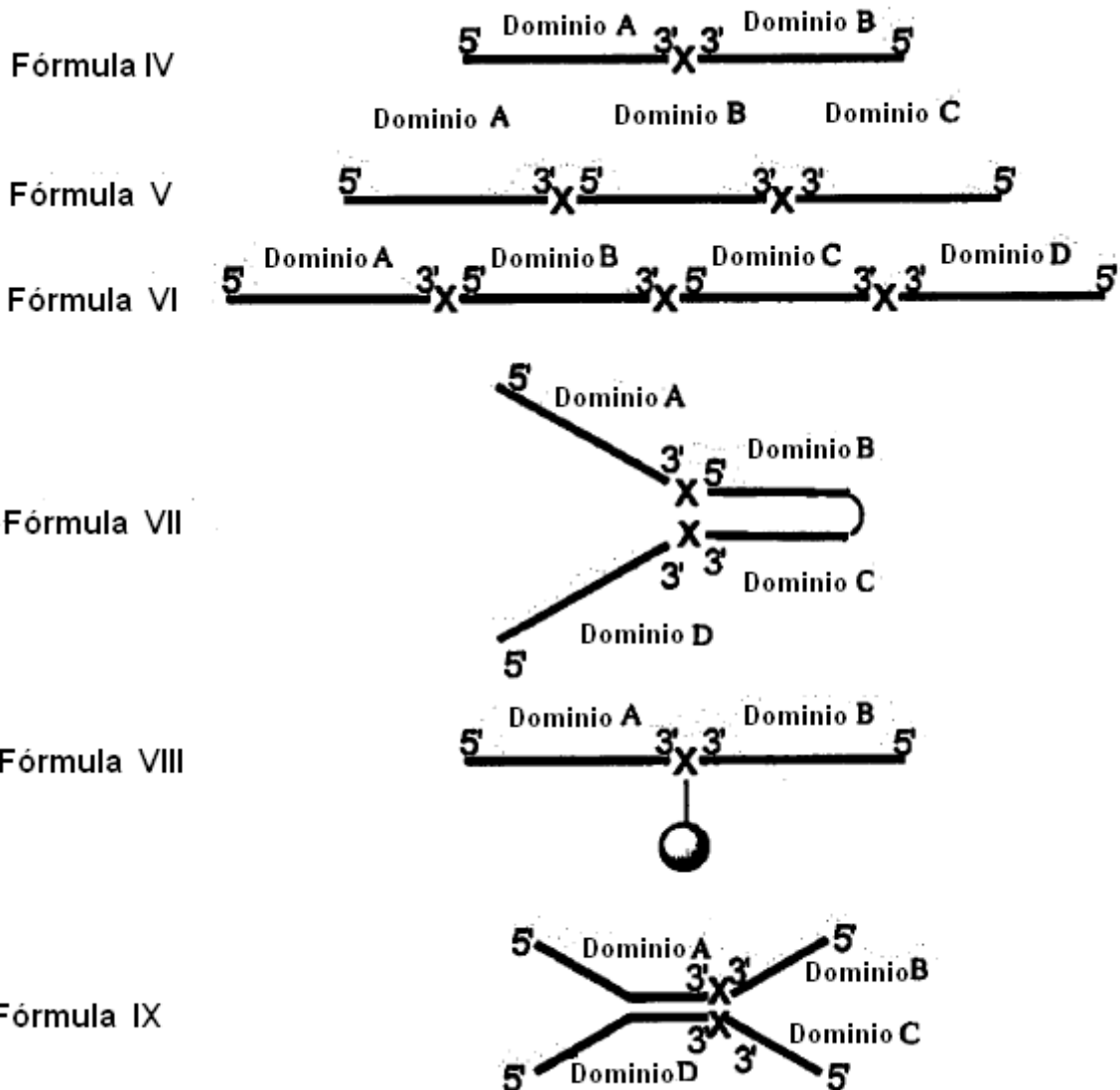
entero de 0 a aproximadamente 10, de 0 a aproximadamente 6, de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 4.

5 Algunos conectores no nucleotídicos permiten la unión de más de dos oligonucleótidos. Por ejemplo, el conector que es una molécula pequeña glicerol tiene tres grupos hidroxilo a los que pueden unirse covalentemente oligonucleótidos. Algunos IRO descritos en la presente memoria comprenden, por lo tanto, dos o más oligonucleótidos unidos a un conector nucleotídico o no nucleotídico. Dichos IRO se refieren como que están "ramificados".

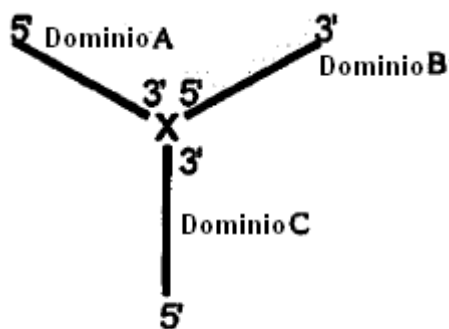
10 Los compuestos IRO pueden comprender al menos dos oligonucleótidos unidos no covalentemente, tal como por interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, interacciones de apilamiento π , enlace de hidrógeno y combinaciones de éstas. Los ejemplos no limitativos de dicha unión no covalente incluye emparejamiento de bases de Watson- Crick, emparejamiento de bases de Hoogsteen y apilamiento de bases.

Algunas de las formas en las que dos o más oligonucleótidos pueden unirse se muestran en la Tabla 3.

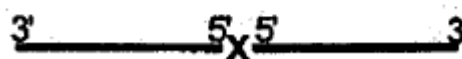
Tabla 3: Fórmulas de Oligoribonucleótido IV-XI



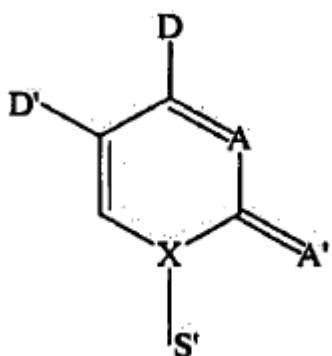
Fórmula X



Fórmula XI

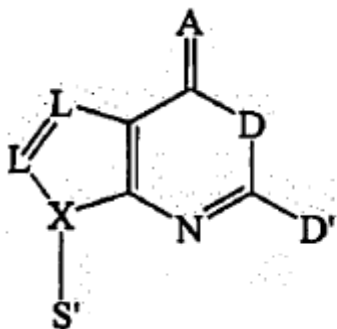


En determinadas realizaciones, los nucleósidos de pirimidina en los oligonucleótidos inmuno reguladores descritos en la presente memoria tienen la estructura (II):



(II)

- 5 en la que:
- D es un donante de enlace de hidrógeno;
- D' se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, donante de enlace de hidrógeno, aceptor de enlace de hidrógeno, grupo hidrofílico, grupo hidrofóbico, grupo aceptor de electrones y grupo donante de electrones;
- A es un aceptor de enlace de hidrógeno o un grupo hidrofílico;
- 10 A' se selecciona del grupo que consiste en aceptor de enlace de hidrógeno, grupo hidrofílico, grupo hidrofóbico, grupo aceptor de electrones y grupo donante de electrones;
- X es carbono o nitrógeno; y
- S' es un anillo de azúcar pentosa o hexosa o un análogo de azúcar.
- 15 En determinadas realizaciones, el anillo de azúcar se derivatiza con un resto fosfato, resto fosfato modificado, u otro resto conector adecuado para unir el nucleósido de pirimidina a otro nucleósido o análogo de nucleósido.
- En algunas realizaciones, los donantes de enlace de hidrógeno incluyen, sin limitación, -NH-, -NH₂, -SH y -OH. Los aceptores de enlace de hidrógeno preferidos incluyen, sin limitación, C=O, C=S y los átomos de nitrógeno de anillo de un heterociclo aromático, por ejemplo, N3 de citosina.
- 20 En algunas realizaciones, (II) es un derivado de nucleósido de pirimidina. Los ejemplos de derivados de nucleósido de pirimidina incluyen, sin limitación, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, N4-alcilcitosina, o N4-etilcitosina, araC, 5-OH-dC, N3-Me-dC, y 4-tiouracilo. Los derivados químicos modificados también incluyen, pero no están limitados a, análogos de timina o uracilo. En algunas realizaciones, el resto de azúcar S' en (II) es un derivado de azúcar. Los derivados de azúcar adecuados, incluyen, pero no están limitados a, trehalosa o derivados de trehalosa, hexosa o derivados de hexosa, arabinosa o derivados de arabinosa.
- 25 En algunas realizaciones, los nucleósidos de purina en los oligonucleótidos inmuno reguladores descritos en la presente memoria tienen la estructura (III):



(III)

en la que:

D es un donante de enlace de hidrógeno;

D' se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, donante de enlace de hidrógeno, y grupo hidrofílico;

5 A es un aceptor de enlace de hidrógeno o un grupo hidrofílico;

X es carbono o nitrógeno;

cada L se selecciona independientemente del grupo que consiste en C, O, N y S;

y

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

10 En determinadas realizaciones, el anillo de azúcar se derivatiza con un resto fosfato, resto fosfato modificado, u otro resto conector adecuado para unir el nucleósido de pirimidina a otro nucleósido o análogo de nucleósido.

En determinadas realizaciones, los donantes de enlace de hidrógeno incluyen, sin limitación, -NH-, -NH₂-, -SH y -OH. En determinadas realizaciones, los aceptores de enlace de hidrógeno incluyen, sin limitación, C=O, C=S, -NO₂ y los átomos de nitrógeno de anillo de un heterociclo aromático, por ejemplo, N1 de guanina.

15 En algunas realizaciones, (III) es un derivado de nucleósido de purina. Los ejemplos de derivados de nucleósido de purina incluyen, sin limitación, análogos de guanina tales como 7-deaza-G, 7-deaza-dG, ara-G, 6-tio-G, Inosina, Iso-G, loxoribina, TOG(7-tio-8-oxo)-G, 8-bromo-G, 8-hidroxi-G, 5-aminoformicina B, Oxoformicina, 7-metil-G, 9-p-clorofenil-8-aza-G, 9-fenil-G, 9-hexil-guanina, 7-deaza-9-bencil-G, 6-Cloro-7-deazaguanina, 6-metoxi-7-deazaguanina, 8-Aza-7-deaza-G(PPG), 2-(Dimetilamino)guanosina, 7-Metil-6-tioguanosina, 8-Benciloxiguanosina, 9-Deazaguanosina, 1-(B-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina. Los derivados químicos modificados también incluyen, pero no están limitados a, análogos de adenina tales como 9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)adenina, 2-Amino-N2-O-, metiladenosina, 8-Aza-7-deaza-A, 7-deaza-A, Vidarabina, 2-Aminoadenosina, N1-Metiladenosina, 8-Azaadenosina, 5-Yodotubercidina, y N1-Me-dG. En algunas realizaciones, el resto de azúcar S' en (III) es un derivado de azúcar como se define para la Fórmula II.

25 En determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmuno regulador comprende una secuencia de ácido nucleico que contiene al menos un nucleósido B-L-desoxi o nucleósido 3'-desoxi.

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido inmuno regulador comprende una secuencia de ácido nucleico que contiene al menos un dinucleótido seleccionado de CpG, C*pG, C*pG* y CpG*, en el que C es citosina ó 2'-desoxicitidina, G es guanosina ó 2'-desoxiguanosina, C* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, 2'-desoxi-2'-arabinocitidina sustituida, 2'-O-arabinocitidina sustituida, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-aquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósido de pirimidina, G* es 2'-desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, 2'-desoxi-2'-arabinoguanosina sustituida, 2'-O-arabinoguanosina sustituida, 2'-desoxiinosina, u otros análogos de nucleósido de purina, y p es una unión internucleósido seleccionada del grupo que consiste en fosfodiéster, fosfortioato, y fosforoditioato, y en el que la actividad del al menos un dinucleótido está regulada por la secuencia flanqueante.

Las secuencias de IRO específicos en estas estructuras generales usadas en el presente estudio incluyen, pero no están limitadas a, las mostradas en la Tabla 4. Aquellos compuestos que no están abarcados por las reivindicaciones se proporcionan sólo para propósitos comparativos.

40

Tabla 4

IRO/SEQ ID NO:	Secuencia
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
7	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
17	5'-CTATCTGACG ₁ TTCTCTGT-3'
37	5'-CTATCTGACG ₄ TTCTCTGT-3'
39	5'-CTATCTGAC ₄ GTTCTCTGT-3'
41	5'-CTATCTGAC ₅ GTTCTCTGT-3'
43	5'-CTATCTGAC ₆ GTTCTCTGT-3'
45	5'-CTATCTGACG ₅ TTCTCTGT-3'
47	5'-CTATCTGAC ₇ GTTCTCTGT-3'
64	5'-CTATCTAACGTTCTCTGT-3'
67	5'-CTATCTAACG ₁ TTCTCTGT-3'
22	5'-CTATCTGAmCGTTCTCTGT-3'
9	5'-CTATCTGUCGTTCTCTGT-3'
10	5'-CTATCTGUCGTTCTCTGT-3'
19	5'-CTATCTGUCG ₁ TTCTCTGT-3'
38	5'-CTATCTGUCG ₄ TTCTCTGT-3'
40	5'-CTATCTGUC ₄ GTTCTCTGT-3'

42	5'-CTATCTGUC ₃ GTTCTCTGT-3'
44	5'-CTATCTGUC ₆ GTTCTCTGT-3'
46	5'-CTATCTGUCG ₅ TTCTCTGT-3'
48	5'-CTATCTGUC ₇ GTTCTCTGT-3'
66	5'-CTATCTAUCGTTCTCTGT-3'
69	5'-CTATCTAUCG ₁ TTCTCTGT-3'
65	5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
68	5'-CTATCTAGCG ₁ TTCTCTGT-3'
23	5'-CTATCTGmACGTTCTCTGT-3'
24	5'-CTATCTGmAmCGTTCTCTGT-3'
25	5'-CTATCTGAC ₂ GTTCTCTGT-3'
27	5'-CTATCTGTC ₂ GTTCTCTGT-3'
33	5'-CTATCTGAC ₃ GTTCTCTGT-3'
35	5'-CTATCTGTC ₃ GTTCTCTGT-3'
26	5'-CTATCTGACG ₂ TTCTCTGT-3'
28	5'-CTATCTGTCG ₂ TTCTCTGT-3'
34	5'-CTATCTGACG ₃ TTCTCTGT-3'
36	5'-CTATCTGTCG ₃ TTCTCTGT-3'
49	5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
50	5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
6	5'-CTATCTGACGUUCTCTGT-3'
51	5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
21	3'-TCTTGCAGTCT-X ₂ -TCTGACGTTCT-3'
52	5'-CCTACTAGCGTX ₁ CTCATC-3'
53	5'-CCTACTAGCGX ₁ TCTCATC-3'
54	5'-CCTACTAG ₃ CGTTCTCATC-3'
55	5'-TCCATGA ₁ CGTTCCTGATGC-3'
56	5'-CTATCTGAC ₂ G ₂ TTCTCTGT-3'
57	5'-C ₂ T ₂ A ₂ T ₂ C ₂ T ₂ G ₂ A ₂ C ₂ G ₂ T ₂ T ₂ C ₂ T ₂ C ₂ T ₂ G ₂ T ₂ -3'
29	5'-CTATCTGAX ₁ GTTCTCTGT-3'
30	5'-CTATCTGACX ₁ TTCTCTGT-3'
31	5'-CTATCTGTX ₁ GTTCTCTGT-3'

32	5'-CTATCTGTCX ₁ TTCTCTGT-3'
61	5'-CTATCTAGCGTX ₁ CTCTGT-3'
62	5'-CTATCTAGCGX ₁ TCTCTGT-3'
63	5'-CTATCTAGCGX ₁ X ₁ CTCTGT-3'
58	5'-CTATCTGACGTX ₃ CTCTGT-3'
59	5'-CTATCTGACGX ₃ TCTCTGT-3'
60	5'-CTATCTGACGX ₃ X ₃ CTCTGT-3'
70	5'-CTATCTAGCGTX ₃ CTCTGT-3'
71	5'-CTATCTAGCGX ₃ TCTCTGT-3'
72	5'-CTATCTAGCGX ₃ X ₃ CTCTGT-3'
74	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
75	5'-CTATCTGACG ₁ UUCTCTGT-3'
76	5'-CCTACTAG ₆ CGTTCTCATC-3'
77	5'-TCCATGACGU ₁ TCCTGATGC-3'
78	5'-CTATCTGX ₂ CGTTCTCTGT-3'
79	5'-CTATCTX ₂ ACGTTCTCTGT-3'
80	5'-CTATCTU ₂ ACGTTCTCTGT-3'
81	5'-CTATCTGU ₂ CGTTCTCTGT-3'
82	5'-CTATCTGACGX ₂ TCTCTGT-3'
83	5'-CTATCTGACGTX ₂ CTCTGT-3'
84	5'-CTATCTGX ₃ CGTTCTCTGT-3'
85	5'-CTATCTX ₃ ACGTTCTCTGT-3'
86	(5'-TCTGACGTTCT) ₂ X ₂
87	(5'-TCTGACG ₁ TTCT) ₂ X ₂
88	(5'-TCTGACG ₄ TTCT) ₂ X ₂
89	(5'-TCTCTGACGTT) ₂ X ₂
90	5'-TCTGACG ₁ TTCT-X ₃ -TGACCGGTCA-3'
91	5'-CTATCTGTCGUUCTCTGT-3'
92	5'-CTATCTGTCG ₁ UUCTCTGT-3'
93	(5'-TCTGUCGTTCT) ₂ X ₂
94	(5'-TCTGUCG ₁ TTCT) ₂ X ₂
95	(5'-TCTGACG ₄ TTCT) ₂ X ₂

96	$(5'-TCTGACG_1TT)_2X_2$
97	$5'-TCTGACG_1TTCT-X_3-TCAACCACACA-3'$
98	$5'-CTATCTGACG_1TTCTCUGU-3'$
99	$5'-CTATCTGUCG_1TTCTCUGU-3'$
100	$(5'-UGUCG_1TTCT)X_2$
101	$(5'-UGACG_1TTCT)_2X_2$

G, A o U en negrita = 2'-OMe; T en negrita = 3'-OMe; A₁ = 3'-OMe; G₁ = 7-deaza-dG; m = P-Me; A₂, T₂, C₂, y G₂ = B-L-desoxi nucleósido; X₁ = abásico; X₂ = conector glicerol; X₃ = conector C3; C₃ y G₃ = 3'-desoxi-nucleósido; G₄ = araG; C₄ = araC; C₅ = 5-OH-dC; C₆ = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina; G₅ = N1-Me-dG; C₇ = N3-Me-dC; U₁ = 3'-OMe; U₂ = dU.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen cada uno de aproximadamente 6 a aproximadamente 35 residuos de nucleósidos, preferiblemente de aproximadamente 9 a aproximadamente 30 residuos de nucleósidos, más preferiblemente de aproximadamente 11 a aproximadamente 23 residuos de nucleósidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 18 residuos de nucleósidos.

Un compuesto IRO descrito en la presente memoria puede proporcionarse en una formulación farmacéutica que comprende el compuesto IRO y un vehículo fisiológicamente aceptable.

Un compuesto IRO descrito en la presente memoria es útil en métodos para inhibir o suprimir la inducción mediada por TLR de una respuesta inmune en un vertebrado, comprendiendo dichos métodos administrar al vertebrado el compuesto IRO. El vertebrado puede ser un mamífero. El compuesto IRO puede administrarse a un vertebrado que necesita supresión inmune.

Un compuesto IRO es capaz de suprimir una respuesta inmune basada en TLR a un ligando TLR o agonista de TLR adicional. Como se discute adicionalmente en los Ejemplos siguientes, la activación de una respuesta inmune basada en TLR por un agonista de TLR o ligando de TLR (por ejemplo, un oligonucleótido inmuno modulador) puede suprimirse/inhibirse por la administración simultánea, anterior o posterior de un compuesto IRO, y dicha supresión/inhibición puede mantenerse durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, días) después de la administración. Esta propiedad beneficiosa tiene una ventaja única para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, la aplicación de determinados agonistas de TLR en el curso del tratamiento de la enfermedad puede causar estimulación inmune no deseada que un compuesto IRO podría suprimir/inhibir. La administración del IRO simultáneamente, antes y/o después de la administración del agonista de TLR puede permitir beneficios terapéuticos del agonista de TLR a la vez que suprime/inhibe el o los efectos secundarios no deseados. Además, la pre-administración de un IRO podría prevenir una respuesta inmune (por ejemplo, reacción alérgica) frente a un pulso posterior o tardío por un agonista de TLR.

