

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 287**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2018** **PCT/AU2018/050295**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2018** **WO18176099**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2018** **E 18774987 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024** **EP 3600374**

54 Título: **Tratamiento de infección respiratoria**

30 Prioridad:

31.03.2017 AU 2017901180

21.12.2017 AU 2017905124

21.12.2017 AU 2017905128

09.02.2018 AU 2018900409

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2024

73 Titular/es:

ENA RESPIRATORY PTY LTD (100.0%)

Suite 2051 York Street

Sydney, NSW 2000, AU

72 Inventor/es:

BARTLETT, NATHAN;

GIRKIN, JASON;

JACKSON, DAVID;

ZENG, WEIGUANG;

HOLMES, IAN y

DEMAISON, CHRISTOPHE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 979 287 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

Tratamiento de infección respiratoria

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a compuestos para usar en la prevención o el tratamiento de afecciones respiratorias. En particular, los compuestos son para usar en la prevención y/o el tratamiento de la infección por rinovirus y la prevención y/o el tratamiento de exacerbaciones respiratorias.

Antecedentes de la invención

- 10 Las infecciones respiratorias están entre las causas más comunes de enfermedad humana en todo el mundo y son causadas comúnmente por virus. Los rinovirus (RV) son uno de los tipos más comunes de virus que infectan a seres humanos y se sabe que causan el resfriado común. A diferencia de los brotes esporádicos de la gripe pandémica y estacional, las infecciones por rinovirus ocurren durante todo el año con múltiples serotipos diferentes. En promedio, los niños experimentan 5-10 resfriados por año y mucho más de la mitad de todos los resfriados son causados por la infección por RV.

- 15 Las infecciones respiratorias víricas pueden empeorar la gravedad de las enfermedades de las afecciones respiratorias conduciendo a exacerbaciones (ataques). Las exacerbaciones pueden ocurrir para afecciones tales como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Las exacerbaciones del asma y de la EPOC son las formas de enfermedades más importantes desde el punto de vista clínico y económico. El rinovirus es la infección vírica más común asociada con exacerbaciones del asma y, por lo tanto, representa la mayor carga en términos de morbilidad, mortalidad y coste de atención sanitaria.

- 20 La gran mayoría de las exacerbaciones, particularmente en el asma, continúan produciéndose a pesar del uso de las mejores terapias actuales disponibles. Cuando se producen exacerbaciones, las opciones de tratamiento son limitadas y se han desarrollado poco en los últimos años. El tratamiento implica dosis crecientes de broncodilatadores inhalados y corticosteroides sistémicos u orales, que son los mismos fármacos que no lograron prevenir la exacerbación que se produce en primer lugar.

- 25 Por lo tanto, existe la necesidad de terapias nuevas o mejoradas para el tratamiento y/o prevención de afecciones respiratorias mediadas por rinovirus. Además, existe la necesidad de terapias nuevas o mejoradas para el tratamiento y/o prevención de exacerbaciones mediadas por virus.

- 30 La referencia a cualquier técnica anterior en la memoria descriptiva no es un reconocimiento o sugerencia de que esta técnica anterior forme parte del conocimiento general común en cualquier jurisdicción o de que se podría esperar razonablemente que esta técnica anterior sea entendida, considerada como relevante, y/o combinada con otras partes de la técnica anterior por un experto en la técnica.

Sumario de la invención

- 35 La presente invención proporciona un compuesto que comprende un agonista de TLR2 para usar en el tratamiento o prevención de una afección respiratoria asociada con rinovirus en un sujeto, en donde el agonista de TLR2 comprende un lipopéptido o un resto lipídico, en donde el resto lipídico se selecciona de palmitoilo, miristoilo y estearoilo, y en donde el agonista de TLR2 está unido a un resto solubilizante, en donde el resto solubilizante comprende un polietilenglicol (PEG).

- 40 Además, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un agonista de TLR2 para usar en el tratamiento o prevención de una exacerbación mediada por virus de una afección respiratoria en un sujeto, en donde la exacerbación mediada por virus es una exacerbación mediada por rinovirus, en donde el agonista de TLR2 comprende un lipopéptido o un resto lipídico, en donde el resto lipídico se selecciona de palmitoilo, miristoilo y estearoilo, y en donde el agonista de TLR2 está unido a un resto solubilizante, en donde el resto solubilizante comprende un polietilenglicol (PEG). Preferiblemente, el uso previsto es en un método que comprende administrar sólo un compuesto que comprende un agonista de TLR2. En otras palabras, el método no comprende administrar agonistas de TLR distintos de homodímeros o heterodímeros de TLR2.

- 45 El compuesto puede administrarse en una composición. Típicamente, la composición comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede formularse para administración a las vías respiratorias, por ejemplo, por inhalación o vía intranasal. La composición puede estar exenta de compuestos que son agonistas de TLR distintos de homodímeros o heterodímeros de TLR2. Preferiblemente, la composición consiste esencialmente en, o consiste en un compuesto que comprende un agonista de TLR2 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Por ejemplo, la afección respiratoria puede ser enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, fibrosis quística o afecciones pulmonares asociadas con trasplante de pulmón o uso de glucocorticosteroides crónicos.

Según la invención, la afección respiratoria es causada por un rinovirus o la exacerbación de la afección respiratoria

es mediada por un rinovirus. Por ejemplo, la exacerbación del asma mediada por virus está causada por un rinovirus. El rinovirus puede ser cualquier serotipo como se describe en el presente documento. Típicamente, el rinovirus es un rinovirus de serotipo 1B (RV1B).

5 El agonista de TLR2 comprende un lipopéptido o un resto lipídico, en donde el resto lipídico se selecciona de palmitoilo, miristoilo y estearoilo. El agonista de TLR2 puede seleccionarse del grupo que consiste en: Pam2Cys, Pam3Cys y Ste2Cys. En una realización preferida, el agonista de TLR2 comprende Pam2Cys.

10 En cualquier aspecto de la invención, el agonista de TLR2 puede conjugarse con otros compuestos o grupos funcionales. Otros compuestos o grupos funcionales son cualquiera de los descritos en el presente documento. Los compuestos preferidos se seleccionan basándose en ayudar a disolver el agonista de TLR2 en un vehículo, diluyente, excipiente o disolvente.

La solubilidad del agonista de TLR2 aumenta mediante un agente solubilizante que comprende polietilenglicol (PEG). Por lo tanto, el compuesto comprende un agonista de TLR2 unido a un resto solubilizante que comprende PEG.

En cualquier aspecto de la invención, el compuesto comprende Pam2Cys conjugado con PEG₁₁. Preferiblemente, las moléculas de Pam2Cys y PEG₁₁ están separadas por dos serinas (PEG₁₁-SS-Pam2Cys).

15 En cualquier aspecto de la invención, el agonista de TLR2 no es Pam3Cys.

Aunque a continuación se describen procedimientos de tratamiento médico y administración a un sujeto, estas etapas no deben considerarse incluidas dentro del alcance de la invención. En su lugar, la invención se refiere a compuestos para usar en los métodos descritos, como se define en las reivindicaciones adjuntas. En cualquier aspecto de la invención, el agonista de TLR2 se proporciona para la administración una vez al día, una vez a la semana o dos veces a la semana. Generalmente, la etapa de administración a un sujeto no está dentro del alcance de la invención.

Cuando está prevista o se requiere la prevención o profilaxis, el compuesto se administra al sujeto antes de cualquier síntoma de infección viral detectable clínica o bioquímicamente, preferiblemente infección por rinovirus.

25 El compuesto puede administrarse en una composición. Típicamente, la composición comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede estar exenta de compuestos que son agonistas de TLR distintos de homodímeros o heterodímeros de TLR2. Preferiblemente, la composición consiste esencialmente en, o consiste en, un compuesto que comprende un agonista de TLR2 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 El compuesto o composición puede administrarse a las vías respiratorias. Típicamente, el compuesto o composición se administra a las vías respiratorias superiores y/o inferiores. Por ejemplo, el compuesto o composición puede administrarse por inhalación o vía intranasal al sujeto.

La administración del agonista de TLR2 a un sujeto puede reducir la carga viral en un sujeto. Preferiblemente, la carga viral se reduce en las vías respiratorias, por ejemplo, las vías respiratorias superiores y/o inferiores. Preferiblemente, la carga viral se reduce en los pulmones.

La administración del agonista de TLR2 a un sujeto puede reducir los niveles de CXCL1 o TNF α .

35 En cualquier aspecto de la invención, el tratamiento o prevención de una exacerbación mediada por virus del asma no induce significativamente la expresión de interferón.

En cualquier aspecto de la invención, el sujeto padece asma leve o moderada. El asma puede ser de inicio infantil o en el adulto. El paciente de asma puede tener cualquier característica de la afección como se indica en la Figura 12a.

40 El compuesto o composición puede administrarse con un corticosteroide. Específicamente, cualquier método o uso puede comprender además administrar un corticosteroide. El compuesto o composición puede administrarse simultánea o secuencialmente al corticosteroide. El compuesto o composición puede administrarse una, dos o más veces durante un periodo de 24 horas o 7 días antes de administrar el corticosteroide.

El sujeto al que se administra el compuesto o composición puede estar recibiendo, o ha recibido, un corticosteroide.

45 En cualquier aspecto de la invención, el corticosteroide puede ser un glucocorticoide. Preferiblemente, el glucocorticoide es un agonista, agonista parcial o modulador alostérico de un receptor de glucocorticoides. Preferiblemente, el glucocorticoide es un glucocorticoide inhalable. Incluso más preferiblemente, el glucocorticoide es budesonida, ciclosenida, mometasona, beclometasona, betametasona, dexametasona, prednisolona, prednisona o cualquier otro glucocorticoide descrito en el presente documento tal como propionato de fluticasona.

50 Preferiblemente, el compuesto es uno cualquiera descrito en el presente documento, incluso más preferiblemente uno cualquiera de INNA-001 a INNA-015.

Preferiblemente, el corticosteroide es un glucocorticoide. Preferiblemente, el glucocorticoide es un agonista, agonista

parcial o modulador alostérico de un receptor de glucocorticoides. Preferiblemente, el glucocorticoide es un glucocorticoide inhalable. Incluso más preferiblemente, el glucocorticoide es budesonida, ciclosenida, mometasona, beclometasona, betametasona, dexametasona, prednisolona, prednisona o cualquier otro glucocorticoide descrito en el presente documento tal como propionato de fluticasona.

- 5 En este aspecto, la composición comprende además un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, el diluyente, vehículo o excipiente es adecuado para administración por inhalación o intranasal.

En una realización, los únicos agentes activos en la composición son un compuesto que comprende un agonista de TLR2 y un corticosteroide.

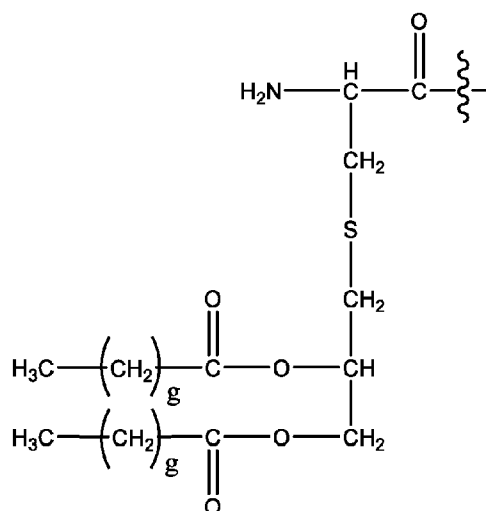
- 10 La composición puede formularse o adaptarse para la administración a las vías respiratorias, por ejemplo las vías respiratorias superiores o inferiores. Preferiblemente, la composición se formula o adapta para la administración por inhalación o intranasal. La composición puede ser una composición inhalante y puede formularse como un polvo seco adecuado para usar en un dispositivo inhalador de polvo seco. Alternativamente, la composición puede formularse como un pulverizador, niebla o aerosol.

En una realización preferida, la composición se formula como un pulverizador nasal o como gotas nasales.

- 15 En un aspecto, el compuesto para usar según la presente invención comprende la estructura:

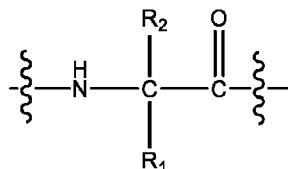


en donde A comprende o consiste en:



en donde cada g es independientemente 12, 14 o 16;

- 20 Y es



en donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

- 25 y

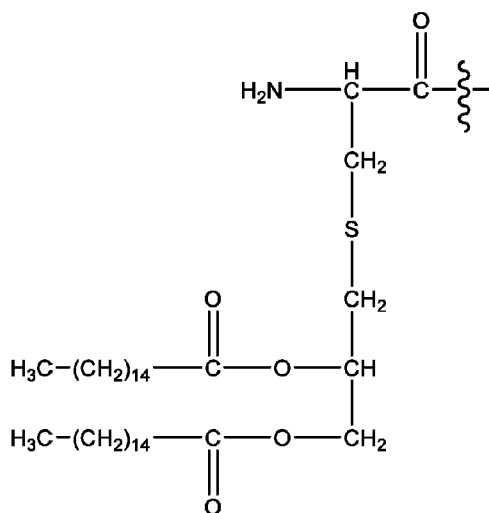
B comprende o consiste en polietilenglicol (PEG),

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

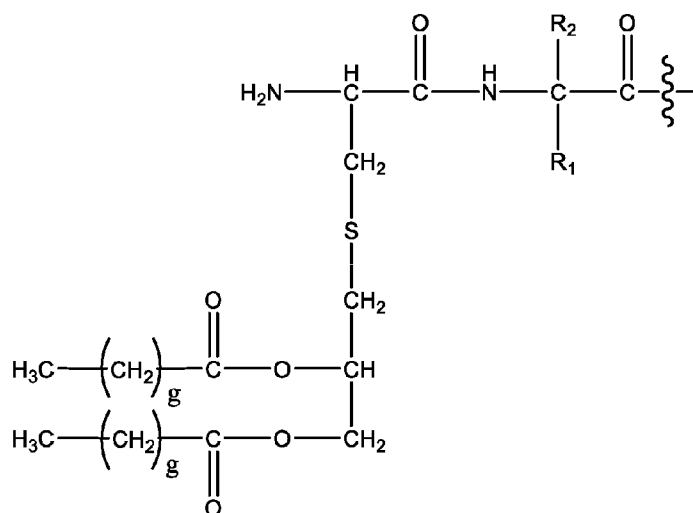
El compuesto puede comprender Pam2Cys y PEG, en donde Pam2Cys y PEG están unidos por un resto de serina, homoserina, treonina o fosfoserina,

en donde

Pam2Cys en el compuesto tiene la estructura:



En un aspecto, el compuesto comprende:



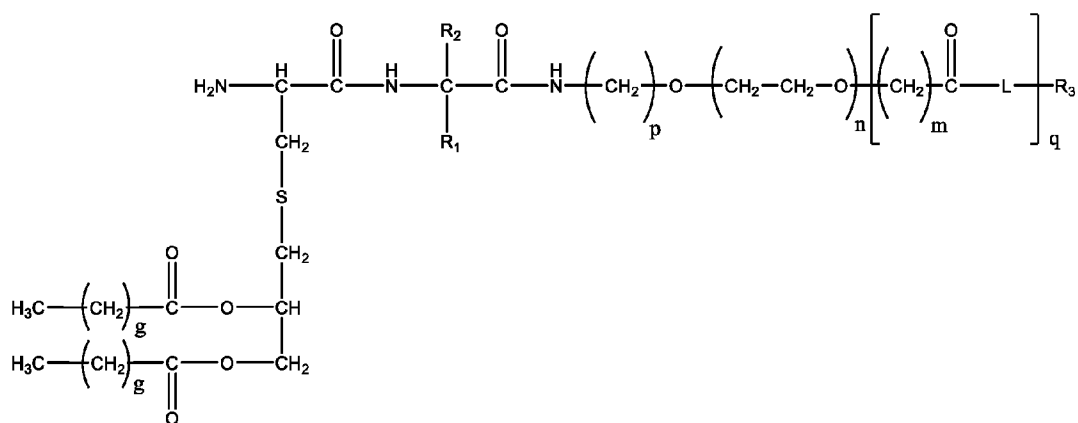
5

en donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

covalentemente unido a polietilenglicol (PEG),

10 o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, el compuesto tiene la estructura de fórmula (I):



(I)

en donde

n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

5 cada g es independientemente 12, 14 o 16;

p es 2, 3 o 4;

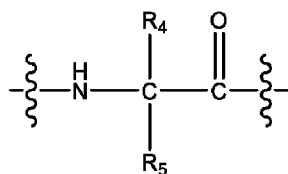
q es nulo o 1;

10 R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

en donde cuando $q = 1$, R_3 es $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

en donde cuando $q = 0$, R_3 es H;

L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:



15

en donde R_4 es H; y

R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

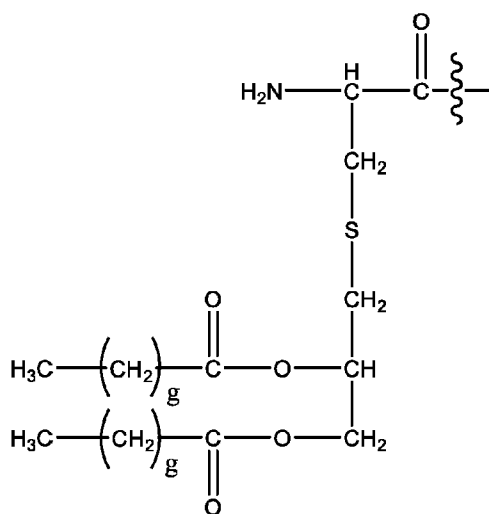
En una realización, el compuesto está representado por la fórmula (II):