La administración de compuesto IRO puede ser por cualquier ruta adecuada, incluyendo, sin limitación, parenteral, administración mucosal, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, por pistola de genes, parche dérmico o en forma de gotas oculares o lavado bucal. La administración de las composiciones terapéuticas de compuesto IRO puede llevarse a cabo usando procedimientos conocidos a dosis y durante periodos de tiempo efectivos para reducir síntomas o marcadores suplenes de la enfermedad. Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica se administra preferiblemente a una dosificación suficiente para conseguir un nivel sanguíneo de compuesto IRO de aproximadamente 0,0001 micromolar a aproximadamente 10 micromolar. Para la administración localizada, pueden ser efectivas concentraciones mucho más bajas que éstas, y pueden tolerarse concentraciones mucho más altas. Preferiblemente, una dosificación total de compuesto IRO varía de aproximadamente 0,001 mg por paciente por día a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por día. Puede ser deseable administrar simultáneamente, o secuencialmente una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más de las composiciones terapéuticas descritas en la presente memoria a un individuo como un episodio de tratamiento único.

El compuesto IRO puede unirse opcionalmente a uno o más alérgenos y/o antígenos (propio o extraño), una proteína inmunogénica, tal como hemocianina de lapa (KLH), subunidad B de la toxina del cólera, o cualquier otra proteína vehicular inmunogénica. IRO también puede usarse en combinación con otros compuestos (por ejemplo, adyuvantes) incluyendo, sin limitación, agonistas de TLR (por ejemplo, agonistas de TLR2 y agonistas de TLR9), adyuvante incompleto de Freund, KLH, monofosforil lípido A (MPL), alúmina, y saponinas, incluyendo QS-21 e imiquimod, o combinaciones de éstos.

Estos métodos son útiles para estudios en modelos del sistema inmune. Los métodos también son útiles para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad humana o animal. Por ejemplo, los métodos son útiles para aplicaciones de vacuna pediátrica o veterinaria.

5 Un compuesto IRO descrito en la presente memoria es útil en métodos para tratar terapéuticamente a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, comprendiendo dichos métodos administrar al paciente el compuesto IRO. En varias realizaciones, la enfermedad o trastorno que se va a tratar es cáncer, un trastorno autoinmune, enfermedad infecciosa, inflamación de las vías aéreas, trastornos inflamatorios, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides, y priones. La administración se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente.

10 Un compuesto IRO descrito en la presente memoria es útil en métodos para prevenir una enfermedad o trastorno, comprendiendo dichos métodos administrar al paciente el compuesto IRO. En varias realizaciones, la enfermedad o trastorno que se va a prevenir es cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías aéreas, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides, y priones. La administración se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente.

15 El compuesto IRO puede administrarse en combinación con cualquier otro agente útil para tratar la enfermedad o afección que no disminuye el efecto inmuno modulador del compuesto IRO. El agente útil para tratar la enfermedad o afección incluye, pero no está limitado a, una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonista de TLR, antagonista de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN y/o adyuvantes para aumentar la especificidad o magnitud de la respuesta inmune, o moléculas co-estimuladoras tales como citoquinas, quimioquinas, ligandos de proteína, factores trans-activadores, péptidos y péptidos que comprenden aminoácidos modificados. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, se contempla que el compuesto IRO puede administrarse en combinación con uno o más compuestos quimioterapéuticos, agentes terapéuticos dirigidos y/o anticuerpo monoclonal. Alternativamente, el agente puede incluir vectores de ADN que codifican antígeno o alérgeno. En estas realizaciones, los compuestos IRO descritos en la presente memoria pueden actuar variadamente como adyuvantes y/o producir efectos inmuno moduladores directos.

20 Se pretende que los ejemplos siguientes ilustren adicionalmente determinadas realizaciones ejemplares de la invención. Los ligandos de TLR representativos se muestran en los ejemplos siguientes, pero no limitan los ligandos frente a los que los IRO descritos en la presente memoria actúan como antagonistas.

30 Ejemplo 1:

Síntesis de oligonucleótidos que contienen restos inmuno reguladores

Todos los IRO se sintetizaron según procedimientos estándar (véase, por ejemplo, Publicación de Patente U.S. No. 20040097719).

35 Los oligonucleótidos se sintetizaron en una escala 1 μ M usando un sintetizador automatizado de ADN (Expedite 8909; PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.), según procedimientos estándar de síntesis lineal o síntesis paralela (véanse, por ejemplo, las FIGS. 5 y 6 de la Publicación de Patente U.S. No. 20040097719).

40 Las desoxiribonucleótido fosforoamiditas se obtuvieron de (Aldrich-Sigma, St Louis, Mo). 1',2'-didesoxiribosa fosforamidita, propil-1-fosforamidita, 2-desoxiuridina fosforamidita, 1,3-bis-[5-(4,4'-dimetoxitritil)pentilamidil]-2-propanol fosforamidita y metil fosfonamidita se obtuvieron de Glen Research (Sterling, Va.). .beta.-L-2'-desoxiribonucleósido fosforamidita, .alfa.-2'-desoxiribonucleósido fosforamidita, mono-DMT-glicerol fosforamidita y di-DMT-glicerol fosforamidita se obtuvieron de ChemGenes (Willmington, Mass.). (4-Aminobutil)-1,3-propanodiol fosforamidita se obtuvo de Clontech (Palo Alto, Calif.). Arabinocitidina fosforamidita, arabinoguanosina, arabinotimidina y arabinouridina se obtuvieron de Reliable Pharmaceutical (St. Louis, Mo.). Arabinoguanosina fosforamidita, arabinotimidina fosforamidita y arabinouridina fosforamidita se sintetizaron en Idera Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, Mass.) (Noronha et al. (2000) Biochem., 39:7050-7062).

50 Todas las nucleósido fosforoamiditas se caracterizaron por espectros de RMN de ^{31}P y ^1H . Los nucleósidos modificados se incorporaron en sitios específicos usando ciclos de acoplamiento normales. Después de la síntesis, los oligonucleótidos se desprotegeron usando hidróxido de amonio concentrado y se purificaron por HPLC de fase reversa, seguido de diálisis. Los

oligonucleótidos purificados como forma de sal de sodio se liofilizaron antes del uso. La pureza se ensayó por CGE y MALDI-TOF MS.

Ejemplo 2

Inhibición de la estimulación de TLR9

5 Las células HEK293 que expresan de forma estable TLR9 (Invivogen) se transfectaron transitoriamente con el gen informador, Seap, (Invivogen) durante 6 hr. Las células se trataron con 0,5 µg/ml de 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (secuencia de CpG de ratón; IMO/SEQ ID NO 1; 0 dosis) solo y varias concentraciones de IRO 5 ó 6 durante 18 hr. La expresión del gen informador dependiente de TLR9 se determinó según el protocolo del fabricante (Invivogen) y los resultados se expresan como % de actividad de oligonucleótido estimulante TLR9 (100%). Los resultados se muestran en la Figura 1. Estos resultados demuestran que IRO 5 inhibió la actividad agonista de TLR9 de IMO.

Ejemplo 3

IRO inhibe específicamente la estimulación de TLR9

15 Las células HEK293 que expresan de forma estable TLR9 o TLR3 (Invivogen) se transfectaron transitoriamente con el gen informador, Seap, (Invivogen) durante 6 hr. Las células se trataron con 0,5 mg/ml IMO1 (0,5 µg/ml), IRO 5 (2,0 µg/ml), R848 (5,0 µg/ml), o poli(I), poli(C) (0,5 µg/ml) y combinaciones de IMO+IRO, R848+IRO, o poli(I), poli(C) + IRO durante 18 hr. La expresión del gen informador dependiente de TLR9 o TLR3 se determinó según el protocolo del fabricante (Invivogen) y los resultados se expresan como veces de cambio en la actividad de NF-κB. Los resultados se muestran en la Figura 2. Estos resultados demuestran que IRO 5 inhibe la actividad del agonista de TLR9 pero el agonista de TLR3, y más generalmente que los IRO pueden inhibir selectivamente la activación de TLR.

Ejemplo 4

Inhibición dependiente de la dosis por IRO

25 Se inyectó a ratones C57BL/6 subcutáneamente (s.c.) en la axila izquierda 0,25 mg/kg de 5'-TCTGACG₁TTCT-X-TCTTG₁CAGTCT-5' estimulante (IMO/SEQ ID NO 3; G₁ = 7-deazaG, X = glicerol) y diferentes dosis de IRO 5 en la axila derecha. Se tomaron muestras de suero a las 2 horas después de la inyección de IMO3 estimulante y se determinaron los niveles de IL-12 por ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 3. Estos resultados demuestran inhibición dependiente de la dosis por IRO.

Ejemplo 5

Inhibición dependiente del tiempo por IRO

30 Se inyectó a ratones C57BL/6 s.c. en la axila izquierda 0,25 mg/kg de IMO 3 estimulante y 1 mg/kg de IRO 5 ó 5'-CTATCTCACCTTCTCTGT-5' (control no CpG no estimulante; oligo/SEQ ID NO 4) en la axila derecha bien una hora antes (-1h) o al mismo tiempo que IMO estimulante (0h). Se tomaron muestras de suero a las 2 horas después de la inyección de IMO estimulante y se determinaron los niveles de IL-12 por ELISA. Los resultados en la Figura 4A demuestran una disminución en los niveles séricos de IL-12 después de la administración de IRO 5 o (oligo 4) bien una hora antes (-1h) o al mismo tiempo que IMO estimulante (0h).

40 Se inyectó a ratones C57BL/6 s.c. en la axila izquierda 0,25 mg/kg de IMO 3 estimulante y administración intranasal de 10 mg/kg de IRO 102 al mismo tiempo que IMO estimulante (0h). Se tomaron muestras de suero a las 2 horas después de la inyección de IMO estimulante y se determinaron los niveles de IL-12 por ELISA. Los resultados en la Figura 4B demuestran una disminución en los niveles séricos de IL-12 después de la administración intranasal de IRO 102 al mismo tiempo que s.c. de IMO.

45 Se inyectó a ratones C57BL/6 s.c. en la axila izquierda 0,25 mg/kg de IMO 3 estimulante y 2 mg/kg ó 10 mg/kg de IRO 17, 99, 102 s.c. en la axila derecha bien una hora antes (-1h), veinticuatro horas antes (-24) o setenta y dos horas antes (-72) que el IMO estimulante (0h). Se tomaron muestras de suero a las 2 horas después de la inyección de IMO estimulante y se determinaron los niveles de IL-12 por ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 4C-D. Estos resultados demuestran que la pre-administración y la administración simultánea de IRO fue capaz de inhibir el agonista de TLR9, y más generalmente que los IRO pueden inhibir la activación de TLR.

Ejemplo 6

Inhibición de la estimulación de TLR9

50 Se inyectó a ratones C57BL/6 s.c. en la axila izquierda 0,25 mg/kg de IMO 3 estimulante y 1 mg/kg de IRO 21 u oligo 4 control en la axila derecha bien una hora antes (-1h) o al mismo tiempo que IMO estimulante (0h). Se tomaron muestras de suero a las 2 horas después de la inyección de IMO estimulante y se determinaron los niveles de IL-12 por ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 5A y 5B. Estos resultados demuestran que un

oligonucleótido CpG unido en sus extremos 5' muestra propiedades inhibitoras, y más generalmente que los oligonucleótidos CpG inmuno estimuladores unidos en sus extremos 5' pueden inhibir la activación de TLR.

Ejemplo 7

Inhibición de TLR9 en cultivos celulares humanos

5 Se incubaron pDC y PBMC humanas con 10 µg de 5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3' (secuencia CpG humana; IMO/SEQ ID NO 2) y 40 µg de IRO10 durante 24 hr. Los resultados se muestran en la Figura 6. Estos resultados demuestran que un IRO inhibió la actividad agonista de TLR9 en cultivos celulares humanos, y más generalmente que los IRO pueden inhibir los TLR en células humanas.

Ejemplo 8

10 **Efecto de IRO en la respuesta inmune Th2 inducida por OVA**

Los resultados se muestran en la Figura 7. Estos resultados demuestran que un IRO no tiene un efecto en las respuestas inmunes Th2 inducidas por ovoalbúmina ("OVA"), mientras los compuestos IMO reducen la respuesta Th2 inducida por OVA y causan la producción de citoquinas Th1.

Ejemplo 9

15 **Inhibición por IRO de los efectos de IMO en respuestas inmunes Th1 y Th2**

Los resultados se muestran en la Figura 8. Estos resultados demuestran que un IRO puede revertir las propiedades inhibitoras Th2 y puede inhibir las respuestas inmunes Th1 inducidas por IMO.

Ejemplo 10

Respuestas de anticuerpo a IMO e IRO

20 Se inmunizaron ratones con HBsAg en presencia y ausencia de IMO 1 e IRO 5 ó 6 y combinaciones de éstos en la semana 0 y semana 2 y se midieron las respuestas de anticuerpo en la semana 4. Los resultados se muestran en la Figura 9 y demuestran reducción por un IRO en una respuesta inmune IgG2A inducida por IMO.

Ejemplo 11

Inhibición de oligonucleótidos inmuno estimuladores

25 Las células HEK293 que expresan de forma estable TLR9 (Invivogen) se transfectaron transitoriamente con el gen informador, Seap, (Invivogen) durante 6 hr. Las células se trataron con 0,25 µg/ml de IMO solo (IMO1; 0 dosis) y varias concentraciones de IRO durante 18 hr. La expresión del gen informador dependiente de TLR9 se determinó según el protocolo del fabricante (Invivogen) y los resultados se expresan como % de inhibición de la actividad del oligonucleótido inmuno estimulador. Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6 siguientes. Estos resultados demuestran que los IRO inhibieron la actividad de IMO.

30

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del oligonucleótido inmuno estimulador 1. La concentración de IMO1 fue 0,25 µg/ml y la concentración de IRO fue 2 µg/ml

IRO #	Secuencia	% Inhibición
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	52.5%
25	5'-CTATCTGAC₂GTTCTCTGT-3'	17.5%
26	5'-CTATCTGACG₂TTCTCTGT-3'	15.3%
33	5'-CTATCTGAC₃GTTCTCTGT-3'	38.1%
39	5'-CTATCTGAC₄GTTCTCTGT-3'	52.8%
41	5'-CTATCTGAC₅GTTCTCTGT-3'	42.6%
43	5'-CTATCTGAC₆GTTCTCTGT-3'	23.6%

35 Los IRO que contienen varias modificaciones inhiben la activación de NF-κB de IMO en células HEK293 que expresan TLR9, y más generalmente los IRO que contienen varias modificaciones pueden inhibir la activación de NF-κB de IMO.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del oligonucleótido inmuno estimulador 1. La concentración de IMO1 fue 0,25 µg/ml y la concentración de IRO fue 3 µg/ml

IRO #	Secuencia	% Inhibición
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	76.5%
17	5'-CTATCTGACG ₁ TTCTCTGT-3'	76.4%
34	5'-CTATCTGACG ₃ TTCTCTGT-3'	32.2%
37.	5'-CTATCTGACG ₄ TTCTCTGT-3'	78.3%

Los IRO que contienen varias modificaciones inhiben la activación de NF-κB de IMO en células HEK293 que expresan TLR9, y más generalmente los IRO que contienen varias modificaciones pueden inhibir la activación de NF-κB de IMO.

5 **Ejemplo 12**

Inhibición dependiente del tiempo por IRO

Se inyectó a ratones C57BL/6 subcutáneamente (s.c.) en la axila izquierda 0,25 mg/kg a 10 mg/kg de agonista de TLR y 1 mg/kg a 20 mg/kg de IRO 5, 17 ó 37 ó 5'-TCCTGGCGGGGAAGT-3' (poli dG control; oligo/SEQ ID NO 49) en la axila derecha a una hora (-1h) o hasta cuarenta y ocho horas (-48) antes o al mismo tiempo que el agonista de TLR (0h). Se tomaron muestras de suero a las 2 horas después de la inyección de IMO estimulante y se determinaron los niveles de IL-12 por ELISA. Los resultados se muestran en las Tablas 7-22 siguientes. Estos resultados demuestran que tanto la pre-administración como la administración simultánea de un IRO inhibe los agonistas de TLR9, y que las actividades inhibitoras de un IRO fueron efectivas incluso cuando se administraron 48 horas antes de la administración del IMO. Más generalmente, estos resultados demuestran que la pre-administración y la administración simultánea de un IRO pueden inhibir ambas los agonistas de TLR y que las actividades inhibitoras de un IRO pueden observarse incluso cuando se administran muchas horas antes de la administración del agonista de TLR.

Tabla 7. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por IMO 3 por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO	IRO	IRO+IMO			
		Tiempo de la administración de IMO después de la administración de IRO			
solo	solo	0 hr	1 hr	3 hr	6 hr
(0,25 mg/kg)	(2 mg/kg)				
21,1±1,84	0,81±0	0,59±0,48	1,54±0,17	6,53±0,81	10,41±0,48

20 IRO 5 inhibió la producción de IL-12 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 6 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos resultados demuestran que un IRO puede inhibir la activación de TLR y la producción de IL-12 inducida por IMO cuando IMO se administra o está inicialmente presente horas después de la administración de IRO.

Tabla 8. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por IMO 3 por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO	IRO	IRO+IMO			
		Tiempo de la administración de IMO después de la administración de IRO			
solo	solo	0 hr	1 hr	3 hr	6 hr
(0,25 mg/kg)	(20 mg/kg)				
33,8±3,8	0,73±0,7	0,87±1,19	1,52±2,01	2,2±2,4	1,84±3,18

25 IRO 5 inhibió potentemente la producción de IL-12 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 6 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos resultados demuestran que un IRO puede inhibir sustancialmente la activación de TLR y la producción de IL-12 inducida por IMO cuando IMO se administra o está inicialmente presente horas después de la administración de IRO.

Tabla 9. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por IMO 3 por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO	IRO	IRO+IMO			
		Tiempo de la administración de IMO después de la administración de IRO			
solo	solo	6 hr	14 hr	24 hr	48 hr
(0,25 mg/kg)	(20 mg/kg)				
25,8±2,6	0,17±0	0,04±0	1,25±0	1,8±0,29	2,9±0,1

IRO 5 inhibió potentemente la producción de IL-12 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 48 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos resultados demuestran que un IRO puede inhibir sustancialmente la activación de TLR y la producción de IL-12 inducida por IMO cuando IMO se administra o está inicialmente presente horas después de la administración de IRO.

5

Tabla 10. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por IMO 3 por IRO 17 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO solo (0,25 mg/kg)	IRO solo (2 mg/kg)	IRO+IMO		
		Tiempo de la administración de IMO después de la administración de IRO		
		3 hr	6 hr	24 hr
6,6±0,64	0,67±0,02	1,01±0,06	1,25±0,29	4,29±1,12

5 IRO 17 inhibió la producción de IL-12 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 6 hr o más después de la administración de IRO. Más generalmente, estos resultados demuestran que un IRO puede inhibir la activación de TLR y la producción de IL-12 inducida por IMO cuando IMO se administra o está inicialmente presente horas después de la administración de IRO.

Tabla 11. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por IMO 3 por IRO 37 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO solo (0,25 mg/kg)	IRO solo (2 mg/kg)	IRO+IMO
		Tiempo de la administración de IMO después de la administración de IRO
		3 hr
6,6±0,64	0,67±0,02	0,91±0,03

10 IRO 37 inhibió la producción de IL-12 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 3 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos resultados demuestran que un IRO puede inhibir la activación de TLR y la producción de IL-12 inducida por IMO cuando IMO se administra o está inicialmente presente horas después de la administración de IRO.

Tabla 12. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por IMO 3 por poli dG control (5'-TCCTGGAGGGGAAGT-3' (SEQ ID NO 73)) in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO solo (0,25 mg/kg)	IRO solo (10 mg/kg)	Control+IMO		
		Tiempo de la administración de IMO después de la administración de Control		
		3 hr	6 hr	24 hr
18,24±0,22	1,47±0	1,38±0,18	10,03±0,37	16,97±0,52

15 Un compuesto poli dG que se sabe que muestra actividad antagonista de TLR9 inhibió la producción de IL-12 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 6 hr después de la administración de IRO. Comparados con los datos para IRO (por ejemplo, IRO 5 en la Tabla 7), los efectos antagonistas del oligo poli dG control son a corto plazo y transitorios.

Tabla 13. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por IMO 3 por poli dG control (5'-TCCTGGCGGGGAAGT-3' (SEQ ID NO 49)) in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO solo (0,25 mg/kg)	IRO solo (10 mg/kg)	Control+IMO		
		Tiempo de la administración de IMO después de la administración de Control		
		3 hr	6 hr	24 hr
18,24±0,22	1,2±0	0,81±0,06	10,1±0,09	19,02±1,6

20 Un compuesto poli dG que se sabe que muestra actividad antagonista de TLR9 inhibió la producción de IL-12 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 6 hr después de la administración de IRO. Comparados con los datos para IRO (por ejemplo, IRO 5 en la Tabla 7), los efectos antagonistas del oligo poli dG control son a corto plazo y transitorios.

Tabla 14. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por R848, un agonista de TLR7 y TLR8, por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

R848	IRO	IRO+R848
solo	solo	Tiempo de la administración de R848 después de la administración de IRO
(0,5 mg/kg)	(2 mg/kg)	1 hr
128±2,9	1,48±0,17	56,0±3,3

5 IRO 5 muestra una inhibición transitoria lenta de la producción de IL-12 inducida por R848 cuando se inyectó hasta 1 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos datos demuestran que un IRO puede inhibir la actividad de los TLR intracelulares.