20
$$\text{A}-\text{Y}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-[(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-\text{L}]_q-\text{R}_3$$

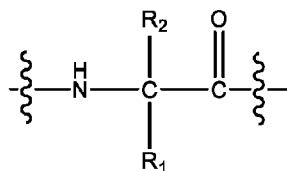
(II)

en donde

A tiene la estructura:



Y es



- 5 en donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$ en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

cada g es independientemente 12, 14 o 16;

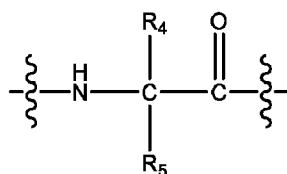
- 10 p es 2, 3 o 4;

q es nulo o 1;

en donde cuando $q = 1$, R_3 es $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

en donde cuando $q = 0$, R_3 es H;

- 15 L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:

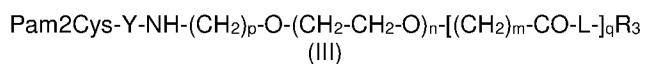


en donde R_4 es H; y

R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

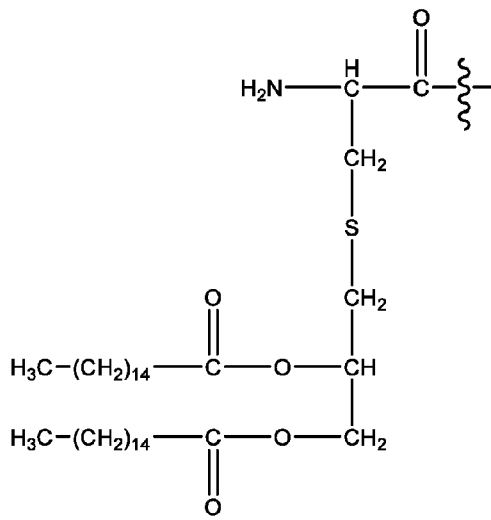
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 En una realización, el compuesto tiene la fórmula (III):

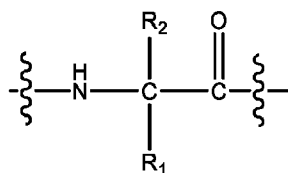


en donde

Pam2Cys tiene la estructura:



Y es:



- 5 en donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$ en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

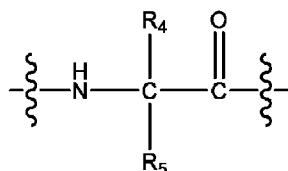
- 10 p es 2, 3 o 4;

q es nulo o 1;

en donde cuando $q = 1$, R_3 es H, $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

en donde cuando $q = 0$, R_3 es H;

- 15 L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:

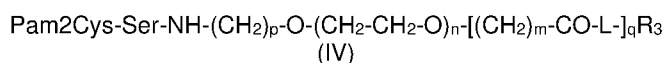


en donde R_4 es H; y

R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

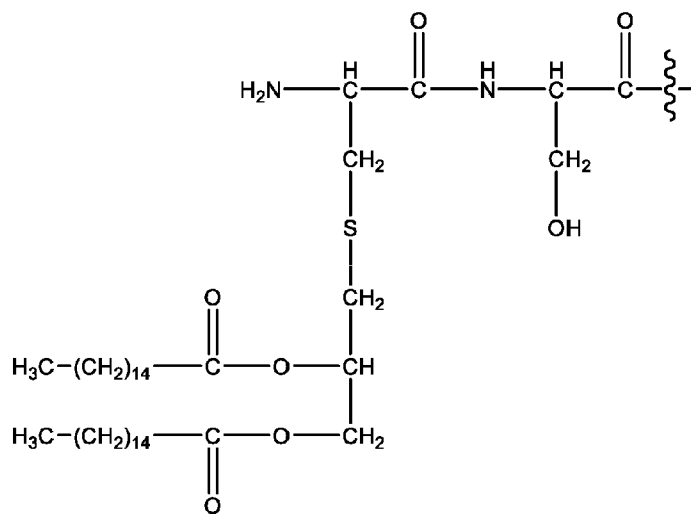
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 En una realización, el compuesto tiene la fórmula (IV):



en donde

Pam2Cys-Ser tiene la estructura:



n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

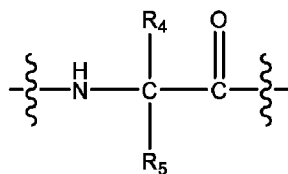
5 p es 2, 3 o 4;

q es nulo o 1;

en donde cuando q = 1, R₃ es -NH₂ u -OH;

en donde cuando q = 0, R₃ es H;

10 L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:

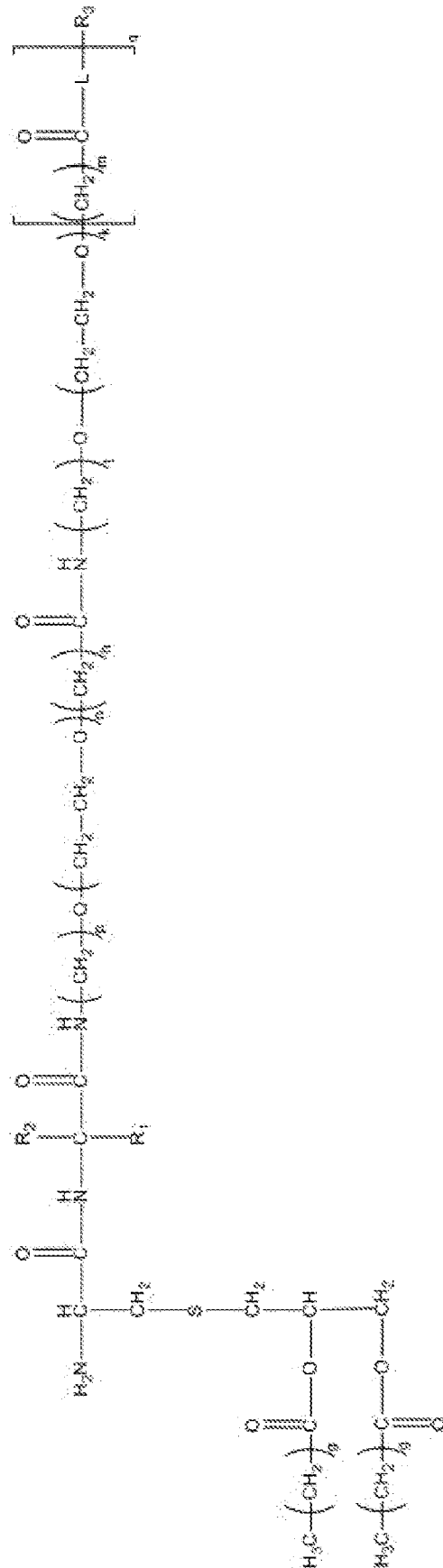


en donde R₄ es H; y

R₅ es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En una realización, el compuesto tiene la fórmula (V):



en donde

n es de 3 a 100;

k es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

cada g es independientemente 12, 14 o 16;

5 p es 2, 3 o 4;

t es 2, 3 o 4;

h es 1, 2, 3 o 4;

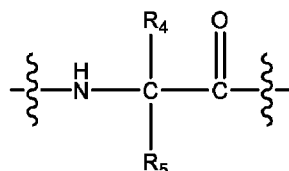
q es nulo o 1;

10 R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

en donde cuando $q = 1$, R_3 es $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

en donde cuando $q = 0$, R_3 es H;

15 L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:

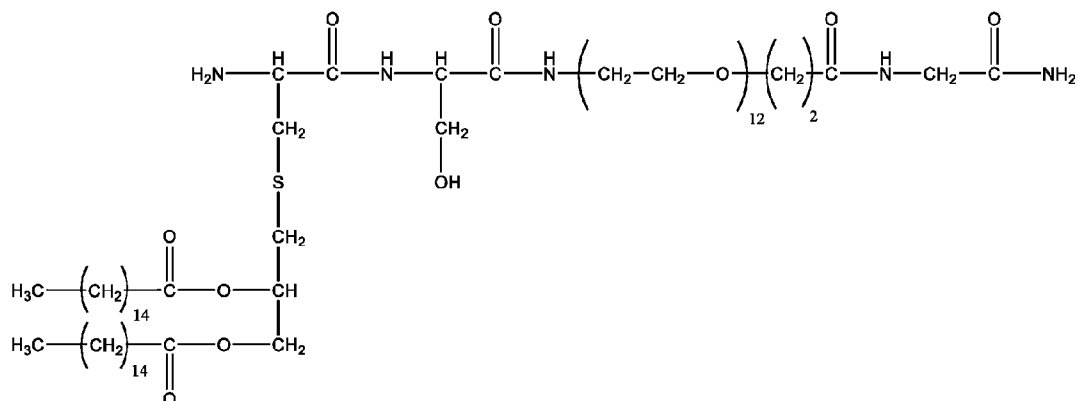


en donde R_4 es H; y

R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En una realización preferida, el compuesto tiene la estructura del compuesto (1):

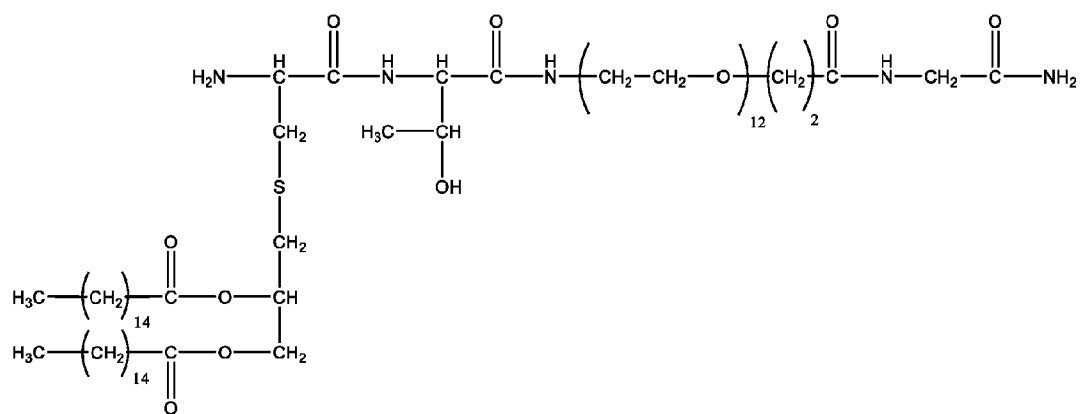


(1)

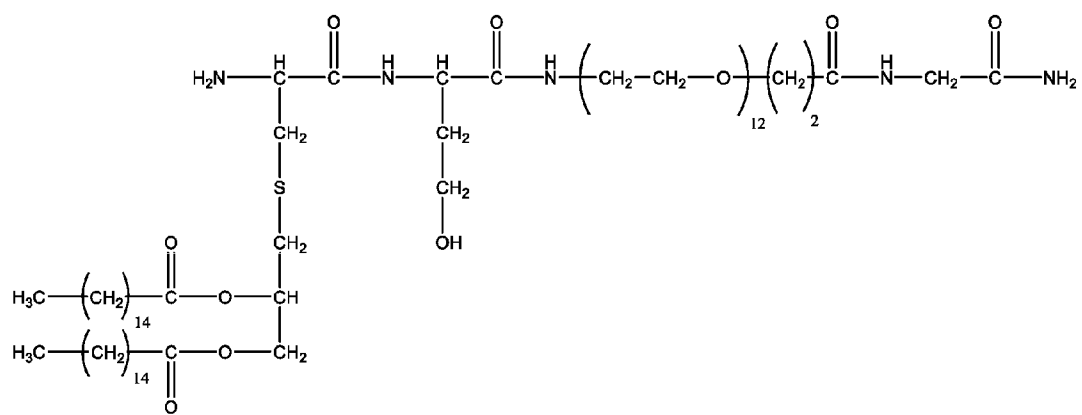
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

Este compuesto también puede denominarse en el presente documento "Pam₂Cys-Ser-PEG" o "INNA-006".

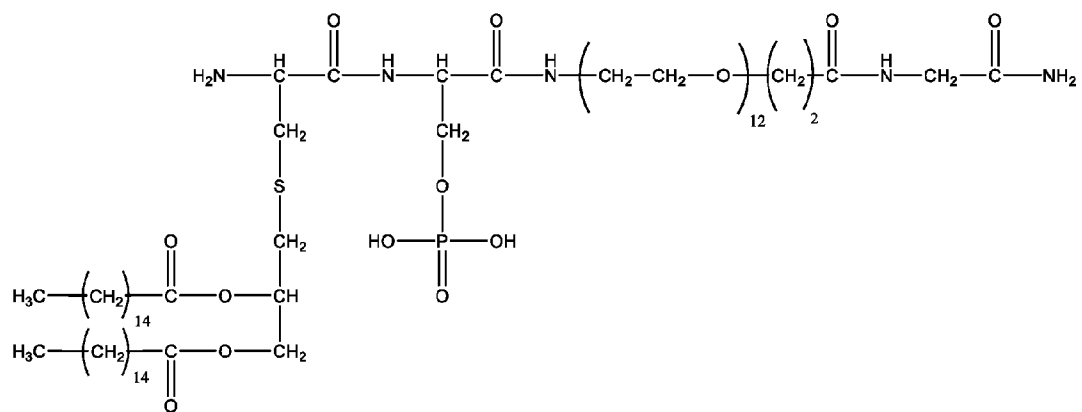
En otras realizaciones preferidas, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