Tabla 15. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por Polil:PoliC, un agonista de TLR3, por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

Polil.PoliC	IRO	IRO+Polil.PoliC
solo	solo	Tiempo de la administración de Polil.PoliC después de la administración de IRO
(10 mg/kg)	(2 mg/kg)	1 hr
8,7±0,6	1,48±0,17	2,1±0,07

10 IRO 5 muestra una inhibición transitoria lenta de la producción de IL-12 inducida por Polil.PoliC cuando se inyectó hasta 1 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos datos demuestran que un IRO puede inhibir la activación de TLR y la producción de IL-12 inducida por Polil.PoliC.

Tabla 16. Inhibición de MCP-1 (ng/ml±SD) inducida por IMO por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO	IRO	IRO+IMO
solo	solo	Tiempo de la administración de R848 después de la administración de IRO
(0,25 mg/kg)	(2 mg/kg)	1 hr
2,2±0,25	NT	0,28±0,73

15 IRO 5 muestra una inhibición potente de la producción de MCP-1 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 1 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos datos demuestran que un IRO puede inhibir la activación de TLR y la producción de MCP-1 inducida por IMO.

Tabla 17. Inhibición de MCP-1 (ng/ml±SD) inducida por R848, un agonista de TLR7 y TLR8, por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

R848	IRO	IRO+R848
solo	solo	Tiempo de la administración de R848 después de la administración de IRO
(0,5 mg/kg)	(2 mg/kg)	1 hr
11±1,4		7,2±1,7

20 IRO 5 muestra una inhibición transitoria lenta de la producción de MCP-1 inducida por R848 cuando se inyectó hasta 1 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos datos demuestran que un IRO puede inhibir la activación de TLR y la producción de MCP-1 a través de TLR intracelulares.

Tabla 18. Inhibición de MCP-1 (ng/ml±SD) inducida por Polil.PoliC, un agonista de TLR3, por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

Polil.PoliC	IRO	IRO+Polil.PoliC		
solo	solo	Tiempo de la administración de Polil.PoliC después de la administración de IRO		
(10 mg/kg)	(2 mg/kg)	1 hr		
4,6±0,6		1,80±0,57		

5 IRO 5 muestra una inhibición transitoria lenta de la producción de MCP-1 inducida por Polil.PoliC cuando se inyectó hasta 1 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos datos demuestran que un IRO puede inhibir la activación de TLR y la producción de MCP-1 de un Polil.PoliC.

Tabla 19. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por IMO 3 por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO	IRO	IRO+IMO		
solo	solo	Tiempo de la administración de IMO después de la administración de IRO		
(0,25 mg/kg)	(20 mg/kg)	2 días	5 días	7 días
33,2±8,7	NT	14,5±5,17	17,19±11,2	28,0±7,75

10 IRO 5 muestra una inhibición potente de la producción de IL-12 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 7 días después de la administración de IRO. Más generalmente, estos datos demuestran que un IRO puede inhibir la activación de TLR y la producción de IL-12 inducida por IMO en mamíferos.

Tabla 20. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por IMO por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

IMO	IRO	IRO+IMO		
solo	solo	Tiempo de la administración de IMO después de la administración de IRO		
(0,25 mg/kg)	(10 mg/kg)	72 hr		
53,39±2,71	2,03±2,03	28,72±0,79		

15 IRO 5 muestra una inhibición potente de la producción de IL-12 inducida por IMO cuando se inyectó hasta 72 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos datos demuestran que un IRO puede inhibir la activación de TLR y la producción de IL-12 inducida por IMO en mamíferos horas después de que se administra el IRO.

Tabla 21. Inhibición de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por R848, un agonista de TLR7 y TLR8, por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

R848	IRO	IRO+R848		
solo	solo	Tiempo de la administración de R848 después de la administración de IRO		
(0,125 mg/kg)	(10 mg/kg)	72 hr		
96,5±3,4	2,03±2,03	13,64±0,47		

20 IRO 5 muestra una inhibición de la producción de IL-12 inducida por R848 cuando se inyectó hasta 72 hr después de la administración de IRO. Más generalmente, estos datos demuestran que un IRO puede inhibir la actividad de un agonista de los TLR intracelulares y la producción de IL-12 inducida por un agonista de TLR en mamíferos horas después de que se administra el IRO.

Tabla 22. Inhibición de de IL-12 (ng/ml±SD) inducida por Polil:PoliC, un agonista de TLR3, por IRO 5 in vivo, ratones C57BL/6 (n = 3)

Polil.PoliC	IRO	IRO+Polil.PoliC
solo	solo	Tiempo de la administración de Polil.PoliC después de la administración de IRO
(10 mg/kg)	(10 mg/kg)	72 hr
28,42±1,2	2,03±2,03	26,61±5,97

5 IRO 5 no muestra inhibición de la producción de IL-12 inducida por Polil.PoliC cuando se inyectó 72 hr después de la administración de IRO.

Ejemplo 13

Actividades de bloqueo a corto plazo y largo plazo de IRO frente a agonista de TLR

10 Para evaluar la actividad a corto plazo y la selectividad de los compuestos IRO, se inyectó a los ratones subcutáneamente 2 mg/kg de IRO en su flanco derecho una hora (-1h) antes de la administración subcutánea de un agonista de TLR en el flanco izquierdo. Se tomaron muestras de suero 2 horas después de la administración del agonista de TLR y se analizaron usando kits Luminex de múltiples citoquinas/quimioquinas obtenidos de Biosource (Camarillo, CA). Se siguieron los protocolos recomendados por el fabricante. Los valores de citoquina/quimioquina se determinaron de los valores medios que se encontraban en la curva estándar determinada en un instrumento Luminex 100. El análisis Luminex se realizó usando software STarStation (Applied Cytometry Systems, Sacramento, CA). Se usaron los agonistas representativos siguientes a la dosis indicada: 5'-TCTGACG₁TTCT-X-TCTTG₁CAGTCT-5' (agonista de TLR9; 0,25 mg/kg, G₁ = 7-deaza-dG), R848 (agonista de TLR7/8, 0,1 mg/kg), Loxoribina (agonista de TLR7, 100 mg/kg), Flagelina (agonista de TLR5, 0,25 mg/kg), LPS (agonista de TLR4, 0,25 mg/kg), Polil.PoliC (agonista de TLR3, 20 mg/kg), y MALP-2 (agonista de TLR2, 0,5 mg/kg). Los resultados se muestran en las Figuras 10-12. Estos datos demuestran que los IRO pueden inhibir la producción de citoquina/quimioquina en respuesta a agonistas de TLR. El efecto es mayor para los TLR intracelulares (por ejemplo, TLR3, TLR7, TLR8, y TLR9) comparado con los TLR extracelulares (por ejemplo, TLR2, TLR4, y TLR5).

25 Para evaluar la actividad a largo plazo y la selectividad de los compuestos IRO, se inyectó a los ratones subcutáneamente 10 mg/kg de IRO en su flanco derecho setenta y dos horas (-72h) antes de la administración subcutánea de un agonista de TLR (como se ha descrito anteriormente) en el flanco izquierdo. Se tomaron muestras de suero 2 horas después de la administración del agonista de TLR y se analizaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en las Figuras 13-15. Estos resultados demuestran que la administración pre-administración de un IRO fue capaz de inhibir el agonista de TLR, y que las actividades inhibitoras de IRO fueron efectivas cuando se administró 72 horas antes de la administración del agonista.

Ejemplo 14

30 **Actividades de compuestos IRO en modelo de lupus en ratón**

Se cultivaron células B de bazo de ratón purificadas de ratones de tipo salvaje (BALB/c) y propensos a lupus (MRL-lpr) con 1 µg/ml de IRO-17 en presencia o ausencia de 0,3 µg/ml de IMO, ó 0,3 µg/ml de IMO o medio solo durante 72 h. Los resultados se muestran en la Figura 16. Estos resultados demuestran que la administración de IRO fue capaz de inhibir la proliferación de linfocitos B.

35 Se cultivaron células B de bazo de ratón purificadas de ratones de tipo salvaje (BALB/c) y propensos a lupus (MRL-lpr) con 1 µg/ml de IRO-17 en presencia o ausencia de 0,3 µg/ml de IMO, ó 0,3 µg/ml de IMO o medio solo durante 72 h. Los resultados se muestran en la Figura 17A. Estos resultados demuestran que la administración de IRO fue capaz de inhibir la producción de IL-6 por linfocitos B de ratón. Se cultivaron células B de bazo de ratón purificadas de ratones de tipo salvaje (BALB/c) y propensos a lupus (NZBW) con 0,01 a 10 µg/ml de IRO-17 en presencia de 1 µg/ml de IMO, o solo con 10 µg/ml de IRO-17, 1 µg/ml de IMO o medio durante 72 h. Los resultados se muestran en las Figuras 17B y 17C. Estos resultados demuestran que la administración de un IRO fue capaz de inhibir la producción de IL-6 e IL-12 por células de bazo de ratón.

45 Se inyectó a ratones propensos a lupus MRL-1pr una vez a la semana s.c. dosis de 100 µg de IRO-5 desde la semana 9 a 18, y 21 a 23 o IRO-17 empezando desde la semana 10 a 15, 100 µg tres veces a la semana en las semanas 18-21 y 40 mg tres veces a la semana en las semanas 22 a 24. Se recogieron sangre y orina cada semana antes de la inyección de IRO. Los ratones se sacrificaron en la semana 24. Se determinaron los niveles séricos de IgG1 anti-ADN por ELISA. Los resultados se muestran en las Figuras 18A a 18E. Estos resultados demuestran que IRO 5 e IRO17 pueden inhibir la producción de IgG1 e IgG2A y proteína en orina en ratones propensos a lupus.

Se dosificaron ratones propensos a lupus NZBW con 300 µg de IRO-5, s.c. una vez cada dos semanas empezando en la semana 6. Se determinaron los niveles séricos de IgG2a anti-ADN en las semanas 16 y 20. Los resultados se muestran en la Figura 19. Estos resultados demuestran que la administración de IRO inhibe IgG2a anti-ADN sérica en ratones NZBW.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Idera Pharmaceuticals, Inc.	
5	<120> COMPUESTOS OLIGONUCLEÓTIDOS INMUNO REGULADORES (IRO) PARA MODULAR RESPUESTA INMUNE BASADA EN EL RECEPTOR SEMEJANTE A TOLL	
	<130> 351-32 T1	
10	<140> <141>	
	<150> 60/825.440 <151> 13-09-2006	
15	<150> 60/784.243 <151> 21-03-2006	
	<150> 60/726.034 <151> 12-10-2005	
20	<160> 101	
	<170> PatentIn Ver. 3.3	
25	<210> 1 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 1	
	ctatctgacg ttctctgt	18
35	<210> 2 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 2	
45	ctatctgtcg ttctctgt	18
	<210> 3 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
55	<220> <221> base_modificada <222> (7) <223> 7-deaza-G	
60	<400> 3	
	tctgaenttc t	11

5	<p><210> 4 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p> <p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
10	<p><400> 4</p> <p>ctatctcacc ttctctgt</p>	18
15	<p><210> 5 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p> <p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
20	<p><220> <221> base_modificada <222> (7)..(8) <223> 2'-OMe</p>	
25	<p><400> 5</p> <p>ctatctgacg ttctctgt</p>	18
30	<p><210> 6 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p> <p><220> <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético</p>	
35	<p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
40	<p><220> <221> base_modificada <222> (11)..(12) <223> 2'-OMe</p>	
45	<p><400> 6</p> <p>ctatctgacg uuctctgt</p>	18
50	<p><210> 7 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p> <p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
55	<p><220> <221> base_modificada <222> (8) <223> 2'-OMe</p>	
60	<p><400> 7</p> <p>ctatctgacg ttctctgt</p>	18

	<210> 8	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
10	tgaccggtca	10
	<210> 9	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
25	<222> (8)	
	<223> 2'-OMe	
	<400> 9	
30	ctatctgucg ttctctgt	18
	<210> 10	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético	
40	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
45	<222> (7)..(8)	
	<223> 2'-OMe	
	<400> 10	
50	ctatctgucg ttctctgt	18
	<210> 11	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 11	
60	tcaaccacac a	11
	<210> 12	
	<211> 15	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 12	
	tcctggcggg gaagt	15
10	<210> 13	
	<400> 13	
	000	
	<210> 14	
	<400> 14	
15	000	
	<210> 15	
	<400> 15	
	000	
	<210> 16	
20	<400> 16	
	000	
	<210> 17	
	<211> 18	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
30	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (7)..(8)	
	<223> 2'-OMe	
35	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (10)	
	<223> 7-deaza-dG	
40	<400> 17	
	ctatctgacn ttctctgt	18
	<210> 18	
45	<400> 18	
	000	
	<210> 19	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético	
55	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
60	<222> (7)..(8)	
	<223> 2'-OMe	
	<220>	
	<221> base_modificada	

	<222> (10)	
	<223> 7-deaza-dG	
	<400> 19	
5	ctatctgucn ttctctgt	18
	<210> 20	
	<400> 20	
	000	
10	<210> 21	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 21	
20	tctgacgttc t	11
	<210> 22	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 22	
30	cgttctctgt	10
	<210> 23	
	<211> 11	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
40	<400> 23	
	acgttctctg t	11
	<210> 24	
	<211> 10	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
50	<400> 24	
	cgttctctgt	10
	<210> 25	
55	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	

5	<p><220> <221> base_modificada <222> (9) <223> B-L-desoxi nucleósido-C</p> <p><400> 25</p> <p>ctatctgang ttctctgt</p>	18
10	<p><210> 26 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
15	<p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
20	<p><220> <221> base_modificada <222> (10) <223> B-L-desoxi nucleósido-G</p> <p><400> 26</p> <p>ctatctgacn ttctctgt</p>	18
25	<p><210> 27 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
30	<p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
35	<p><220> <221> base_modificada <222> (9) <223> B-L-desoxi nucleósido-C</p> <p><400> 27</p> <p>ctatctgtng ttctctgt</p>	18
40	<p><210> 28 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
45	<p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
50	<p><220> <221> base_modificada <222> (10) <223> B-L-desoxi nucleósido-G</p> <p><400> 28</p> <p>ctatctgtcn ttctctgt</p>	18
55	<p><210> 29 <211> 8 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
60	<p><220></p>	

	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 29	
5	ctatctga	8
	<210> 30	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 30	
15	ctatctgac	9
	<210> 31	
	<211> 8	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
25	<400> 31	
	ctatctgt	8
	<210> 32	
	<211> 9	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
35	<400> 32	
	ctatctgtc	9
	<210> 33	
40	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (9)	
50	<223> 3'-desoxi nucleósido-C	
	<400> 33	
	ctatctgang ttctctgt	18
55	<210> 34	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	

	<220>		
	<221> base_modificada		
	<222> (10)		
5	<223> 3'-desoxi nucleósido-G		
	<400> 34		
	ctatctgacn ttctctgt		18
10	<210> 35		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético		
	<220>		
	<221> base_modificada		
20	<222> (9)		
	<223> 3'-desoxi nucleósido-C		
	<400> 35		
	ctatctgtng ttctctgt		18
25	<210> 36		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético		
	<220>		
35	<221> base_modificada		
	<222> (10)		
	<223> 3'-desoxi nucleósido-G		
	<400> 36		
40	ctatctgtcn ttctctgt		18
	<210> 37		
	<211> 18		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético		
50	<220>		
	<221> base_modificada		
	<222> (7).(8)		
	<223> 2'-OMe		
55	<220>		
	<221> base_modificada		
	<222> (10)		
	<223> araG		
60	<400> 37		
	ctatctgacn ttctctgt		18

<210> 38
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético
 <220>
 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 15 <223> 2'-OMe
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)
 20 <223> araG
 <400> 38
ctatctgucn ttctctgt **18**
 25 <210> 39
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe
 <220>
 <221> base_modificada
 40 <222> (9)
 <223> araC
 <400> 39
ctatctgang ttctctgt **18**
 45 <210> 40
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético
 <220>
 55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 60 <223> 2'-OMe
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)

<223> araC

<400> 40

ctatctgung ttctctgt **18**

5

<210> 41
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe

20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)
 <223> 5-OH-dC

<400> 41

ctatctgang ttctctgt **18**

25

<210> 42
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Descripción De Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

35

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)
 <223> 5-OH-dC

<400> 42

ctatctgung ttctctgt **18**

50

<210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)
 5 <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina-C
 <400> 43

ctatctgang ttctctgt

18

10 <210> 44
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción De Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)
 <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina-C

30 <400> 44

ctatctgung ttctctgt

18

35 <210> 45
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 45 <223> 2'-OMe

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)
 50 <223> N1-Me-dG

<400> 45

ctatctgacn ttctctgt

18

55 <210> 46
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

<220>

	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
5	<222> (7)..(8)	
	<223> 2'-OMe	
	<220>	
	<221> base_modificada	
10	<222> (10)	
	<223> N1-Me-dG	
	<400> 46	
	ctatctgucn ttctctgt	18
15	<210> 47	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
25	<221> base_modificada	
	<222> (7)..(8)	
	<223> 2'-OMe	
	<220>	
30	<221> base_modificada	
	<222> (9)	
	<223> N3-Me-dC	
	<400> 47	
35	ctatctgang ttctctgt	18
	<210> 48	
	<211> 18	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
50	<222> (7)..(8)	
	<223> 2'-OMe	
	<220>	
	<221> base_modificada	
55	<222> (9)	
	<223> N3-Me-dC	
	<400> 48	
	ctatctgung ttctctgt	18
60	<210> 49	
	<211> 18	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (12)	
10	<223> 2'-OMe	
	<400> 49	
	ctatctagcg ttctctgt	18
15	<210> 50	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
25	<222> (11)	
	<223> 2'-OMe	
	<400> 50	
	ctatctagcg ttctctgt	18
30	<210> 51	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
40	<221> base_modificada	
	<222> (11)..(12)	
	<223> 2'-OMe	
	<400> 51	
45	ctatctagcg ttctctgt	18
	<210> 52	
	<211> 11	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
55	<400> 52	
	cctactagcg t	11
	<210> 53	
	<211> 10	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 53	10
5	cctactagcg	
	<210> 54	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
15	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (8)	
	<223> 3'-desoxi-nucleósido-G	
20	<400> 54	18
	cctactancg ttctcatc	
	<210> 55	
	<211> 19	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
30	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (7)	
	<223> 3'-OMe-A	
35	<400> 55	19
	tccatgncgt tcctgatgc	
	<210> 56	
	<211> 18	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
45	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (9)	
	<223> B-L-desoxi-nucleósido-C	
50	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (10)	
	<223> B-L-desoxi nucleósido-G	
55	<400> 56	18
	ctatctgann ttctctgt	
	<210> 57	
60	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
- 5 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)
<223> B-L-desoxi nucleósido-C
- 10 <220>
<221> base_modificada
<222> (2)
<223> B-L-desoxi nucleósido-T
- 15 <220>
<221> base_modificada
<222> (3)
<223> B-L-desoxi nucleósido-A
- 20 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)
<223> B-L-desoxi nucleósido-T
- 25 <220>
<221> base_modificada
<222> (5)
<223> B-L-desoxi nucleósido-C
- 30 <220>
<221> base_modificada
<222> (6)
<223> B-L-desoxi nucleósido-T
- 35 <220>
<221> base_modificada
<222> (7)
<223> B-L-desoxi nucleósido-G
- 40 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)
<223> B-L-desoxi nucleósido-A
- 45 <220>
<221> base_modificada
<222> (9)
<223> B-L-desoxi nucleósido-C
- 50 <220>
<221> base_modificada
<222> (10)
<223> B-L-desoxi nucleósido-G
- 55 <220>
<221> base_modificada
<222> (11)
<223> B-L-desoxi nucleósido-T
- 60 <220>
<221> base_modificada
<222> (12)
<223> B-L-desoxi nucleósido-T
- 65 <220>
<221> base_modificada

	<222> (13)		
	<223> B-L-desoxi nucleósido-C		
	<220>		
5	<221> base_modificada		
	<222> (14)		
	<223> B-L-desoxi nucleósido-T		
	<220>		
10	<221> base_modificada		
	<222> (15)		
	<223> B-L-desoxi nucleósido-C		
	<220>		
15	<221> base_modificada		
	<222> (16)		
	<223> B-L-desoxi nucleósido-T		
	<220>		
20	<221> base_modificada		
	<222> (17)		
	<223> B-L-desoxi nucleósido-G		
	<220>		
25	<221> base_modificada		
	<222> (18)		
	<223> B-L-desoxi nucleósido-T		
	<400> 57		
30	nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnn		18
	<210> 58		
	<211> 11		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético		
40	<400> 58		
	ctatctgacg t		11
	<210> 59		
	<211> 10		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético		
50	<400> 59		
	ctatctgacg		10
	<210> 60		
55	<211> 10		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
60	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético		
	<400> 60		

	ctatctgacg	10
5	<210> 61 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético <400> 61	
	ctatctagcg t	11
15	<210> 62 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético <400> 62	
	ctatctagcg	10
25	<210> 63 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético <400> 63	
	ctatctagcg	10
35	<210> 64 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
45	<220> <221> base_modificada <222> (7)..(8) <223> 2'-OMe <400> 64	
50	ctatctaacg ttctctgt	18
55	<210> 65 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe
 5 <400> 65
ctatctagcg ttctctgt **18**