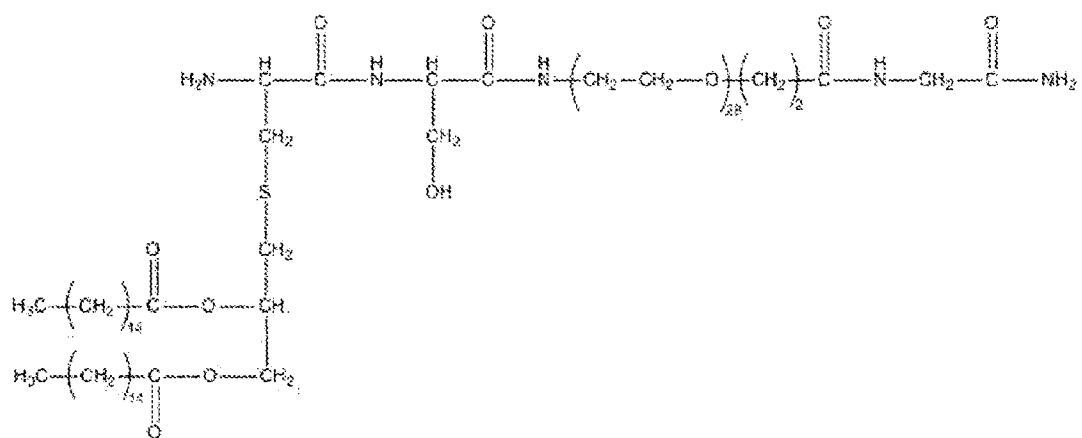
(2),



(3),

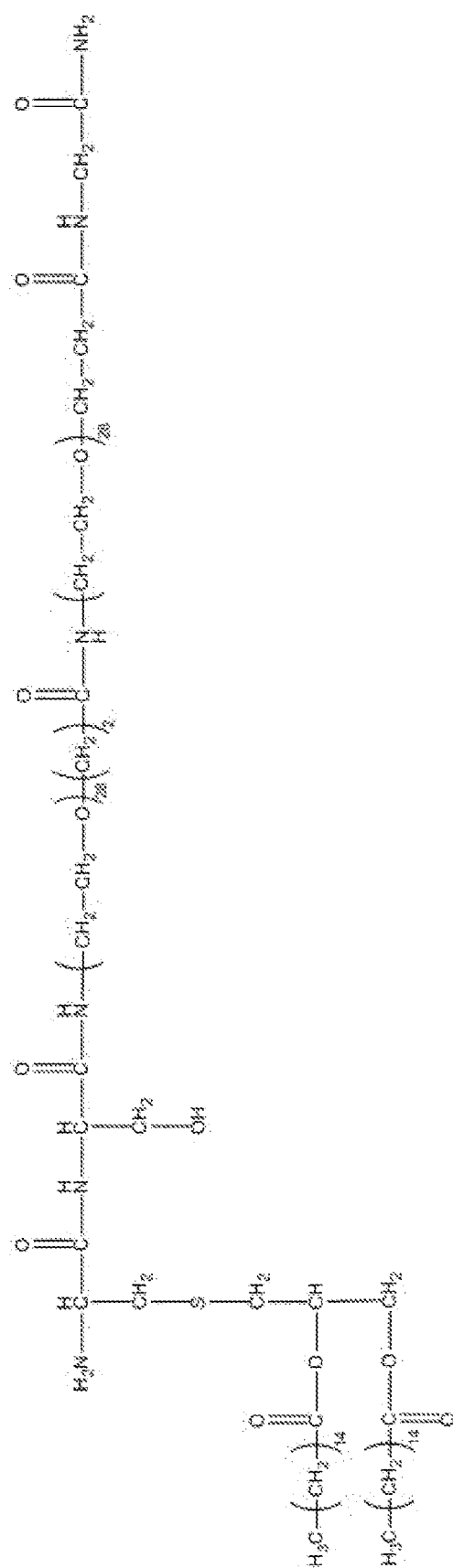


(4),



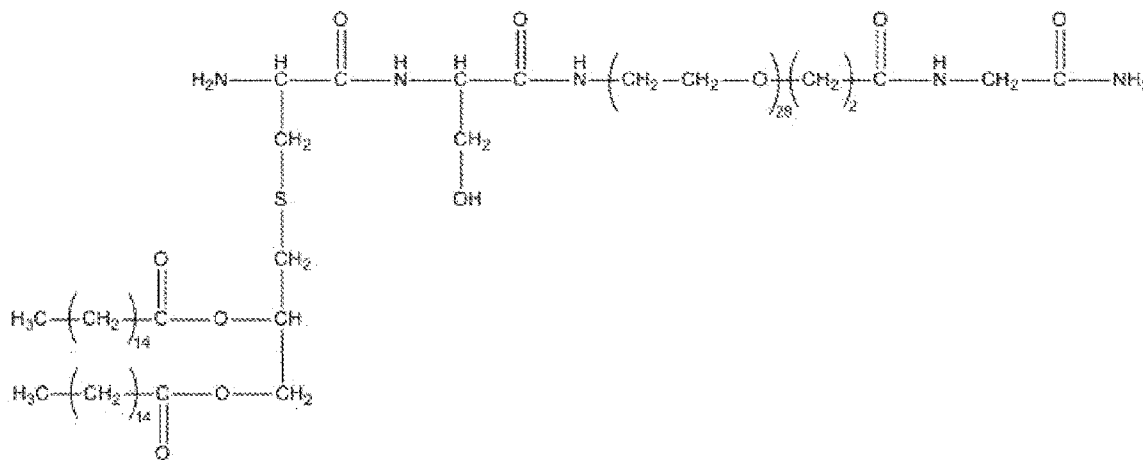
(5)

y



(6)

En una realización particularmente preferida, el compuesto es:



(5).

Como se usa en el presente documento, excepto cuando el contexto requiera lo contrario, el término "comprender" y las variaciones del término, tales como "que comprende", "comprende" y "comprendido", no pretenden excluir aditivos, componentes, números enteros o etapas adicionales.

Aspectos adicionales de la presente invención y realizaciones adicionales de los aspectos descritos en los párrafos anteriores resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción, dada a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos. La descripción de los ejemplos no pretende interpretarse como que amplía el alcance de la invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier aspecto fuera de las reivindicaciones se describe solo con fines ilustrativos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: El tratamiento con agonista de TLR-2 en dosis alta reduce el ARN viral a los 2 días después de infección. (a) Esquema que muestra la pauta de tratamiento con los agonistas de TLR-2 representativos PEG-Pam2Cys-R4 o Pam2Cys-R4. (b) Cuantificación de ARN viral que muestra que los agonistas de TLR-2 representativos PEG-Pam2Cys-R4 y Pam2Cys-R4 reducen el ARN viral con las dosis indicadas en ratones infectados con RV. Se recogieron los pulmones a los días 2 después de infección y se extrajo el ARN total y se midió el ARN viral mediante qPCR. Media \pm SEM **** $p < 0.0001$ ** $p < 0.01$, se redujo el ARN viral en comparación con los ratones infectados con RV tratados con solución salina, evaluado por ANOVA de una vía.

Figura 2: Potente efecto antiviral del tratamiento con agonista de TLR-2 en dosis alta 7 días antes de infección de ratones con RV. (a) Esquema que muestra la pauta de tratamiento con los agonistas de TLR-2 representativos PEG-Pam2Cys-R4 o Pam2Cys-R4. (b) El tratamiento con agonistas con todas las dosis dio como resultado la reducción altamente significativa de la carga viral en comparación con controles infectados con RV tratados con solución salina en presencia de los agonistas de TLR-2 representativos PEG-Pam2Cys-R4 o Pam2Cys-R4. El ARN viral en el pulmón se midió por qPCR dos días después de la infección. **** $p < 0.0001$, se redujo el ARN viral en comparación con ratones infectados con RV tratados con solución salina, medido por ANOVA de una vía.

Figura 3: Expresión de la inflamación celular de las vías respiratorias con tratamiento con agonista de TLR-2 en dosis alta 7 días antes de la infección de ratones con RV. (a-b) El análisis de las células del lavado broncoalveolar (BAL) el día 2 después de infección indicaba que todos los tratamientos aumentaban significativamente el número total de células inmunitarias, la mayoría de las cuales eran macrófagos. Se observaron mayores números de linfocitos con dosis inferiores de tratamiento con agonista. Se contaron las células inflamatorias en el BAL y se identificaron las poblaciones mediante tinción diferencial a los 2 días después de infección. Media \pm SEM ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001, aumentaron las células del BAL en los grupos tratados en comparación con los ratones infectados con RV tratados con solución salina.

Figura 4: El tratamiento con agonistas de TLR-2 en dosis altas siete días antes de la infección por RV suprime la expresión de citocinas inflamatorias. Las citocinas inflamatorias en el lavado broncoalveolar (BAL) se midieron por ELISA. (a) Se observó una producción significativamente reducida de la quimiocina CXCL1 reclutadora de neutrófilos para todos los grupos de tratamiento en comparación con ratones infectados con RV tratados con solución salina. (b) También se observó una expresión reducida de TNF α para las dosis más altas de grupos de tratamiento con agonistas en comparación con ratones infectados con RV tratados con solución salina, así como en respuesta a 1 nmol de Pam2Cys-R4. Media \pm SEM * p <0.05, ** p <0.01, se redujo el nivel de proteína en comparación con los ratones infectados con RV tratados con solución salina, evaluado por ANOVA de una vía.

Figura 5: El tratamiento con dosis baja de PEG-Pam2Cys-R4 reduce la carga viral. (a, b) Todas las dosis de PEG-Pam2Cys-R4 inhibían significativamente la replicación de RV. Las dosis indicadas de Pam2Cys-R4 también causaban una reducción significativa en el ARN viral en comparación con controles infectados con RV con solución salina, no tratados. El ARN viral en tejido pulmonar a los 2 días después de la infección se evaluó por qPCR. Media +/- SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, evaluado por ANOVA de una vía.

Figura 6: Aumento de macrófagos y linfocitos en el BAL con tratamiento con agonista de TLR-2 en dosis baja, (a, d) Pam2Cys-R4 causó aumentos significativos en el número de células inmunitarias después del tratamiento con las dosis indicadas en comparación con controles infectados con RV con solución salina, no tratados. (b, e) El aumento de células en el BAL era promovido principalmente por el aumento del número de macrófagos. (c, f) También se observaron aumentos significativos en las cantidades de números de linfocitos a las dosis indicadas. Las células se tiñeron y contaron a los 2 días después de la infección. Media +/- SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, evaluado por ANOVA de una vía.

Figura 7: El tratamiento con agonista de TLR-2 en dosis baja reduce la inflamación neutrófila viral. (a-b) También se observó una reducción significativa de neutrófilos expresada como porcentaje de las células totales del BAL o número total de neutrófilos a las dosis indicadas. Los neutrófilos se identificaron mediante tinción diferencial y se expresaron como un porcentaje de células totales del BAL a los 2 días después de infección. (c) En comparación con los ratones infectados con RV tratados con solución salina, se observaron reducciones significativas del número de neutrófilos con las dosis indicadas cuando se expresaron como número absoluto de células del BAL totales. Media +/- SEM, * = $P < 0.05$.

Figura 8: El tratamiento con agonista de TLR-2 en dosis baja produce una reducción altamente significativa de la quimiocina de neutrófilos CXCL1. (a, b) Se observó una reducción altamente significativa en la expresión de CXCL1 en respuesta a todas las dosis de Pam2Cys-R4 y PEG-Pam2Cys-R4 en comparación con controles infectados con RV con solución salina, no tratados. (c, d) El tratamiento no tenía efecto sobre la producción de TNF α . Los mediadores de proteínas en el BAL se midieron por ELISA 2 días después de la infección. Media +/- SEM **** $p < 0.0001$, evaluado por ANOVA de una vía. Comparaciones múltiples evaluadas por la prueba de Holm-Sidak.

Figura 9: Comparación del tratamiento de (i) Peg-SS-Pam2Cys, Peg-S-Pam2Cys y Pam2CysSK4; y (ii) INNA-011 y Peg-S-Pam2Cys (INNA-006) 7 días antes de la infección (intervalo de dosis 1 pmol-10 pmol) (a) El tratamiento con agonista de TLR2 produce una reducción muy significativa del número de copias de RV1B en el pulmón. El ARN viral en tejido pulmonar el día 2 p.i. se evaluó por qPCR. Media +/- SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p = 0.001$, **** $p < 0.0001$, se redujo el ARN viral en comparación con controles infectados con RV no tratados (solución salina) (número de copias de ARNv), 10 pmol de Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys (panel de reducción de rinovirus), o 2 pmol de INNA-011, cuando se evaluó por ANOVA de 1 vía. (b) Los leucocitos del BAL no aumentan significativamente mediante el tratamiento con agonista de TLR. Los leucocitos del BAL totales se evaluaron mediante colorante de exclusión de azul de tripano en un hemocitómetro 2 días después de la infección. Media +/- SEM con análisis ANOVA de 1 vía. (c) El análisis de células inflamatorias indicó que Peg-SPam2Glc e INNA-011 reducían la inflamación de neutrófilos del BAL inducida por RV, cuando se evaluó por ANOVA de 1 vía. Las células se tiñeron diferencialmente y se contaron por microscopía óptica. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, número de células significativamente diferente en comparación con solución salina/RV1B. (d-e) El tratamiento con agonista de TLR reduce CXCL1 del BAL pero no cambia los niveles de TNF- α . Los mediadores de proteínas en el BAL se midieron por ELISA el día 2 p.i. Media +/- SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, se redujo CXCL1 en comparación con el grupo de RV con solución salina por ANOVA de 1 vía.

Figura 10: Interacción de tiempos del fármaco combinados y efecto tras la infección (a-b) El tratamiento con agonista de TLR2, en diferentes puntos de tiempo y combinaciones de tiempos de administración, produce una reducción muy significativa del número de copias de RV1B en el pulmón. El ARN viral en tejido pulmonar el día 2 p.i. se evaluó por qPCR. Media +/- SEM * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, se redujo el ARN viral en comparación con los controles infectados con RV1B (solución salina) no tratados (a menos que se indique lo contrario) por ANOVA de 1 vía. (c-d) Los neutrófilos y linfocitos del BAL aumentan significativamente por el tratamiento con agonista de TLR2. Tinción diferencial de células del BAL 2 días después de infección. Media +/- SEM # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$, en comparación con Solución salina d-7+d-1/Simulado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, número de células significativamente diferente en comparación con el grupo de Solución salina d-7+d-1/RV1B (a menos que se indique lo contrario) por ANOVA de 1 vía. (e-f) Los leucocitos del BAL aumentan significativamente mediante el tratamiento con agonista de TLR2. Leucocitos del BAL totales evaluados mediante colorante de exclusión azul de tripano en un hemocitómetro y macrófagos del BAL evaluados mediante recuento celular diferencial 2 días después de la infección. Media +/- SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, en comparación con Solución salina d-7+d-1/Simulado por análisis de ANOVA de 1 vía. (g-h) El tratamiento con agonista de TLR2 el día -1 aumenta CXCL1 en el BAL en ratones infectados con RV, pero no con el tratamiento previo el día -7. Los mediadores de proteínas en el BAL se midieron por ELISA el día 2 p.i. Media +/- SEM **** $p < 0.0001$, en comparación con el grupo de RV con solución salina a menos que se indique lo contrario por ANOVA de 1 vía.

Figura 11: Estudio 1G Tratamiento durante la infección por RV (a) El tratamiento con Peg-SS-Pam2Cys y Peg-SPam2Cys durante la infección confirmada reduce el número de copias de RV1B en el pulmón. Los ratones se infectaron por vía intranasal con RV1B y se administraron por vía intranasal Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys al día siguiente. El ARN viral en el tejido pulmonar el día 2 p.i. se evaluó por qPCR. Media +/- SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

se redujo el ARN viral en comparación con el infectado por RV1B no tratado (solución salina). (b-e) El tratamiento con Peg-SS-Pam2Cys o Peg-S-Pam2Cys durante la infección activa (día 1 después de infección) aumenta drásticamente el número de neutrófilos en el BAL. Tinción diferencial de células del BAL 2 días después de la infección. Los resultados se representan gráficamente como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, número de células significativamente diferente en comparación con el grupo de RV con solución salina por ANOVA de 1 vía. (f-g) El tratamiento con Peg-SS-Pam2Cys o Peg-S-Pam2Cys el día 1 después de infección provoca la producción de citocinas inflamatorias dependiente de la dosis. Los mediadores de proteínas en el BAL se midieron por ELISA el día 2 p.i. Los resultados se representan gráficamente como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, en comparación con el grupo de RV en solución salina por ANOVA de 1 vía.

Figura 12: El tratamiento con agonista de TLR-2 reduce el nivel de replicación de rinovirus en células epiteliales asmáticas. (a) Perfil de pacientes de sujetos con asma persistente leve o persistente moderada. Se prepararon cultivos epiteliales asmáticos en interfase aire-líquido (ALI) a partir de las células epiteliales bronquiales de estos donantes asmáticos y se infectaron con rinovirus (RV) y se trataron con Pam2Cys-R4 (b) 24 horas antes de la infección por RV (pretratamiento) donde Pam2Cys-R4 redujo significativamente la carga viral después de 96 horas a 0.02 μ M; o (c) 2 horas después de la infección por RV (postratamiento) donde Pam2Cys-R4 redujo significativamente la carga viral después de 96 horas a 0.2 μ M. El ARN celular total se purificó y el nivel de ARN viral se midió por qRT-PCR a las 48 horas y 96 horas después de la infección. Media \pm SEM * $p < 0.05$, en comparación con el grupo de RV, evaluado mediante la prueba t de datos emparejados.

Figura 13: La replicación viral reducida está asociada con la menor producción de interferón. El nivel de proteína IFN β e IFN λ 1/3 en medio apical se midió por ELISA en (a, b) $n = 5$ (IFN β) o (c, d) $n = 6$ (IFN λ) cultivos en interfase aire-líquido (ALI) epiteliales asmáticos infectados con rinovirus (RV) y tratados con Pam2Cys-R4 antes (pretratamiento) o después (postratamiento) a las concentraciones indicadas. Datos media \pm SEM. Todos los valores de p se comparan con la infección por RV sola durante el punto de tiempo indicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, evaluado por la prueba de Friedman.

Figura 14: El agonista de TLR-2 puede aumentar la expresión de mediadores proinflamatorios. Nivel de proteína (a, b) IP-10 (CXCL10), (c, d) IL-6, (e, f) IL-8 y (g, h) CCL22 expresado como media \pm SEM de $n = 6$ cultivos epiteliales asmáticos, medido por ELISA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, aumentó la expresión del mediador por células infectadas con RV tratadas con Pam2Cys-R4 en comparación con células infectadas con RV no tratadas; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, aumentó la expresión del mediador en células tratadas con Pam2Cys-R4 en comparación con células no tratadas, evaluado usando la prueba de Friedman.

Figura 15: Actividad antiviral de agonistas de TLR2 y Pam2CSK4 (a-b) Se cultivaron células BCi-NS1 en ALI para lograr la diferenciación. Las células luego se pretrataron con Pam2Cys-R4 (INNA-001), Peg-SS-Pam2Cys (INNA-003), Peg-S-Pam2Cys (INNA-006) o Pam2CSK4 en concentraciones que varían de 20 nM a 0.2 nM. A las 24 h después del tratamiento, las células se infectaron con RV1B a una MDI de 0.1 y se recogieron a las 96 h después de infección. El ARN total se extrajo y se transcribió inversamente a ADNc usando cebadores hexámeros aleatorios. La carga viral se evaluó por qPCR y se expresó como número de copias y porcentaje de ARN viral en pocillos de RV (no tratados). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, se redujo el ARN viral en comparación con el grupo de RV (no tratado). $n = 2-5$ pocillos de repeticiones.

Figura 16: INNA-006 evitó la inflamación neutrófila inducida por RV y resistente a esteroides. Las células se tiñeron diferencialmente y se contaron por microscopía óptica. Media \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, aumentaron las células del BAL en comparación con Solución salina Veh PBS (asteriscos en una sola línea), Solución salina Veh RV (parte inferior de los asteriscos en dos capas) o Solución salina FP RV (parte superior de los asteriscos en dos capas) RV. ANOVA de 1 vía.

Figura 17: Producción de quimiocinas de neutrófilos resistentes a esteroides, inducida por RV suprimida por INNA-006. Los niveles de proteína CXCL1 en el BAL se midieron por ELISA en el día 2 p.i. **** $p < 0.0001$, mediador aumentado en comparación con Solución salina Veh PBS (asteriscos negros), Solución salina Veh RV (asteriscos rojos), Solución salina FP RV (asteriscos azules). ANOVA de 1 vía.

Figura 18: La carga pulmonar viral aumentó mediante el tratamiento con FP en ratones de control con vehículo, pero la eficacia antiviral del tratamiento repetido con INNA-006 se mejoró mediante FP. Se recogieron los pulmones el día 2 p.i., se extrajo el ARN total y se midió el ARN viral mediante qPCR. Media \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, aumentaron las células del BAL en comparación con la Solución salina Veh RV (asteriscos simples o dobles) o Solución salina FP RV (asteriscos por encima de la línea). # $p < 0.05$, aumentó la carga viral en comparación con el grupo de Solución salina Veh RV. ANOVA de 1 vía.