<210> 66
 10 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 15 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe

25 <400> 66
ctatctaucg ttctctgt **18**

<210> 67
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)
 <223> 7-deaza-dG

45 <400> 67
ctatctaacn ttctctgt **18**

<210> 68
 50 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 60 <223> 2'-OMe

<220>
 <221> base_modificada

	<222> (10)	
	<223> 7-deaza-dG	
	<400> 68	
5	ctatctagcn ttctctgt	18
	<210> 69	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
20	<222> (7)..(8)	
	<223> 2'-OMe	
	<220>	
	<221> base_modificada	
25	<222> (10)	
	<223> 7-deaza-dG	
	<400> 69	
30	ctatctaucn ttctctgt	18
	<210> 70	
	<211> 11	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 70	
40	ctatctagcg t	11
	<210> 71	
	<211> 10	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
50	<400> 71	
	ctatctagcg	10
	<210> 72	
	<211> 10	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
60	<400> 72	

ctatctagcg

10

5 <210> 73
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
 <400> 73

tcctggaggg gaagt

15

15 <210> 74
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)
 <223> 2'-OMe

<400> 74

ctatctgacg ttctctgt

18

30 <210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)
 <223> 7-deaza-dG

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(12)
 <223> 2'-OMe

<400> 75

ctatctgacn uuctctgt

18

55 <210> 76
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

5	<p><220> <221> base_modificada <222> (8) <223> 3'-OMe-G <400> 76</p> <p>cctactancg ttctcatc</p>	18
10	<p><210> 77 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p> <p><220> <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético</p> <p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
20	<p><220> <221> base_modificada <222> (10) <223> 3'-OMe-U</p> <p><400> 77</p> <p>tccatgacgn tcctgatgc</p>	19
30	<p><210> 78 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p> <p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
35	<p><400> 78</p> <p>cgttctctgt</p>	10
40	<p><210> 79 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p> <p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
45	<p><400> 79</p> <p>acgttctctg t</p>	11
50	<p><210> 80 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p> <p><220> <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético</p> <p><220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético</p>	
55	<p><220></p>	
60	<p><220></p>	

	<221> base_modificada <222> (7) <223> dU	
5	<400> 80	
	ctatctnacg ttctctgt	18
	<210> 81 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10		
	<220> <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético	
15		
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
20		
	<220> <221> base_modificada <222> (8) <223> dU	
	<400> 81	
25	ctatctgncg ttctctgt	18
	<210> 82 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30		
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
35	<400> 82	
	ctatctgacg	10
	<210> 83 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40		
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
45	<400> 83	
	ctatctgacg t	11
	<210> 84 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50		
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
55	<400> 84	
	cgttctctgt	10
60	<210> 85	

	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 85	
	acgttctctg t	11
10	<210> 86	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
20	<221> base_modificada	
	<222> (4)..(5)	
	<223> 2'-OMe	
	<400> 86	
	tctgacgttc t	11
25	<210> 87	
	<211> 11	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
35	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (4)..(5)	
	<223> 2'-OMe	
40	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (7)	
	<223> 7-deaza-dG	
45	<400> 87	
	tctgacnttc t	11
	<210> 88	
	<211> 11	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
55	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (4)..(5)	
	<223> 2'-OMe	
60	<220>	

	<221> base_modificada	
	<222> (7)	
	<223> araG	
5	<400> 88	
	tctgacnttc t	11
	<210> 89	
	<211> 11	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (6)..(7)	
	<223> 2'-OMe	
20	<400> 89	
	tctctgacgt t	11
	<210> 90	
25	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
35	<222> (4)..(5)	
	<223> 2'-OMe	
	<220>	
	<221> base_modificada	
40	<222> (7)	
	<223> 7-deaza-dG	
	<400> 90	
	tctgacnttc t	11
45	<210> 91	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético	
	<220>	
55	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (11)..(12)	
	<223> 2'-OMe	
60	<400> 91	

18

ctatctgtcg uuctctgt

5 <210> 92
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)
 <223> 7-deaza-dG

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(12)
 <223> 2'-OMe

<400> 92

18

ctatctgtcn uuctctgt

25 <210> 93
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-OMe

<400> 93

11

tctgucgttc t

45 <210> 94
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-OMe

<220>

	<221> base_modificada	
	<222> (7)	
	<223> 7-deaza-dG	
5	<400> 94	11
	tctgucnttc t	
	<210> 95	
	<211> 11	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (4)..(5)	
20	<223> 2'-OMe	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (7)	
	<223> araG	
25	<400> 95	11
	tctgacnttc t	
	<210> 96	
30	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (4)..(5)	
40	<223> 2'-OMe	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (7)	
45	<223> 7-deaza-dG	
	<400> 96	9
	tctgacntt	
	<210> 97	
50	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
60	<222> (4)..(5)	
	<223> 2'-OMe	

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)
 <223> 7-deaza-dG
 <400> 97

tctgacnttc t

11

10 <210> 98
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)
 <223> 7-deaza-dG

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(18)
 <223> 2'-OMe

35 <400> 98

ctatctgacn ttctcugu

18

40 <210> 99
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-OMe

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)
 <223> 7-deaza-dG

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(18)
 <223> 2'-OMe

<400> 99

ctatctgucn ttctcugu

18

- 5 <210> 100
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
- 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-OMe
- 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)
 <223> 7-deaza-dG
- 25 <400> 100

ugucnttct

9

- 30 <210> 101
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de Molécula Combinada ADN/ARN: oligonucleótido sintético
- 35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
- 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-OMe
- 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)
 <223> 7-deaza-dG
- <400> 101

ugacnttct

9

50

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de TLR que comprende un compuesto oligonucleótido inmuno regulador (IRO) que es un antagonista para uno o más TLR que tiene la estructura



5 en la que:

CG es un resto de oligonucleótido que es CpG, C*pG, C*pG* o CpG*, en el que C es citosina, C* es un derivado de nucleótido de pirimidina que es un nucleótido de pirimidina que tiene una base que no es citosina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, G es guanosina, y G* es un derivado de nucleótido de purina que es un nucleótido de purina que tiene una base que no es guanina o adenina y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido;

N₁-N₃, en cada aparición, es independientemente i) un nucleótido, ii) un derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, o iii) una unión no nucleotídica, siempre que al menos uno de N₁-N₃ es un derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido;

N¹-N³, en cada aparición, es independientemente i) un nucleótido, o ii) un derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido;

N_m y N^m, en cada aparición, es independientemente un nucleótido, derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, o unión no nucleotídica;

y además siempre que el compuesto contiene menos de 3 nucleótidos de guanosina consecutivos;

en el que el resto de oligonucleótido sería inmuno estimulador si no fuera por el derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido;

en el que m es un número de 0 a aproximadamente 30;

en el que el compuesto oligonucleótido inmuno regulador no es un oligonucleótido antisentido;

para uso en el tratamiento terapéutico o prevención de una enfermedad mediada por un TLR en un mamífero, en el que la enfermedad es cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías aéreas, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos cutáneos, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno.

2. El antagonista de TLR para el uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad está mediada por TLR7, TLR8 y/o TLR9.

3. El antagonista de TLR para el uso según la reivindicación 1 ó 2 que comprende un compuesto oligonucleótido inmuno regulador (IRO) que es un antagonista para uno o más TLR que comprende al menos dos oligonucleótidos unidos por un conector no nucleotídico en sus extremos 3' en el que el conector no nucleotídico puede estar unido al hidroxilo 3', azúcar funcionalizado o nucleobase funcionalizada, en el que al menos un oligonucleótido tiene la estructura



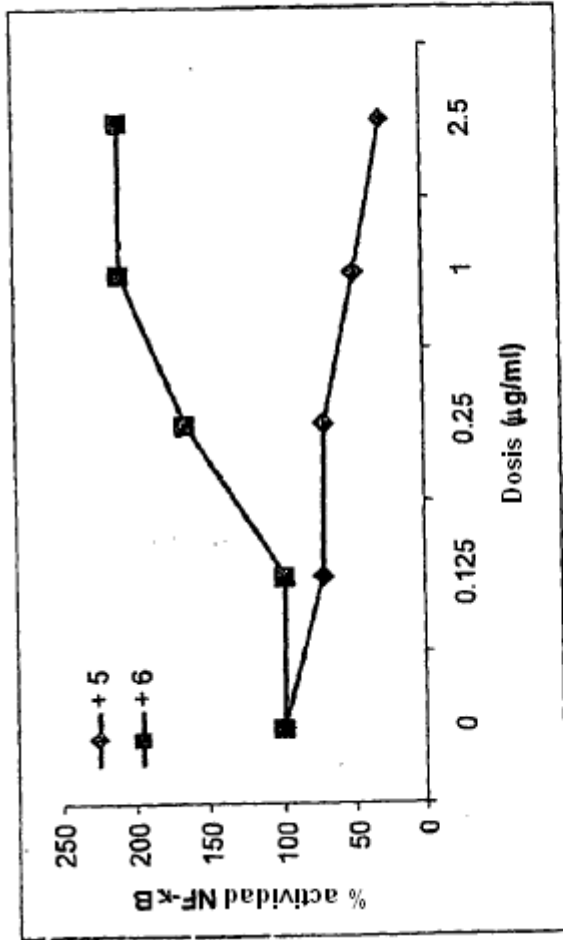
en la que:

CG es un resto de oligonucleótido que es CpG, C*pG, C*pG* o CpG*, en el que C es citosina, C* es un derivado de nucleótido de pirimidina que es un nucleótido de pirimidina que tiene una base que no es citosina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, G es guanosina, y G* es un derivado de nucleótido de purina que es un nucleótido de purina que tiene una base que no es guanina o adenina y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido;

- 5 N_1-N_3 , en cada aparición, es independientemente i) un nucleótido, ii) un derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, o iii) una unión no nucleotídica, siempre que al menos uno de N_1-N_3 es un derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido;
- N^1-N^3 , en cada aparición, es independientemente i) un nucleótido, o ii) un derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido;
- 10 N_m y N^m , en cada aparición, es independientemente un nucleótido, derivado de nucleótido que es un nucleótido de purina o pirimidina que tiene una base que no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y/o un azúcar que no es ribosa ó 2'-desoxiribosa y puede estar presente en el núcleo de un oligonucleótido, o unión no nucleotídica;
- y además siempre que el compuesto contiene menos de 3 nucleótidos de guanosina consecutivos;
- en el que el resto de oligonucleótido sería inmuno estimulador si no fuera por el derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido;
- 15 en el que m es un número de 0 a aproximadamente 30, y
- en el que los al menos dos oligonucleótidos no son oligonucleótidos antisentido.
4. El antagonista de TLR para el uso según la reivindicación 3, en el que N_1 es un derivado de nucleótido o unión no nucleotídica que suprime la actividad del resto de oligonucleótido.
- 20 5. El antagonista de TLR para el uso según la reivindicación 3 ó 4, que suprime la actividad de TLR7, TLR8 y/o TLR9.
6. El antagonista de TLR para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que el conector no nucleotídico que une los al menos dos oligonucleótidos se selecciona del grupo que consiste en Glicerol (1,2,3-Propanotriol), 1,2,4, Butanotriol, 2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, 2-(hidroximetil)1,4-butanodiol, 1,3,5-Pentanotriol, 1,1,1-Tris(hidroximetil)etano, 1,1,1-Tris(hidroximetil)nitrometano, 1,1,1-Tris(hidroximetil)propano, 1,2,6-Hexanotriol, 25 3-Metil-1,3,5-pentanotriol, 1,2,3-Heptanotriol, 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida, cis-1,3,5-Ciclohexanotriol, Cis-1,3,5-Tri(hidroximetil)ciclohexano, 3,5-Di(hidroximetil)fenol, 1,3,5-Trihidroxil-benceno, 3,5-Di(hidroximetil)benceno, 1,3-Di(hidroxietoxi)-2-hidroxil-propano, 1,3-Di(hidroxipropoxi)-2-hidroxil-propano, 2-Desoxi-D-ribosa, 1,2,4-Trihidroxil-benceno, D-Galactosal, 1,6-anhidro- β -D-Glucosa, ácido 1,3,5-Tris(2-hidroxietil)-Cianúrico, ácido gálico, 3,5,7-Trihidroxiflavona, 4,6-Nitropirgalol, Etilen glicol, 30 1,3-Propanodiol, 1,2-Propanodiol, 1,4-Butanodiol, 1,3-Butanodiol, 2,3-Butanodiol, 1,4-Butanodiol, 1,5-Pentanodiol, 2,4-Pentanodiol, 1,6-Hexanodiol, 1,2-Hexanodiol, 1,5-Hexanodiol, 2,5-Hexanodiol, 1,7-Heptanodiol, 1,8-Octanodiol, 1,2-Octanodiol, 1,9-Nonanodiol, 1,12-Dodecanodiol, Trietilen glicol, Tetraetilen glicol, 2-(1-Aminopropil)-1,3-propanodiol, ó 1,2-Didesoxiribosa.
7. El antagonista de TLR para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que el conector no nucleotídico que une los al menos dos oligonucleótidos es Glicerol (1,2,3-Propanotriol).
- 35 8. El antagonista de TLR para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el derivado de nucleótido de pirimidina es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi- β -D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, 2'-desoxi-2'-arabinocitidina sustituida, 2'-O-arabinocitidina sustituida, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkuil-citidina, 2'-desoxi-4-thiouridina.
- 40 9. El antagonista de TLR para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el derivado de nucleótido de purina es 2'-desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, 2'-desoxi-2'-arabinoguanosina sustituida, 2'-O-arabinoguanosina-sustituida, 2'-desoxiinosina.
10. El antagonista de TLR para el uso según la reivindicación 3, en el que uno de los oligonucleótidos tiene la secuencia seleccionada de TCTGACGTTCT (SEQ ID NO: 86), TCTGACG₁TTCT (SEQ ID NO: 87), 45 TCTGACG₄TTCT (SEQ ID NO: 88), TCTCTGACGTT (SEQ ID NO: 89), TCTGUCGTTCT (SEQ ID NO: 93), TCTGUCG₁TTCT (SEQ ID NO: 94), TCTGACG₁TT (SEQ ID NO: 96), UGUCG₁TTCT (SEQ ID NO: 100) y UGACG₁TTCT (SEQ ID NO: 101), en la que A, G o U subrayada está sustituida en la posición 2' con OMe, G₁ es 7-deaza-dG, G₄ es araG, y X₂ es glicerol.
11. El antagonista de TLR para el uso según la reivindicación 3 seleccionado de
- 50 (i) 5'-(TCTGACGTTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 86-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 86-5'),
- (ii) 5'-(TCTGACG₁TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 87-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 87-5'),
- (iii) 5'-(TCTGACG₄TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 88-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 88-5'),

- (iv) 5'-(TCTCTGACGTT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 89-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 89-5'),
- (v) 5'-(TCTGUCGTTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 93-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 93-5'),
- (vi) 5'-(TCTGUCG₁TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 94-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 94-5'),
- (vii) 5'-(TCTGACG₁TT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 96-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 96-5'),
- 5 (viii) 5'-(UGUCG₁TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 100-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 100-5'),
- (ix) 5'-(UGACG₁TTCT)₂X₂(5'-SEQ ID NO: 101-3'-X₂-3'-SEQ ID NO: 101-5'), y
- (x) un compuesto bajo (i) a (ix) unido a una proteína vehicular inmunogénica,
- en el que A, G o U subrayada está sustituida en la posición 2' con OMe, G₁ es 7-deaza-dG, G₄ es araG, y X₂ es glicerol.
- 10 12. El antagonista de TLR para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que es para administración en combinación con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas de TLR, antagonistas de TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o moléculas co-estimuladoras.
- 15 13. El antagonista de TLR para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que es para administración parenteral, administración por administración mucosal, administración oral, administración sublingual, administración transdérmica, administración tópica, administración por inhalación, administración intranasal, administración por aerosol, administración intraocular, administración intratraqueal, administración intrarectal, administración vaginal, administración por pistola de genes, administración por parche dérmico o administración en forma de gotas oculares o lavado bucal.

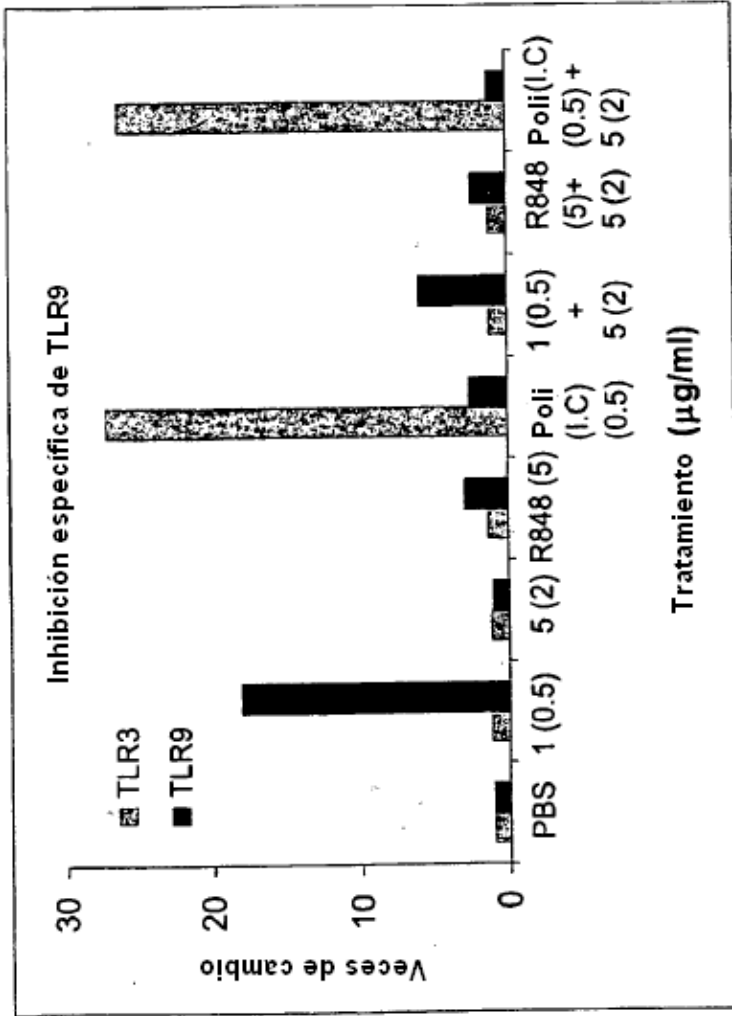
20



- 1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
- 5 5'-CTATCT**G**ACGTTCTCTGT-3'
- 6 5'-CTATCTGACG**U**UCTCTGT-3'