Figura 19. Comparación de las capacidades de diversos compuestos para estimular la actividad de luciferasa en un sistema indicador basado en células NF-kB. Las columnas de izquierda a derecha son: INNA-006 (o compuesto (1)); INNA-013 (o compuesto (4)); INNA-014 (o compuesto (3)); INNA-015 (o compuesto (2)); INNA-010; INNA-011 (o compuesto (5)); INNA-012 (o compuesto (6)); e INNA-009.

Figura 20: Comparación de las capacidades de INNA-006 o Pam3Cys-Ser-PEG3000 para estimular la actividad de luciferasa en un sistema indicador basado en células NF-kB.

Figura 21: Datos representativos que indican la activación específica de TLR-2 por INNA-006.

Descripción detallada de las realizaciones

A continuación se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones, se entenderá que la intención no es limitar la invención a esas realizaciones. El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones.

- 5 Con el fin de interpretar esta memoria descriptiva, los términos usados en singular incluirán también el plural y viceversa.

Las infecciones respiratorias virales son el desencadenante más importante de las exacerbaciones respiratorias, por ejemplo, exacerbaciones del asma. Los asmáticos son sensibles a los efectos más graves de los virus que normalmente causan el resfriado común, tal como el rinovirus (RV). La replicación viral en el epitelio de las vías respiratorias conduce a la producción de mediadores inflamatorios que pueden desencadenar la cascada inmunitaria que sustenta una exacerbación del asma. Los autores de la invención plantearon la hipótesis de que la activación de la inmunidad epitelial innata y/u otros mecanismos de señalización celular intracelular mediante la administración de una cantidad eficaz de un agonista de TLR2 suprimirán la replicación de RV y la producción asociada de mediadores inflamatorios. Los autores de la invención ensayaron en primer lugar esta hipótesis administrando una serie de dosis diferentes de agonistas de TLR2 antes del tratamiento con RV en un modelo *in vivo* de infección por RV. Esto se evaluó midiendo parámetros que incluían pérdida de peso, carga viral y la expresión de mediadores inflamatorios. En este estudio, los autores de la invención descubrieron que la administración de agonistas de TLR2 no inducía pérdida de peso, sino que reducía la carga viral pulmonar y reducía la inflamación inducida por virus.

Los autores de la invención ensayaron además la hipótesis anterior en un modelo terapéutico de cultivos en interfase aire-líquido (ALI) *ex vivo* del epitelio bronquial de pacientes con asma. En este modelo, la administración de agonistas de TLR2 se produjo antes o después de la infección del epitelio con RV. Los autores de la invención descubrieron que la estimulación con agonistas de TLR2 reduce la carga viral en el epitelio bronquial asmático.

Una ventaja de un aspecto de la invención es el sorprendente hallazgo de que el tratamiento con un agonista de TLR2 en el momento de la infección por RV confirmada conduce a una inhibición de la infección por RV. La invención encuentra por lo tanto una aplicación particular para sujetos diagnosticados de una infección respiratoria y a los que se les ha diagnosticado clínicamente una afección respiratoria, tal como el asma, y/o son propensos a exacerbaciones respiratorias. Otra ventaja de un aspecto de la invención es el sorprendente hallazgo de que el tratamiento con dosis más bajas de agonistas de TLR2 era al menos tan eficaz, si no más, que las dosis más altas ensayadas de los agonistas de TLR2. Por lo tanto, la invención encuentra una aplicación particular cuando se requieren o desean niveles bajos de activación del sistema inmunitario innato. Una ventaja adicional de un aspecto de la invención es el sorprendente hallazgo de que el agonista de TLR2 PEG-Pam2Cys-R4 presentaba efectos antivirales y antiinflamatorios superiores en modelos de infección mediada por RV. Por lo tanto, es probable que los agonistas con características funcionales análogas presenten propiedades similares en la inhibición de la infección mediada por RV y, por lo tanto, en la prevención y/o el tratamiento de la exacerbación del asma. Otra ventaja más de un aspecto de la invención es el sorprendente hallazgo de que la respuesta antivírica descrita en el presente documento no depende de respuestas mediadas por IFN. Esto es significativo porque la expresión de interferón es extremadamente variable, particularmente en formas más graves de asma, y un mecanismo terapéutico que se basa en la regulación de IFN podría ser poco fiable y por lo tanto problemático sin efecto terapéutico o con inducción de exceso de inflamación.

Los receptores de tipo Toll (TLR) son receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados por diversos tipos de células que desempeñan un papel importante tanto en la inmunidad innata como adaptativa. Las células del sistema inmunitario innato responden a la activación de TLR produciendo citocinas y quimiocinas proinflamatorias que señalizan la eliminación de los patógenos y daño a sí mismos. Tras el acoplamiento con ligandos específicos, la activación de TLR conduce a la activación de factores de transcripción tales como factor nuclear kappa B (NF)-kB, proteína activadora-1 (AP-1) y factores reguladores de interferón (IRF) a través de varias moléculas adaptadoras que incluyen el gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), dominio del receptor de interleucina 1 de Toll (TIR) que contiene proteína adaptadora TIRAP y adaptador que contiene dominio TIR que induce interferón-beta TRIF, para regular la expresión de citocinas.

Hay varios TLR que pertenecen a esta familia de proteínas receptoras de membrana que incluyen TLR1, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 y TLR9.

Como se usa en el presente documento, el término "TLR2" pretende significar la proteína receptora de tipo Toll 2. En seres humanos, TLR2 está codificado por el gen *TLR2*. TLR2 se expresa en la superficie de ciertas células y desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata.

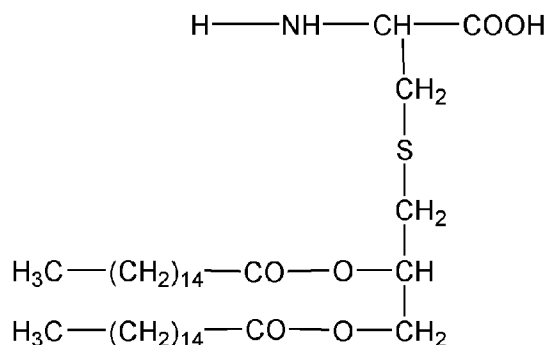
Un agonista de TLR2 es un agente que se une al receptor de tipo Toll 2. El agonista de TLR2 puede unirse a, y activar, TLR2 como un homodímero o heterodímero.

En cualquier realización de la invención, el agonista de TLR2 comprende un lipopéptido o un resto lipídico seleccionado de palmitoilo, miristoilo y estearoilo. El agonista de TLR2 puede seleccionarse del grupo que consiste en: Pam2Cys, Pam3Cys y Ste2Cys. En una realización preferida, el agonista de TLR2 comprende Pam2Cys.

Un lipopéptido de ejemplo según cualquier realización de la presente invención es el lipopéptido "Pam2Cys". Un

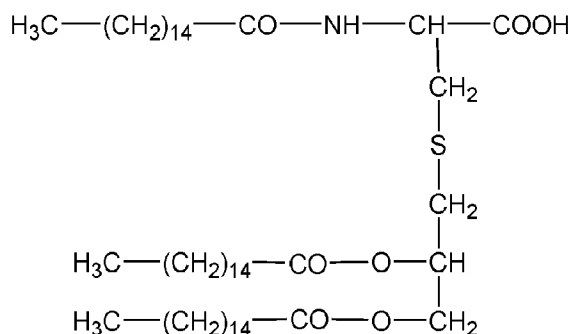
experto en la técnica entenderá que el término "lipopéptido" significa cualquier composición de materia que comprende uno o más restos lipídicos y una o más secuencias de aminoácidos que están conjugadas. Se ha sintetizado "Pam2Cys" (también conocido como dipalmitoil-S-gliceril-cisteína o S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína y corresponde al resto lipídico de MALP-2, un lipopéptido activador de macrófagos aislado de *Mycoplasma fermentans*. Se sabe que Pam2Cys es un ligando de TLR2.

Pam2Cys tiene la estructura:



Como se usa en el presente documento, la referencia a "S" como se indica en la estructura química anterior define un átomo de azufre.

- 10 Otro lipopéptido de ejemplo es el lipoaminoácido N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína, también conocido como Pam3Cys o Pam3Cys-OH es una versión sintética del resto N-terminal de la lipoproteína de Braun que se extiende por las membranas interna y externa de las bacterias Gram negativas, Pam3Cys tiene la siguiente estructura:



- 15 La patente de Estados Unidos N.º 5,700,910 describe varias N-acil-S-(2-hidroxi)alquil]cisteínas para usar como compuestos intermedios en la preparación de lipopéptidos que se usan como adyuvantes sintéticos, estimulantes de linfocitos B, estimulantes de macrófagos o vacunas sintéticas. El documento US 5,700,910 también enseña el uso de tales compuestos como compuestos intermedios en la síntesis de Pam3Cys-OH y de lipopéptidos que comprenden este lipoaminoácido o un análogo del mismo en el extremo N-terminal.