Los nucleótidos mostrados en negra son 2'-O-metilribonucleótidos

Figura 1



Los nucleótidos en negra son 2'-0-metilribonucleótidos

Figura 2

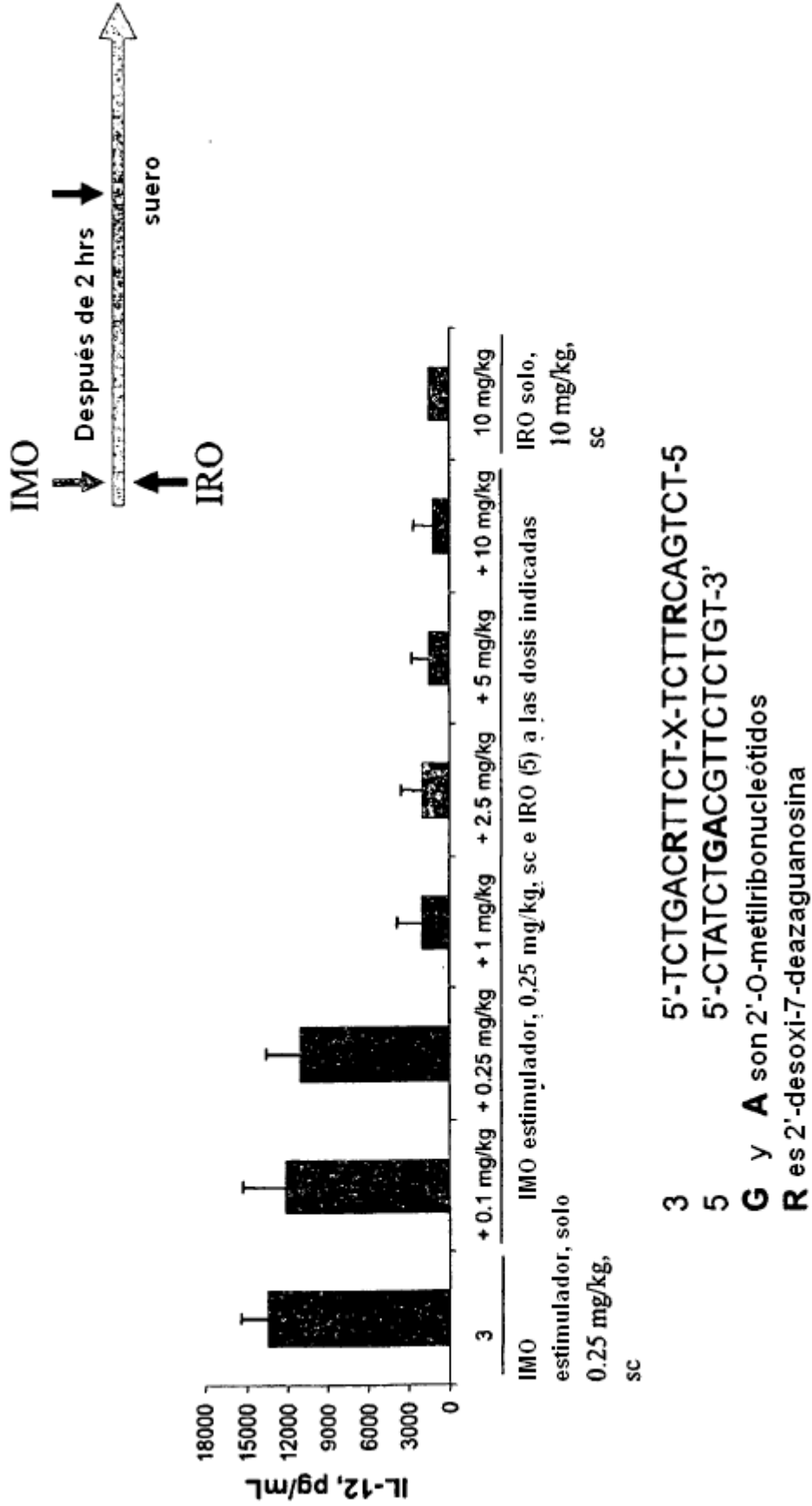
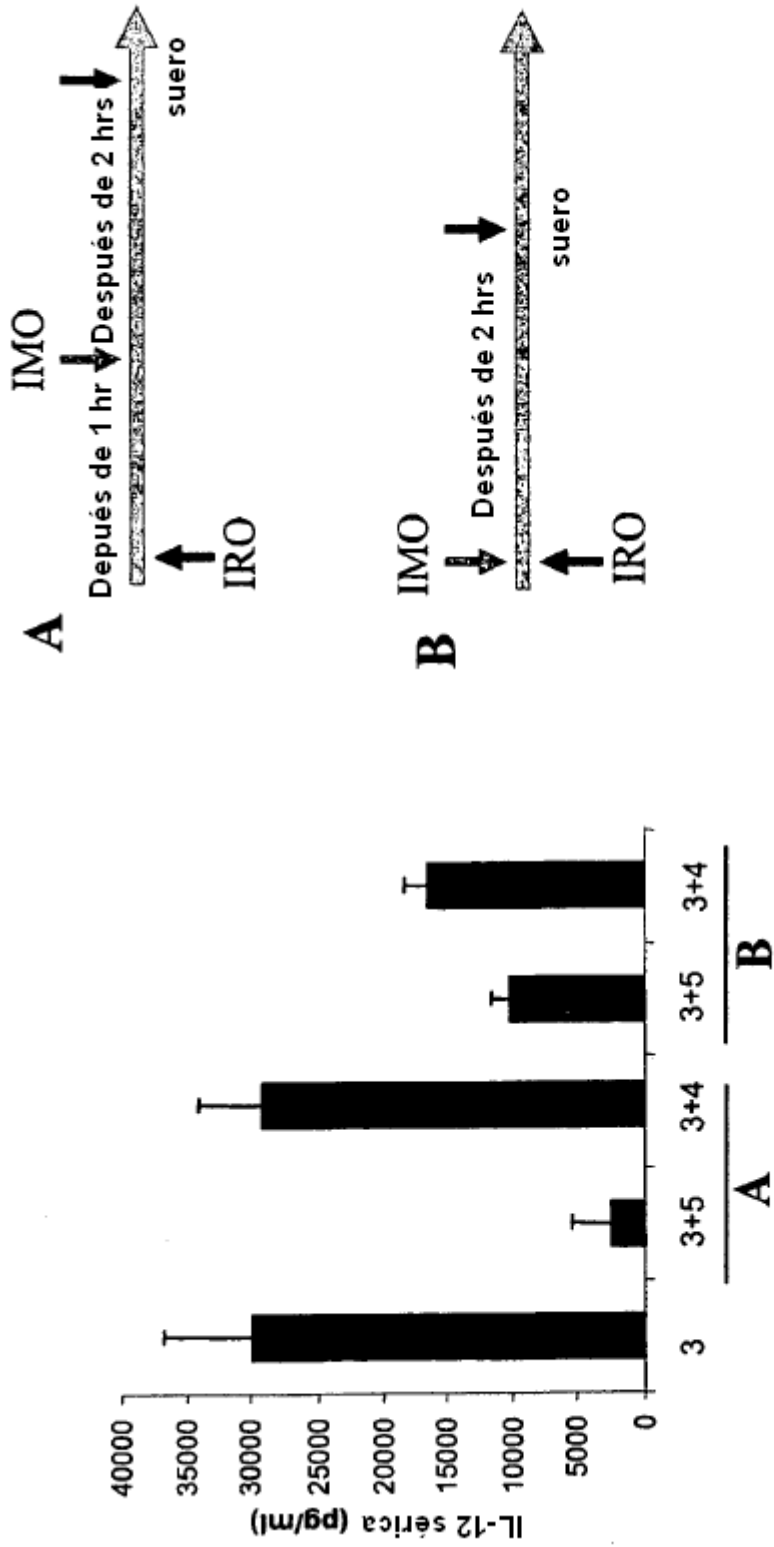


Figura 3



- 3 5'-TCTGACRTTCT-X-TCTTRCAGTCT-5
- 4 5'-CTATCTCACCTTCTCTGT-3'
- 5 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'

G y **A** son 2'-O-metilribonucleótidos
R es 2'-desoxi-7-deazaguanosina

Figura 4A

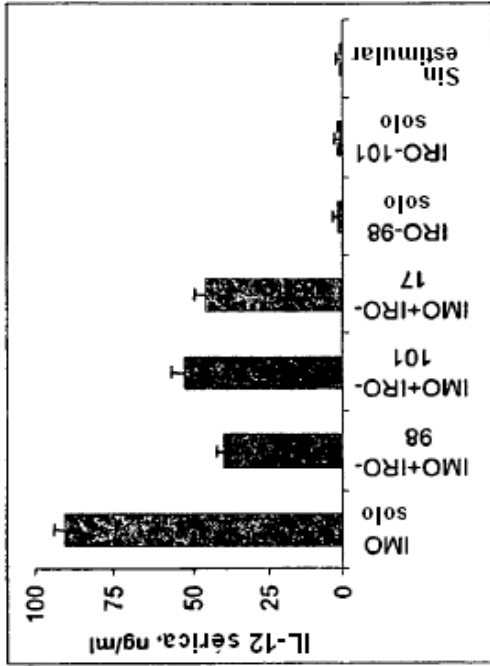


Figura 4C

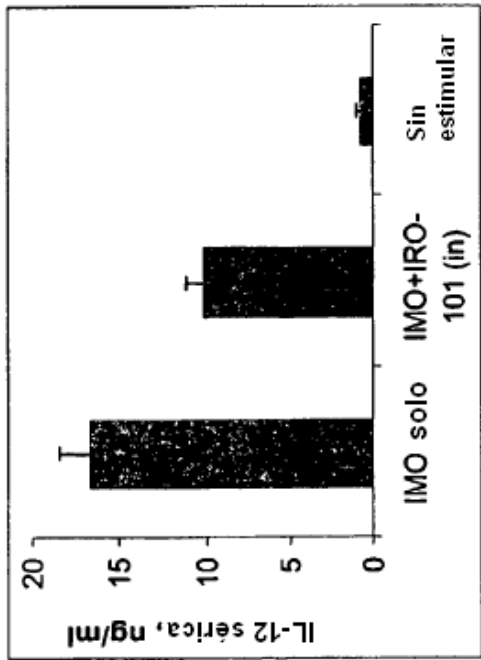


Figura 4B

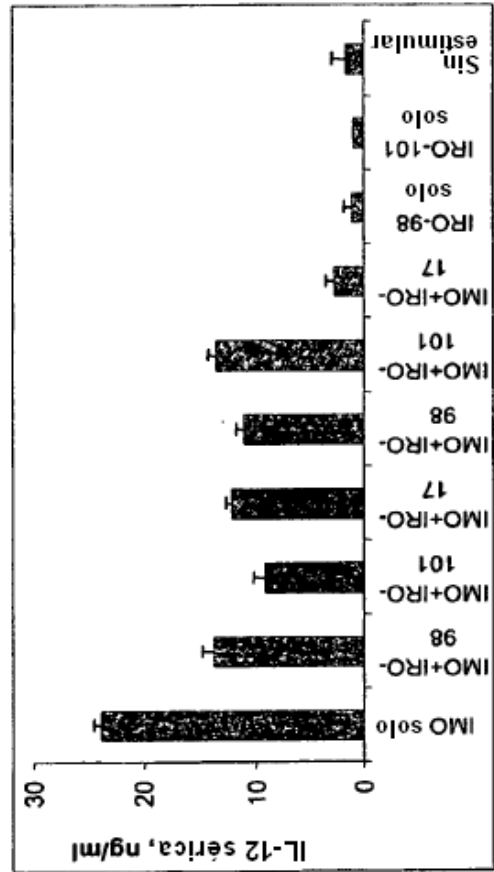


Figura 4D

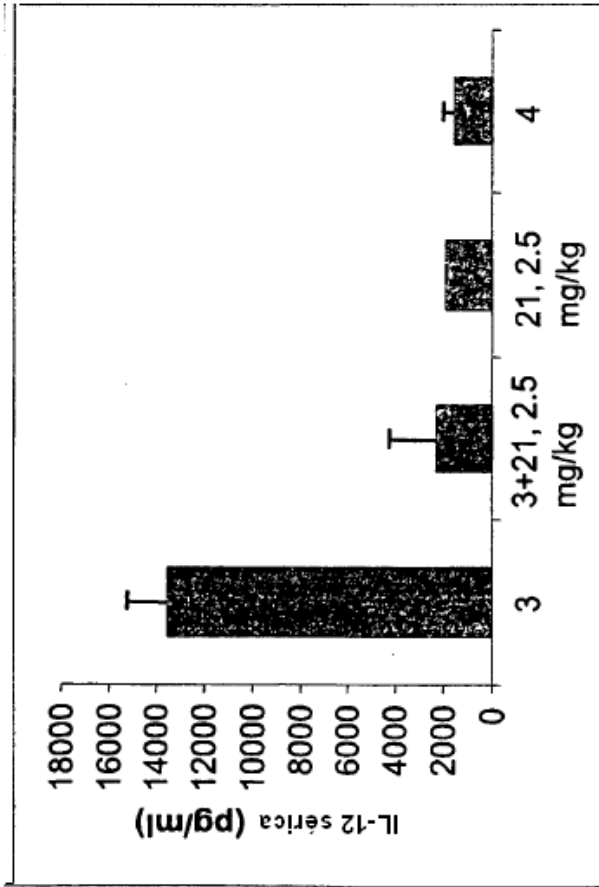


Figura 5A

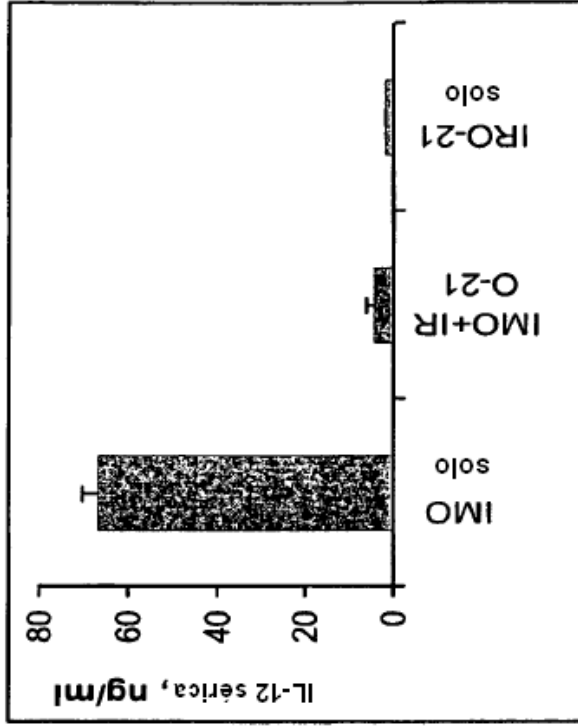
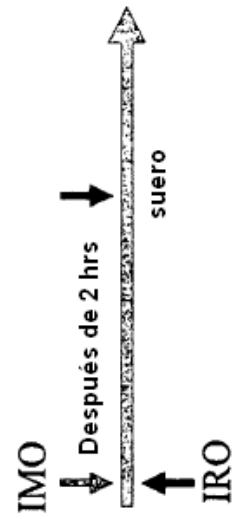
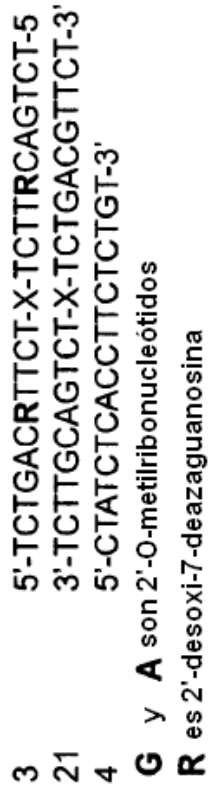
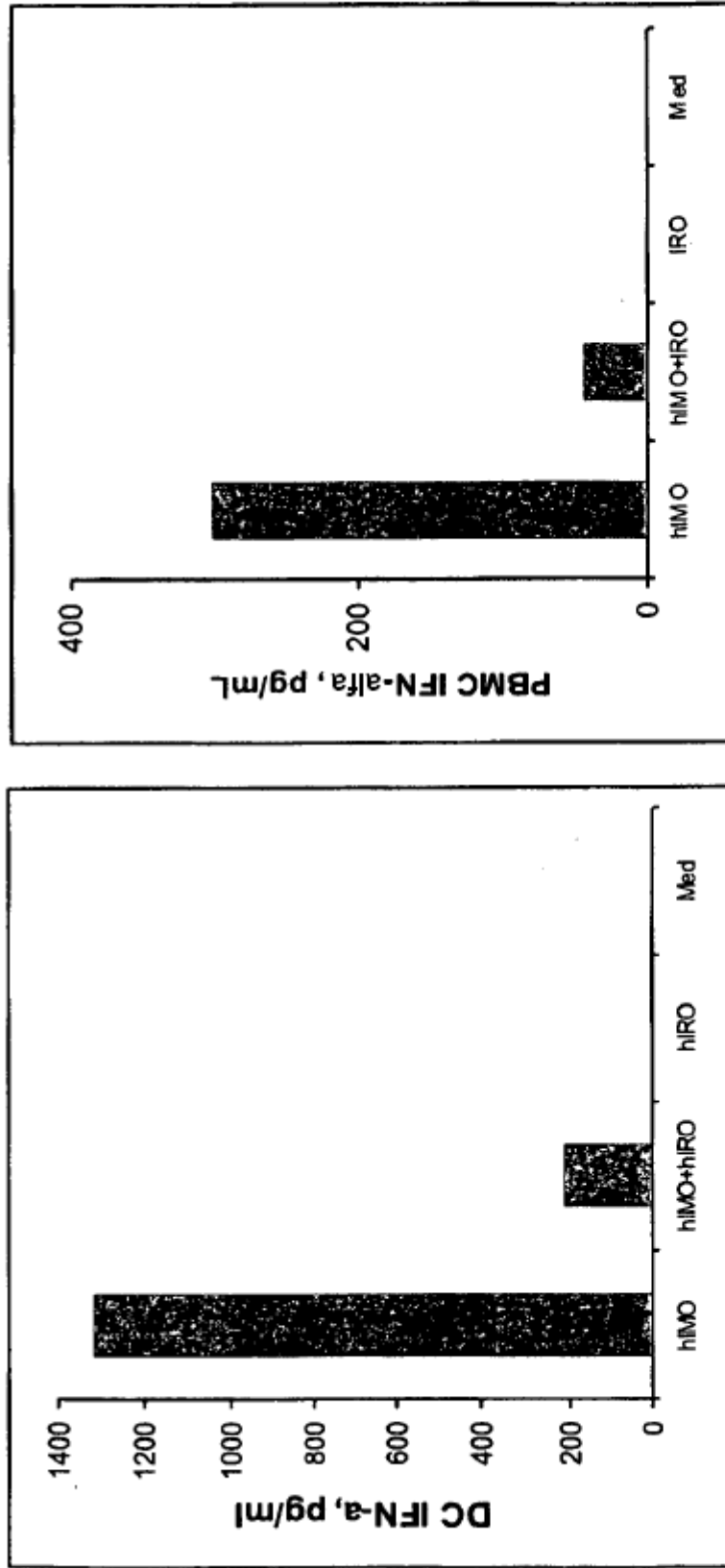


Figura 5B





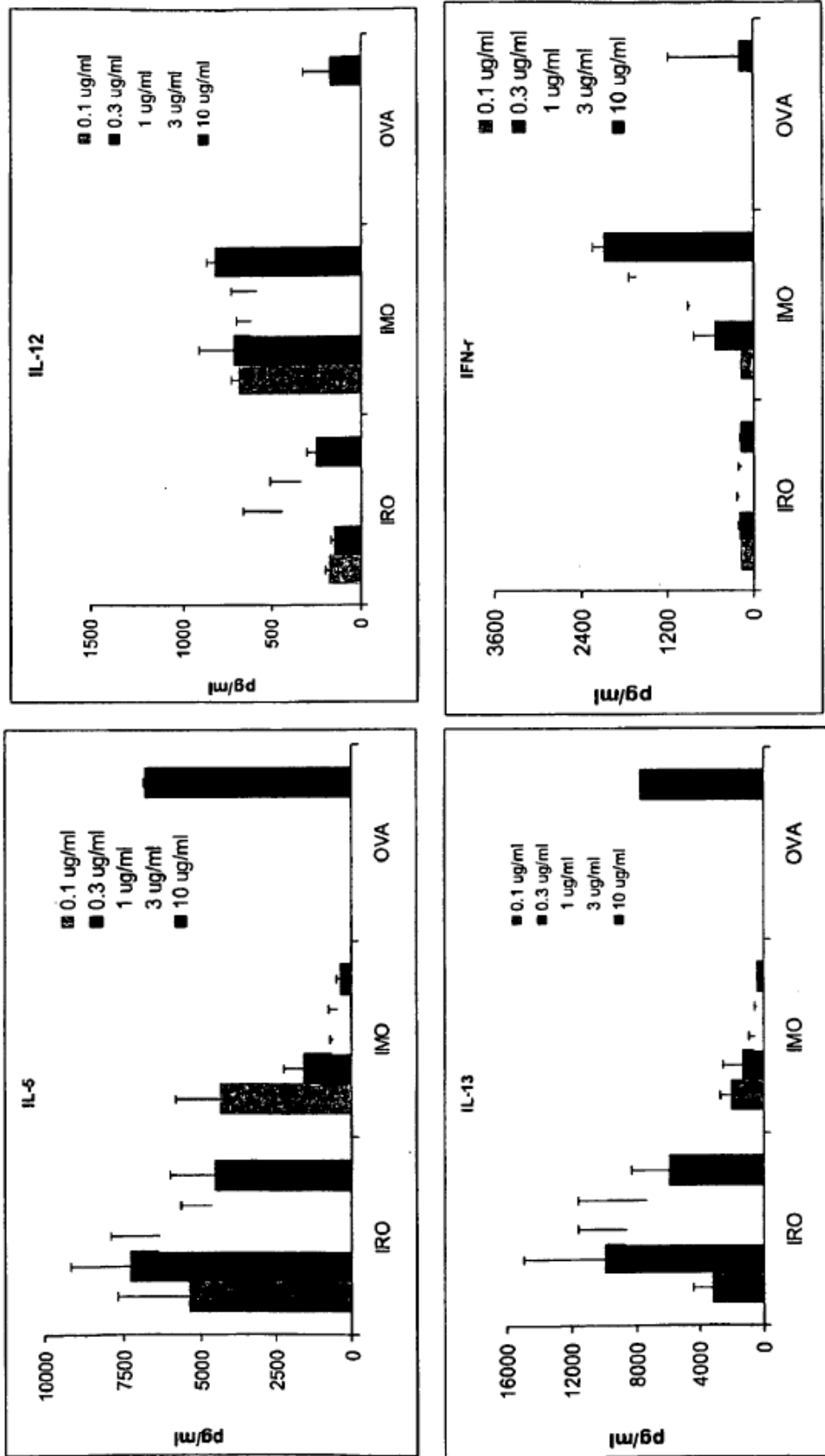
n=7, pDC y PBMC humanas se incubaron con 10 ug IMO y 40 ug IRO durante 24 hr

hIMO = 2 5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'

hIRO = 10 5'-CTATCT**G**UCGTTCTCTGT-3'

Los nucleótidos mostrados en negrita son 2'-O-metilribonucleótidos

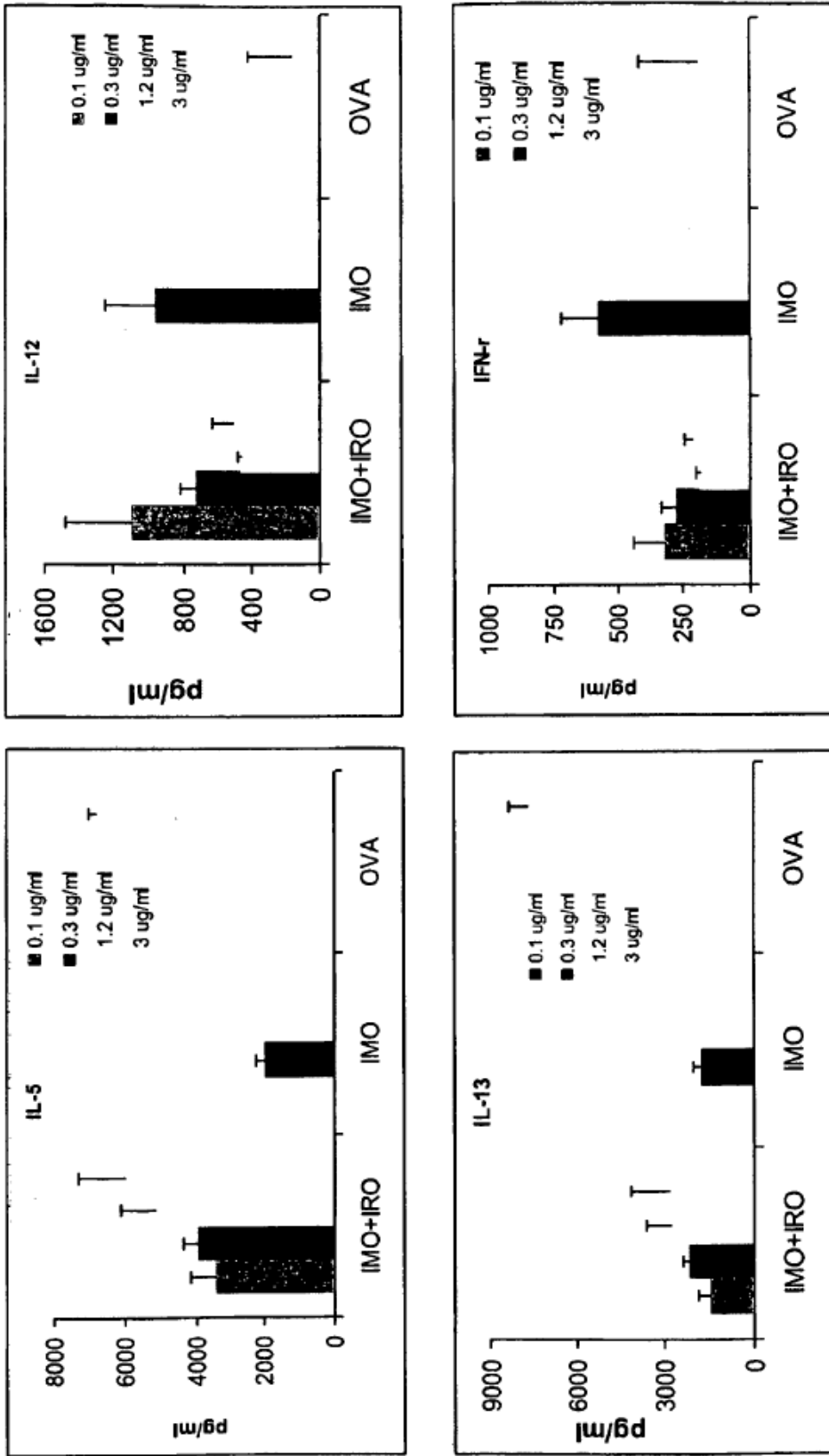
Figura 6



IMO = 1 5'-CTATCTGACGGTCTCTGT-3'
 IRO = 5 5'-CTATCTGACGGTCTCTGT-3'

Los nucleótidos mostrados en negra son 2'-O-metilribonucleótidos

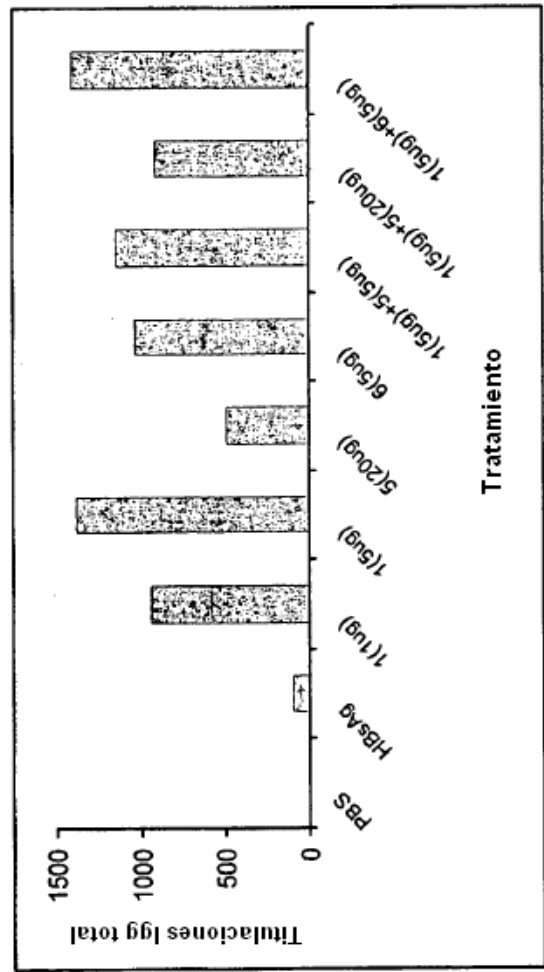
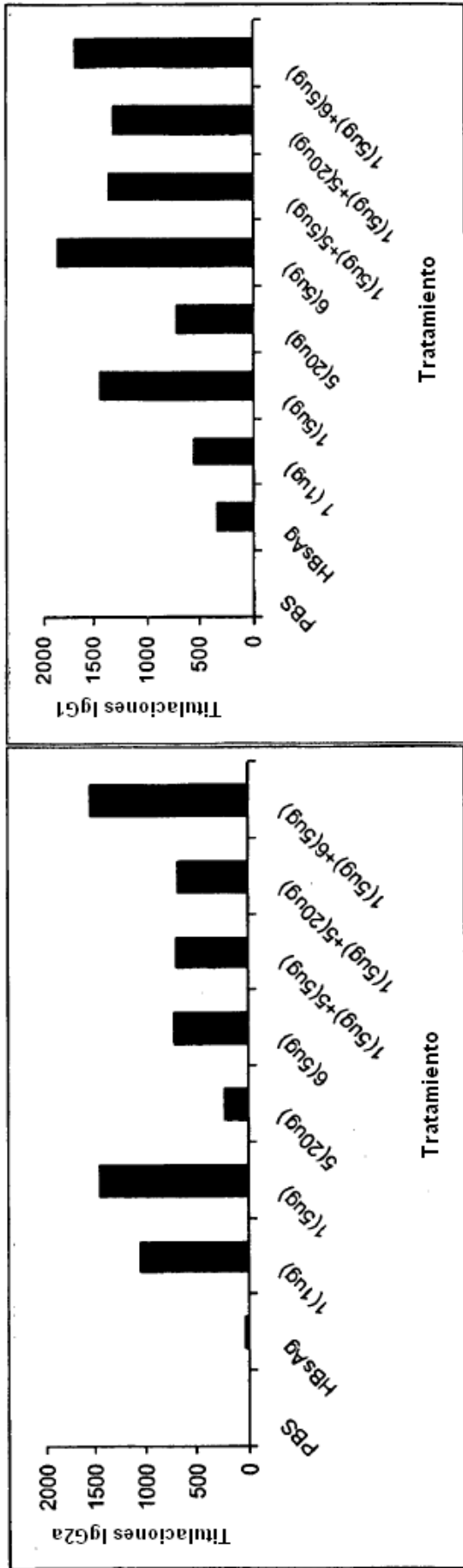
Figura 7



IMO = 1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
 IRO = 5 5'-CTATCT**GACGTTCTCTGT**-3'

Los nucleótidos mostrados en negrita son 2'-O-metilribonucleótidos

Figura 8



- 1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
- 5 5'-CTATCT**G**ACGTTCTCTGT-3'
- 6 5'-CTATCTGACG**U**UUCTCTCTGT-3'

Los nucleótidos mostrados en negrita son 2'-O-metilribonucleótidos

Figura 9

Actividad antagonista a corto plazo

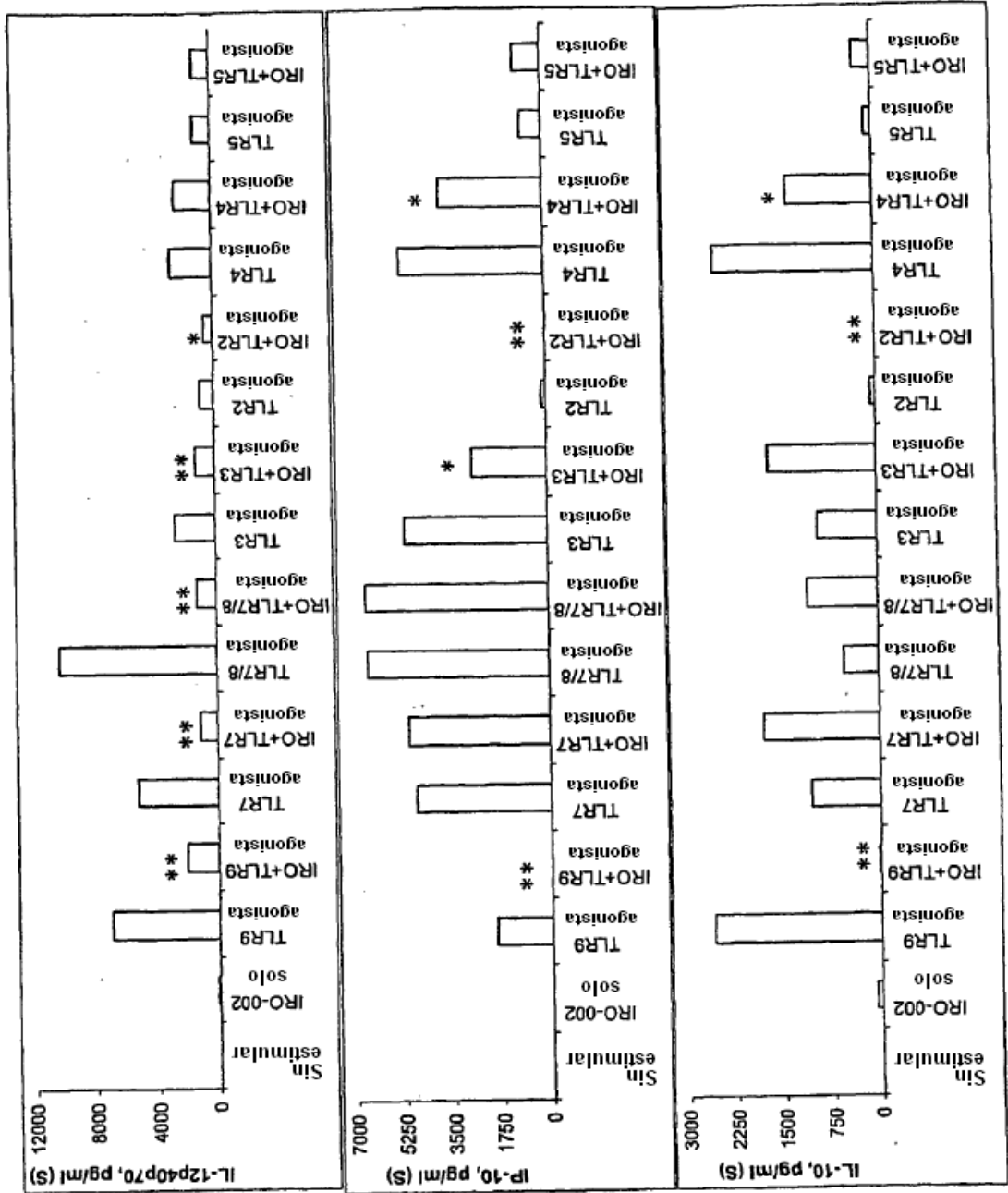


Figura 10.
 * 25-50% inhibición
 ** > 50% inhibición

Actividad antagonista a corto plazo

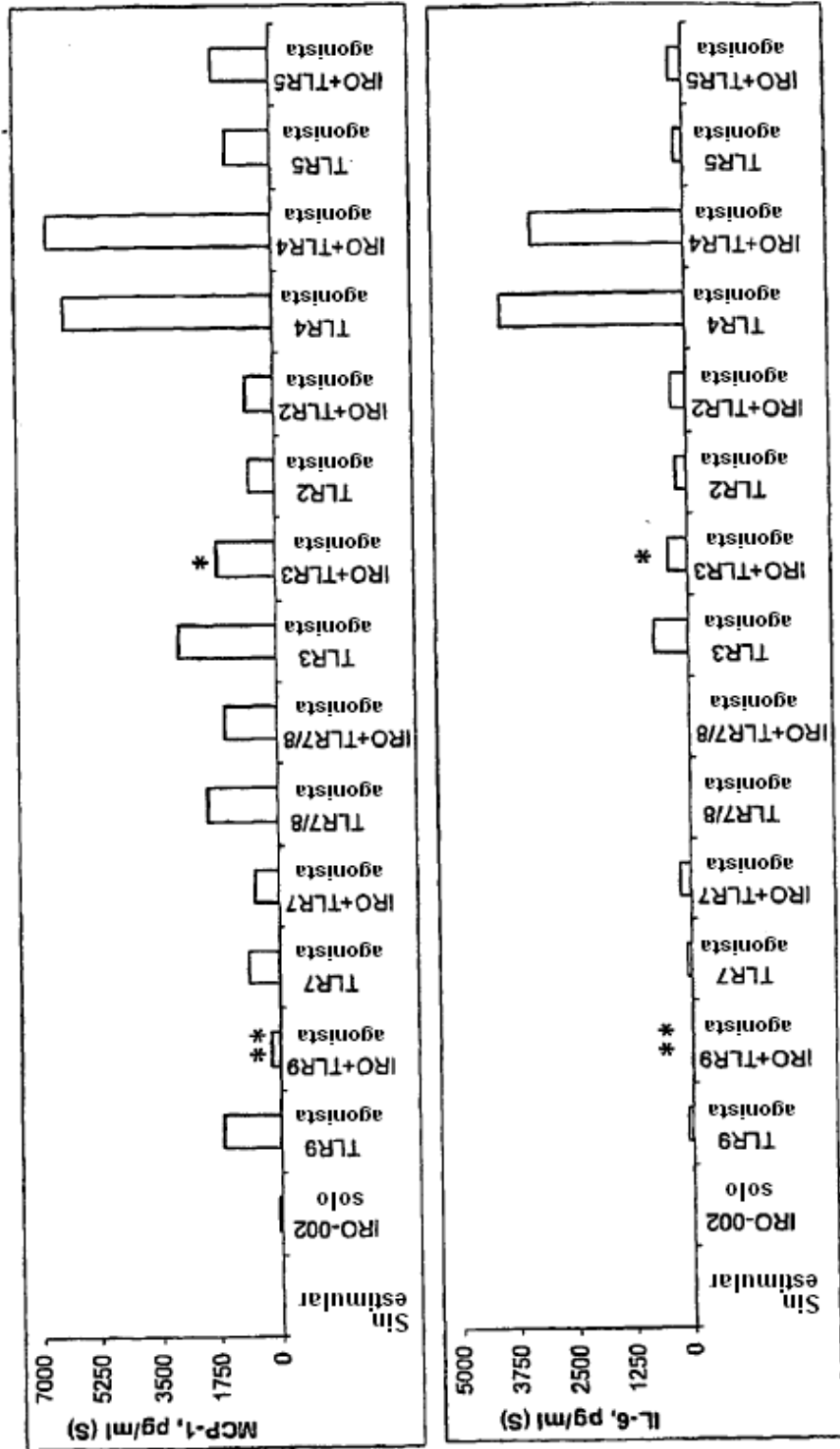


Figura 11.
 * 25-50% inhibición
 ** > 50% inhibición

Actividad antagonista a corto plazo

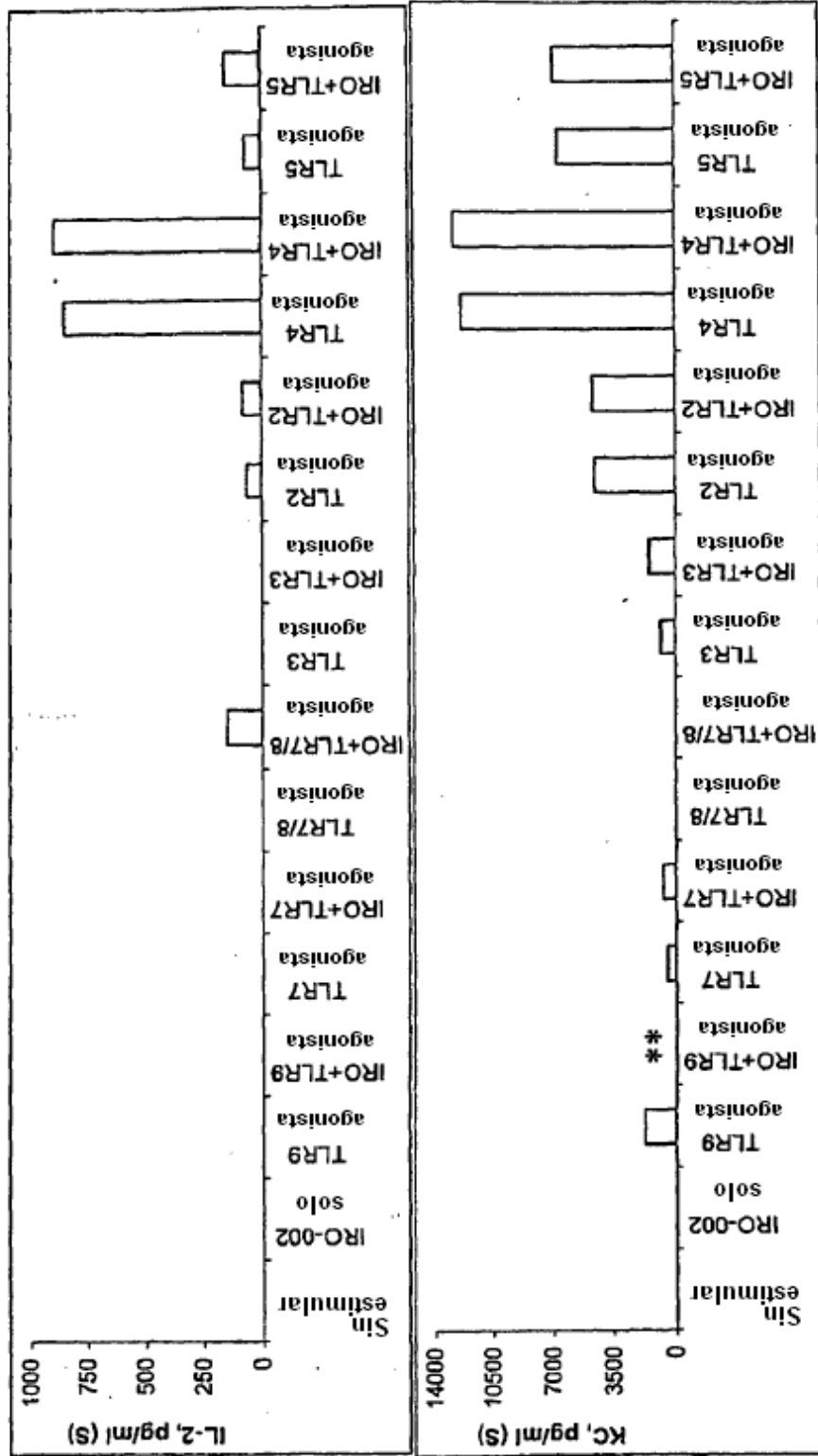


Figura 12.
 * 25-50% inhibición
 ** > 50% inhibición

Actividad antagonista a largo plazo

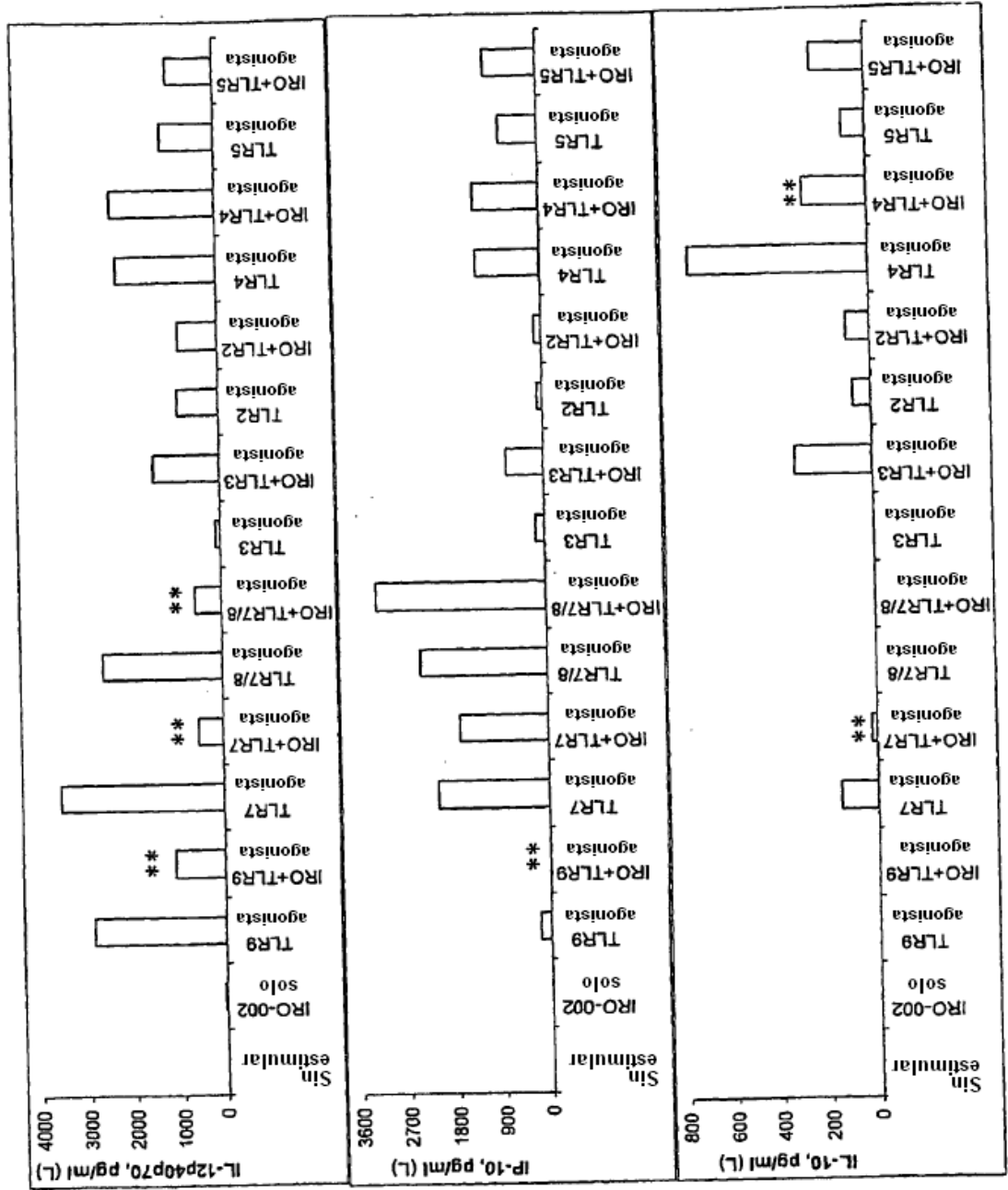


Figura 13.
 * 25-50% inhibición
 ** > 50% inhibición

Actividad antagonista a largo plazo

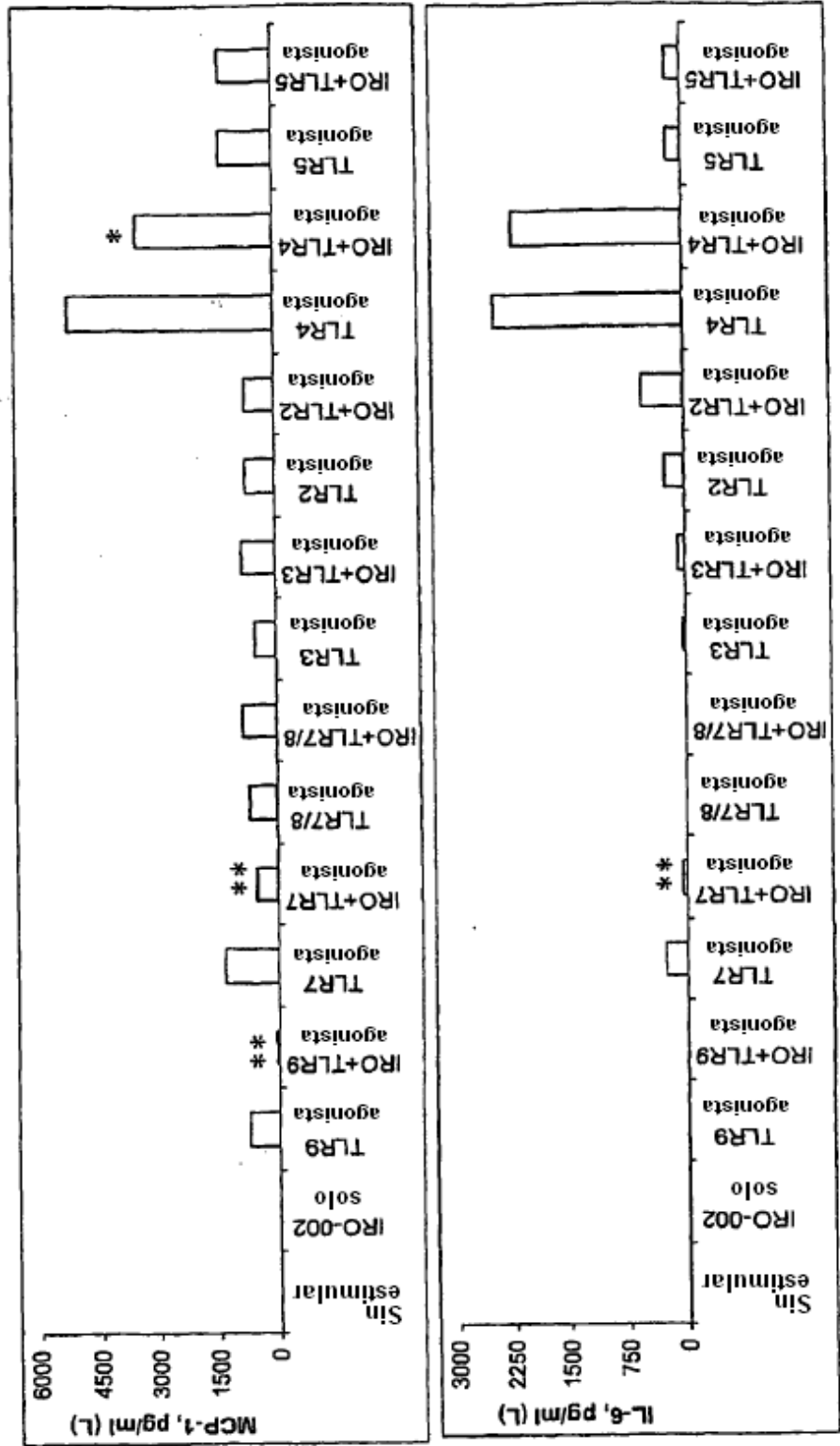


Figura 14.
 * 25-50% inhibición
 ** > 50% inhibición

Actividad antagonista a largo plazo

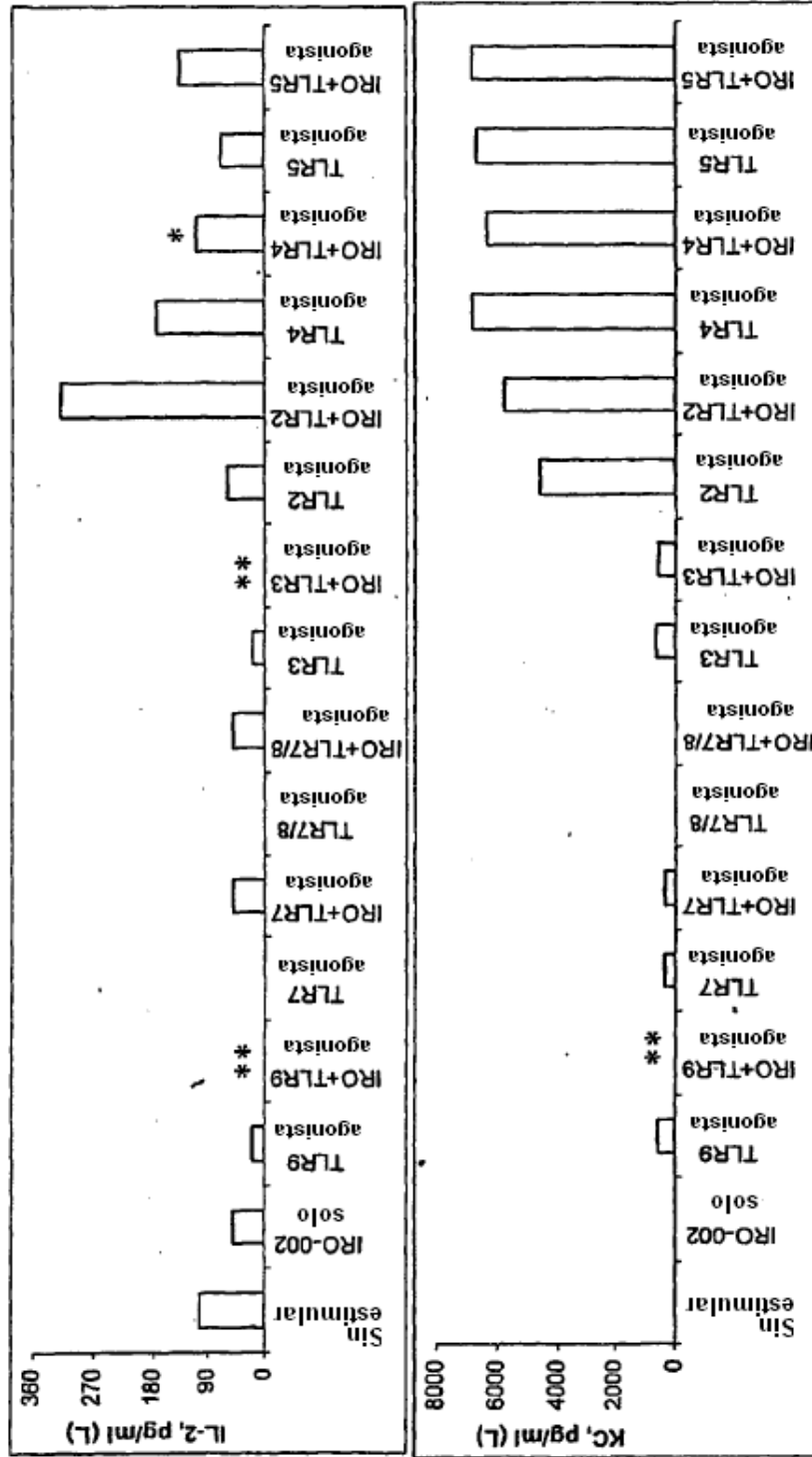


Figura 15.
 * 25-50% inhibición
 ** > 50% inhibición

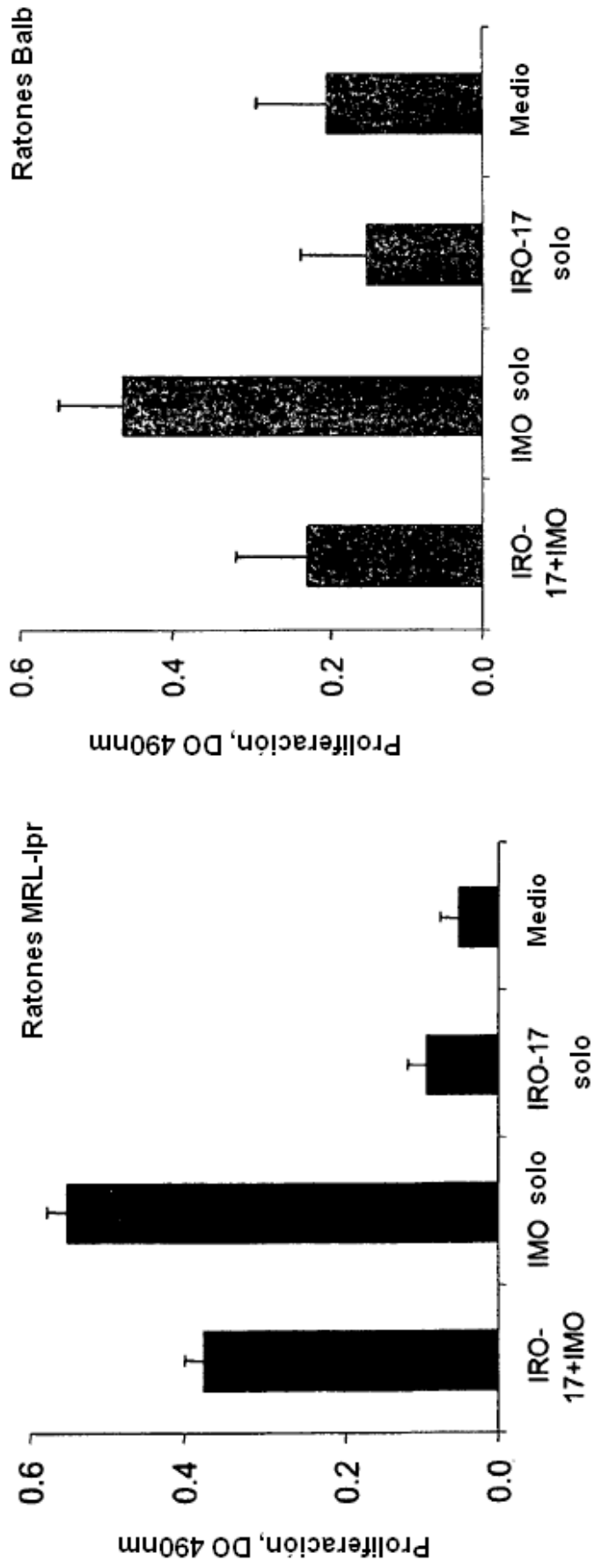


Figura 16

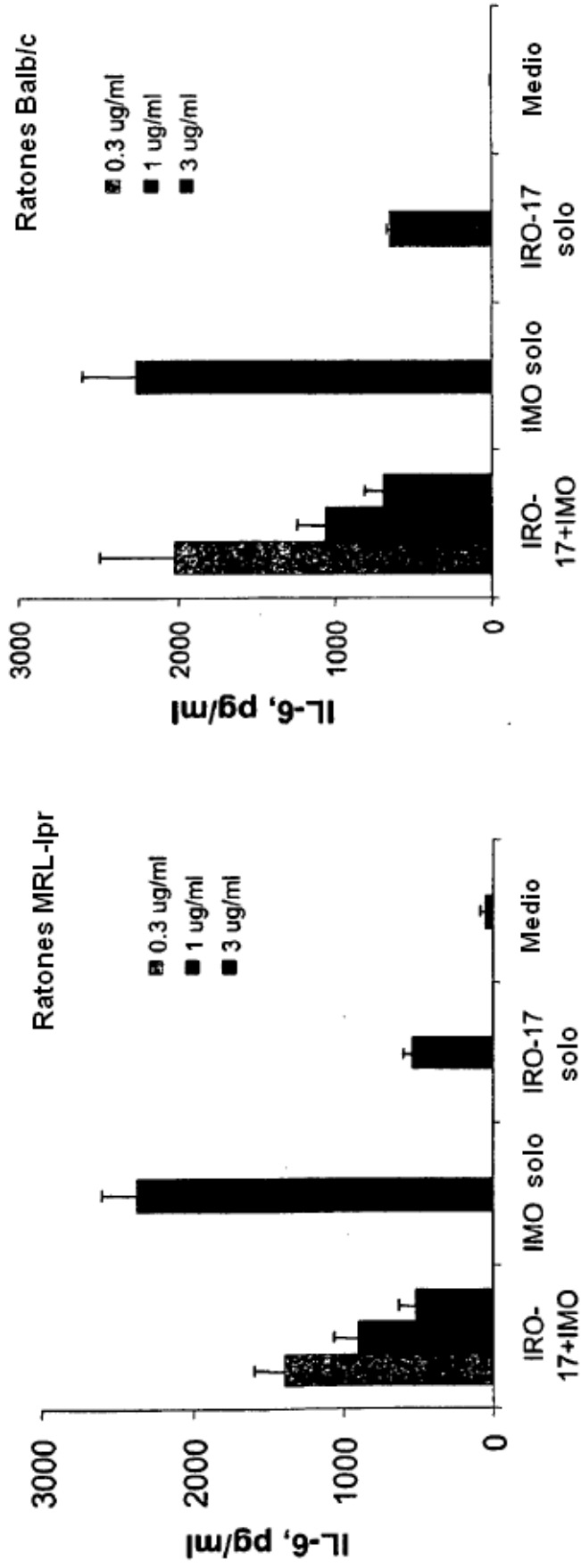


Figura 17A

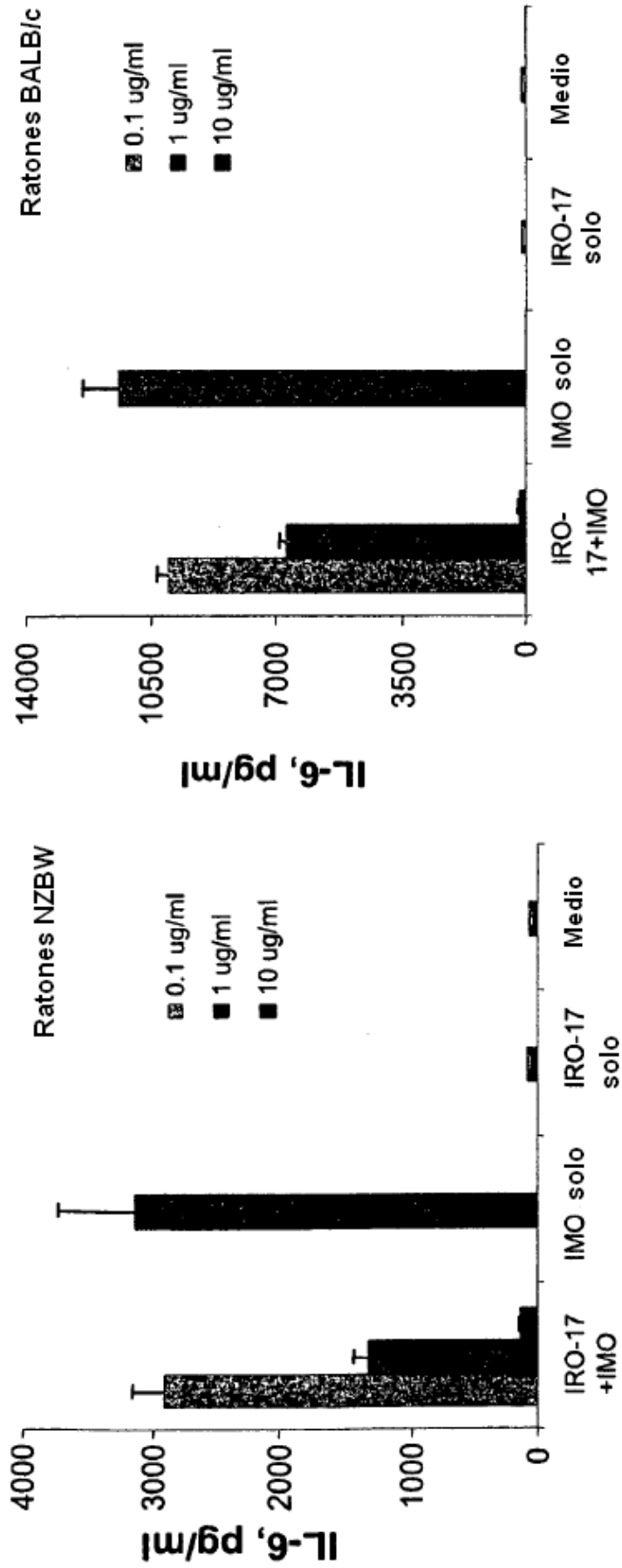


Figura 17B

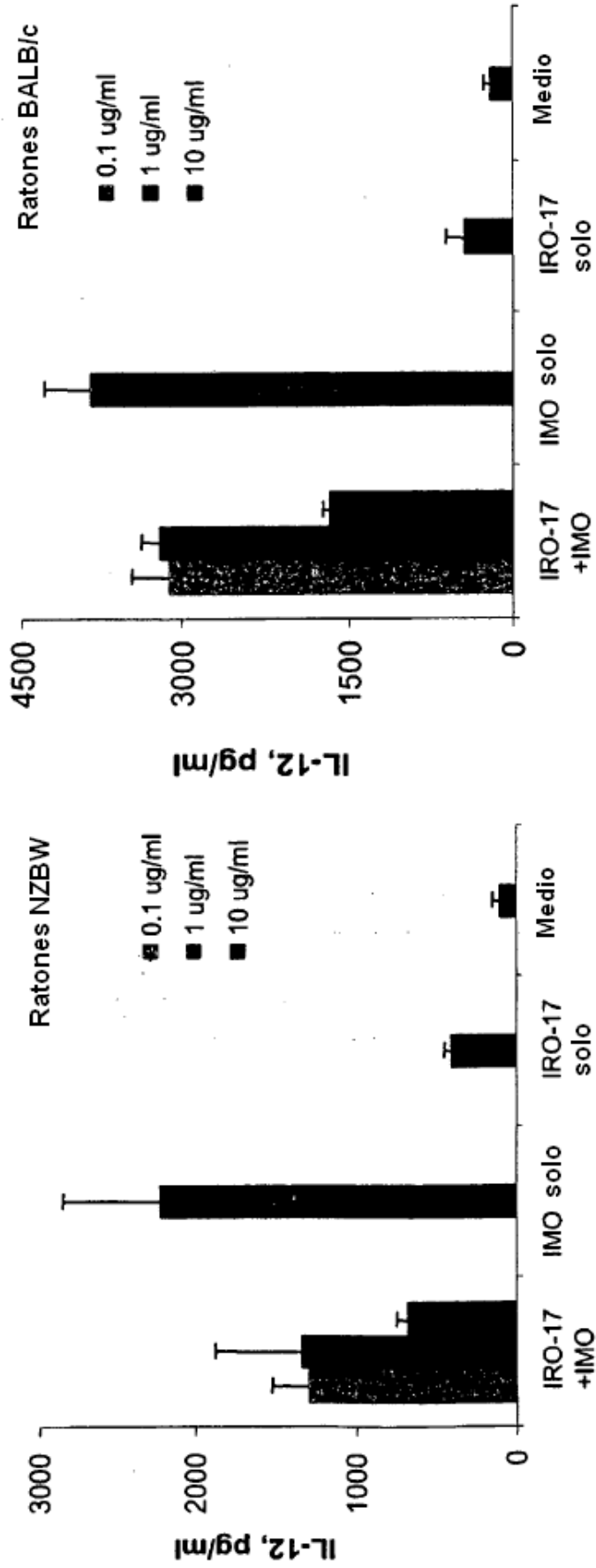


Figura 17C

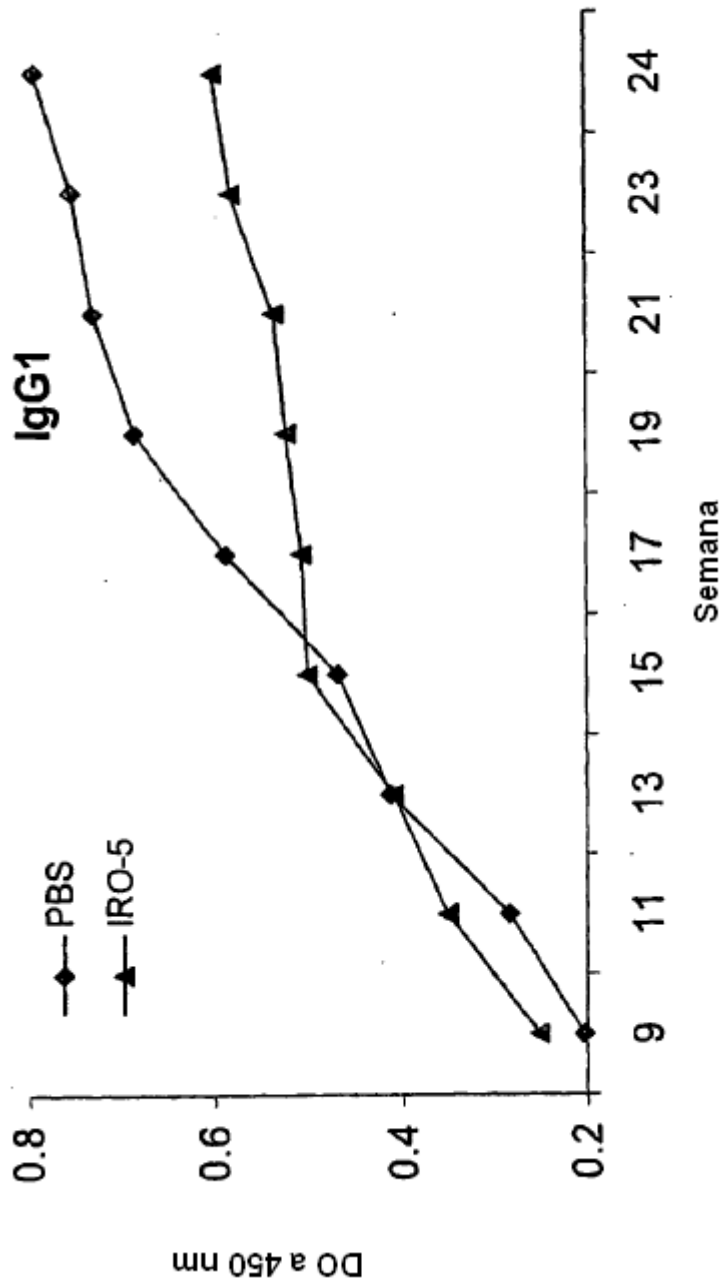


Figura 18A

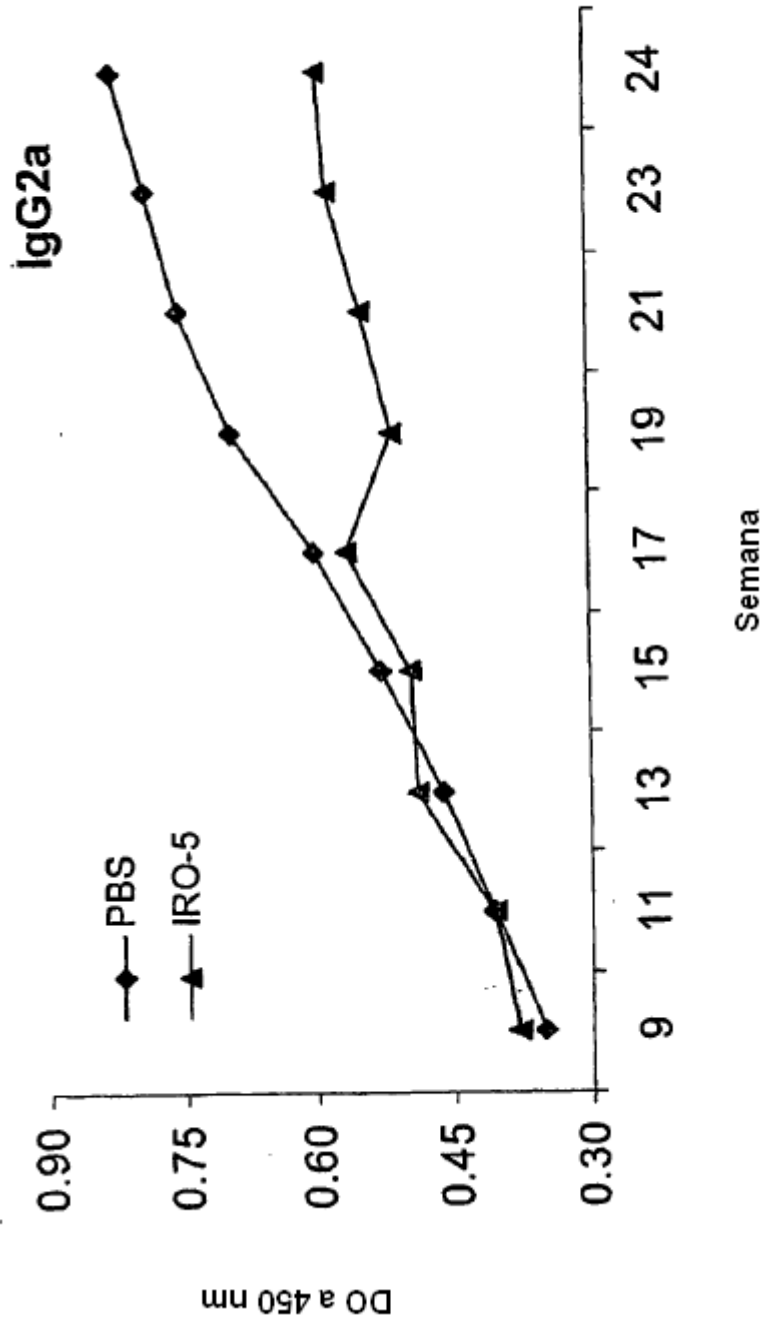


Figura 18B

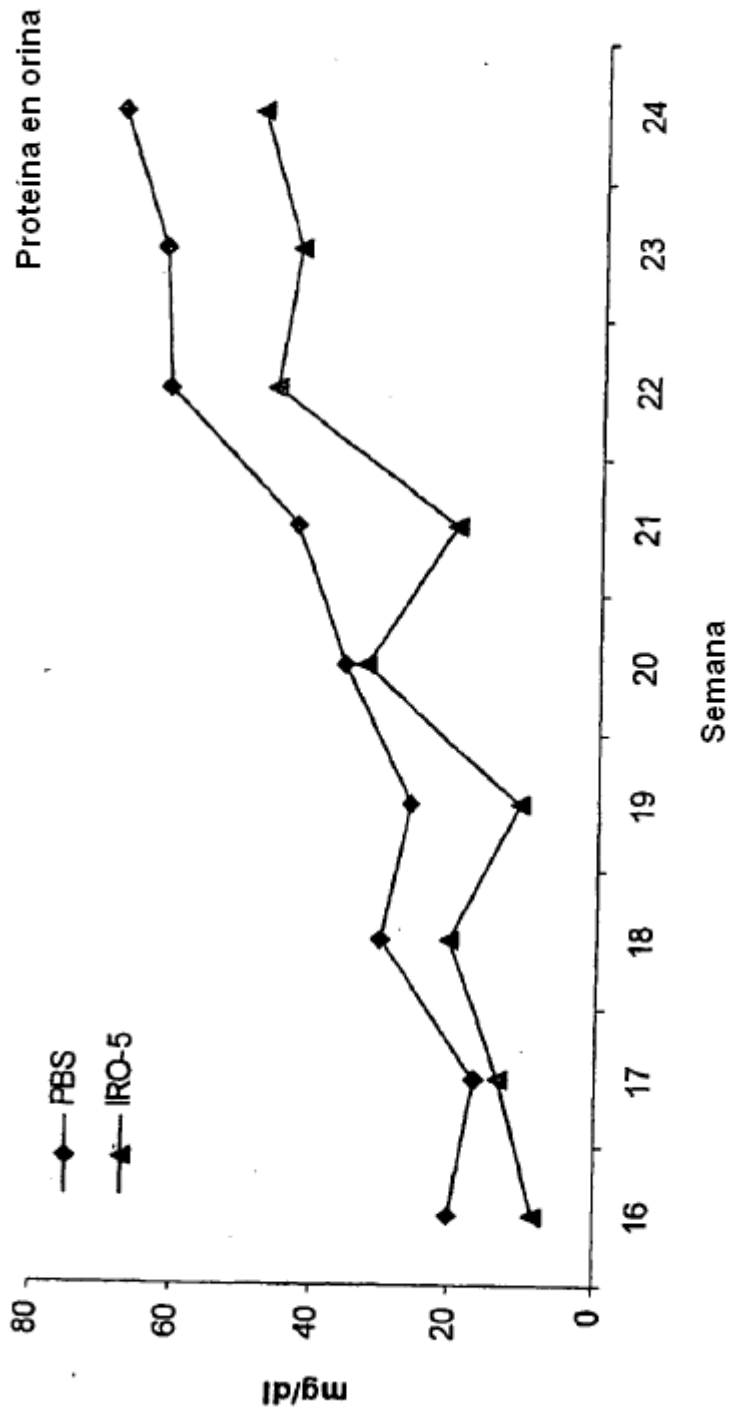


Figura 18C

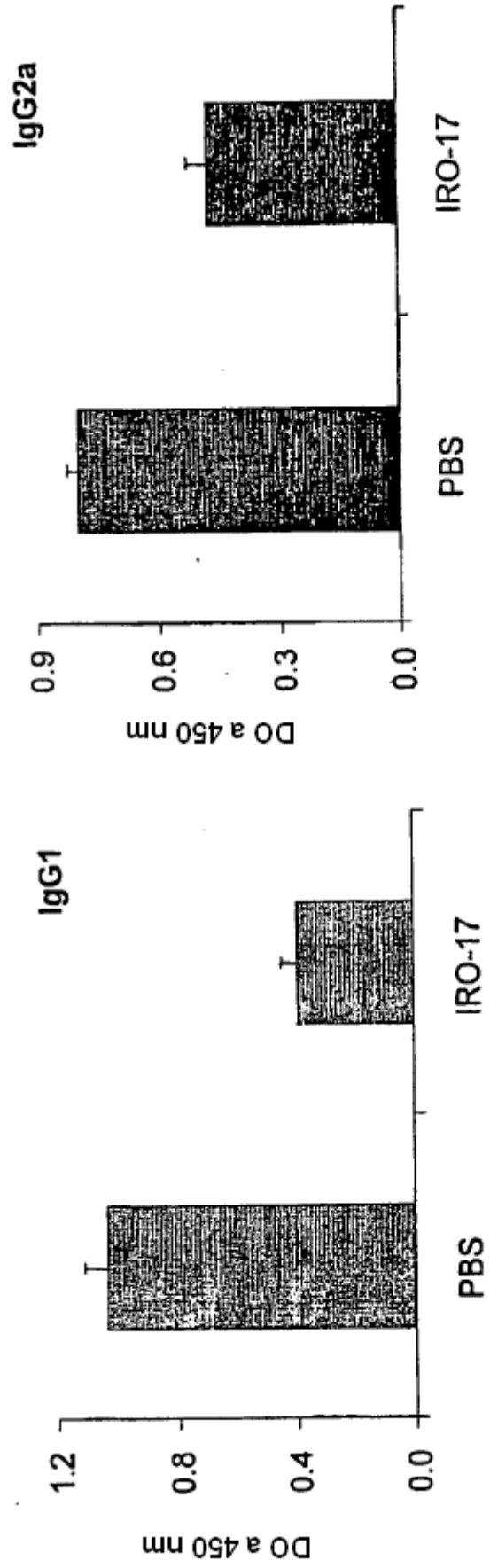


Figura 18D

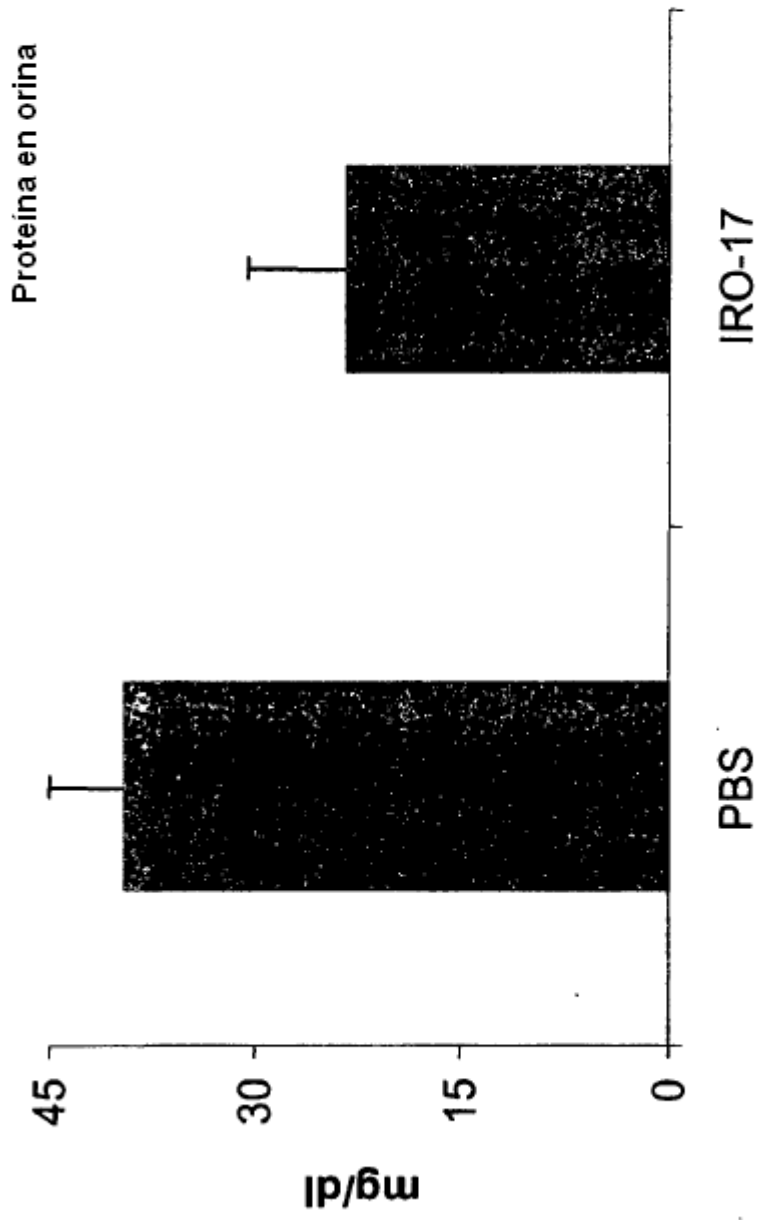


Figura 18E

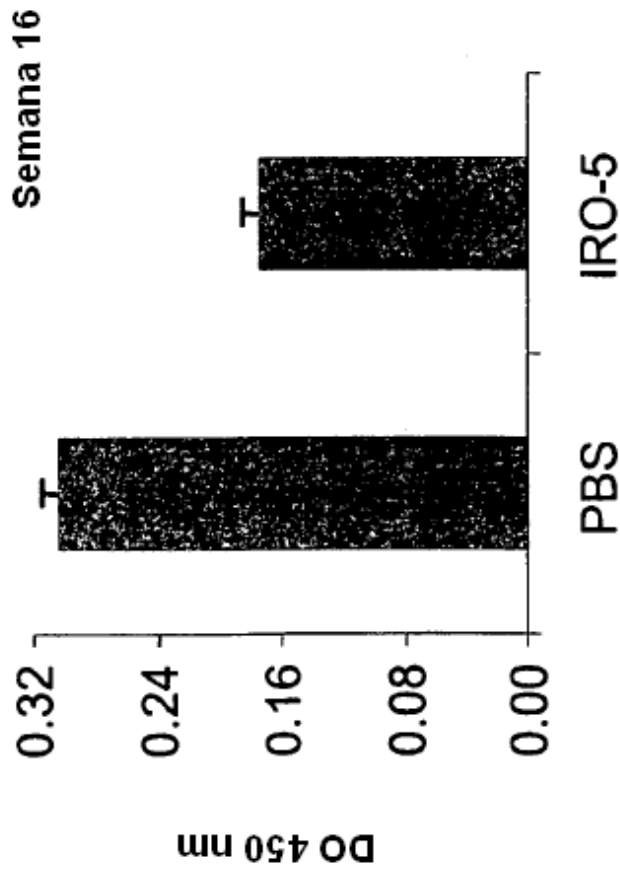
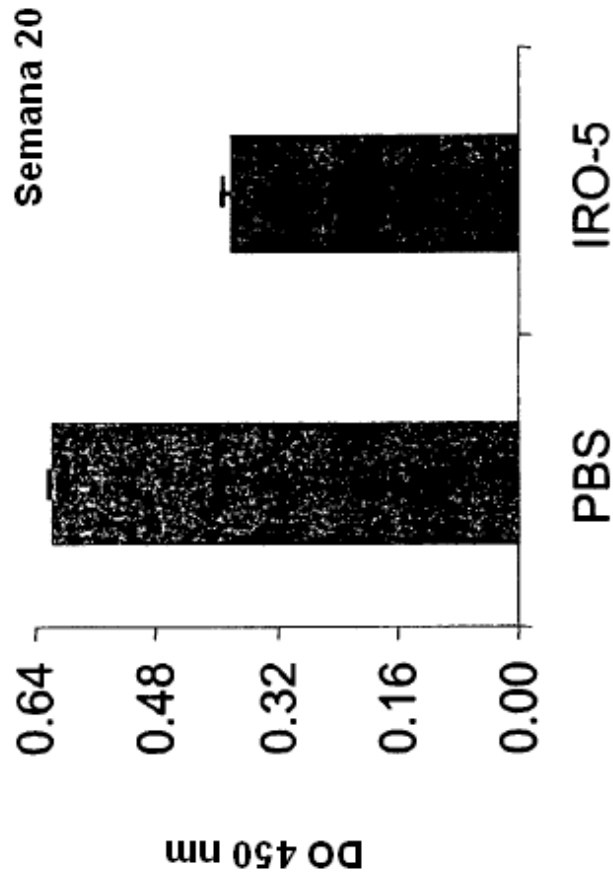


Figura 19