- 20 Otros restos lipídicos que pueden usarse para dirigirse a los TLR de la superficie celular son palmitoil, miristoil o estearoil.

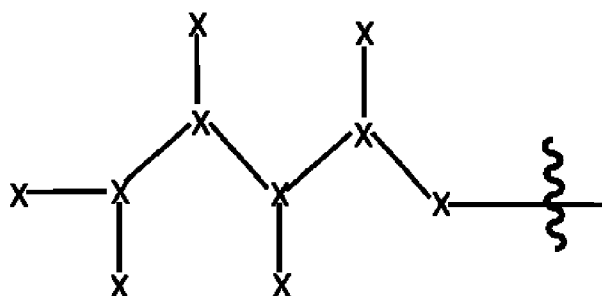
- Además de Pam2Cys y Pam3Cys, la presente invención también contempla el uso de Ste2Cys según la presente invención. Lau2Cys y Oct2Cys se describen pero no se reivindican. Los expertos en la técnica serán conscientes de que Ste2Cys también se conoce como S-[2,3-bis(estearoiloxi)propil]cisteína o diestearoil-S-gliceril-cisteína; que Lau2Cys también se conoce como S-[2,3-bis(lauroiloxi)propil]cisteína o dilauroil-S-gliceril-cisteína; y que Oct2Cys también se conoce como S-[2,3-bis(octanoiloxi)propil]cisteína o dioctanoil-S-gliceril-cisteína.

- Otros agonistas de TLR2 adecuados incluyen, pero no se limitan a, lipopéptidos triacilados y diacilados sintéticos, FSL-1 (una lipoproteína sintética derivada de *Mycoplasma salivarium* 1), Pam3Cys (tripalmitoil-S-gliceril-cisteína) y S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2R,S)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteína, donde "Pam3" es "tripalmitoil-S-gliceril". Los derivados de Pam3Cys también son agonistas de TLR2 adecuados, donde los derivados incluyen, pero no se limitan a: S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-R,S)-propil]-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(Lys)4-hidroxitrihidrocloruro; Pam3Cys-Ser-Ser-Asn-Ala; Pam3Cys-Ser-(Lys)4; Pam3Cys-Ala-Gly; Pam3Cys-Ser-Gly; Pam3Cys-Ser; Pam3Cys-Ser; Pam3Cys-OMe; Pam3Cys-OH; PamCAG, palmitoil-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-Ala-Gly-OH, y similares.

- Otros ejemplos no limitantes de agonistas de TLR2 adecuados son Pam2CSK4 Pam2CysSK4 (dipalmitoil-S-gliceril cisteína-serina-(lisina)4; o Pam2Cys-Ser-(Lys)4) es un lipopéptido diacilado sintético. Otros agonistas sintéticos de TLR incluyen los descritos, p. ej., en Kellner et al. (1992) *Biol. Chem.* 373:1:51-5; Seifer et al. (1990) *Biochem. J.* 26:795-802; y Lee et al. (2003) *J. Lipid Res.*, 44:479-486.

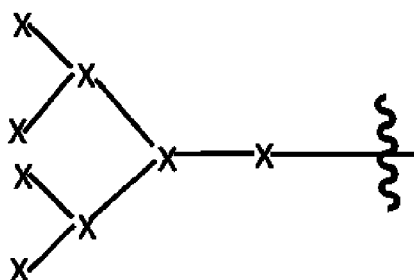
Un agonista de TLR2 para usar según la invención está unido a un resto solubilizante que comprende un PEG para aumentar la solubilidad del agonista de TLR2. Como entenderán los expertos en la técnica, los agonistas de TLR2 son típicamente no polares y, por consiguiente, aunque son solubles en disolventes no polares, son sólo menos solubles en disolventes polares y acuosos.

- 5 Opcionalmente, el agente solubilizante comprende además un péptido lineal o ramificado. Típicamente, el péptido lineal o ramificado contiene aminoácidos cargados positiva o negativamente. Los aminoácidos cargados positivamente pueden ser lisina, arginina, histidina, ornitina o combinaciones de los mismos. El péptido ramificado o lineal puede contener al menos un resto de lisina o arginina. Preferiblemente, los aminoácidos cargados son terminales, por ejemplo, N-terminales. Los péptidos ramificados pueden tener una de las siguientes estructuras.



10

o



15

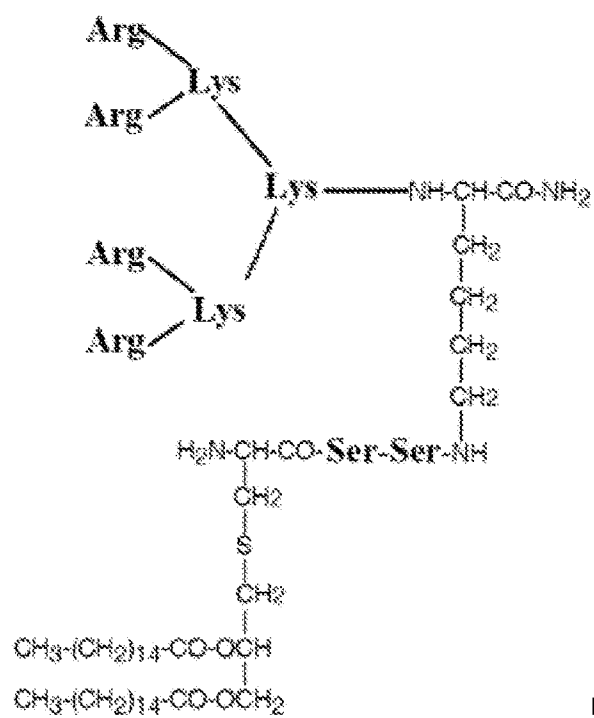
En las estructuras anteriores, X puede ser independientemente un resto cargado, o bien un resto cargado positiva o negativamente. Preferiblemente, los aminoácidos cargados positivamente son lisina, arginina, histidina u ornitina. Preferiblemente, los aminoácidos cargados negativamente son glutamato o aspartato.

Como se usa en el presente documento, "PEG" se refiere al compuesto polimérico polietilenglicol. A menos que se defina lo contrario, la referencia a "PEG" incluye cualquier longitud de polímero de óxido de etileno. La referencia a PEG también incluye PEG sustituido.

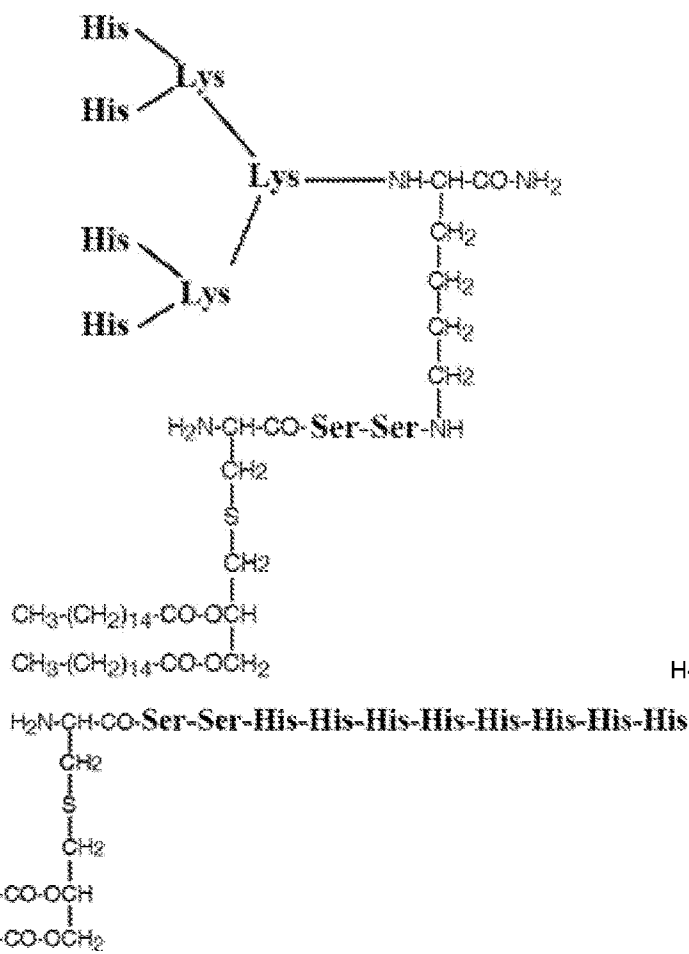
20

El compuesto o grupo funcional que puede actuar como agente solubilizante comprende "PEG" (o polietilenglicol) y opcionalmente uno o más de un polipéptido polar tal como "R4", un complejo de tetraarginina hiperramificada; "H4", un complejo de tetrahistidina hiperramificada; "H8", un péptido lineal que contiene restos histidina; y "E8" un péptido lineal que contiene restos glutamato. También se contemplan otros agentes solubilizantes de lípidos lineales y ramificados, incluyendo un péptido hiperramificado que contiene restos glutamato (véase, por ejemplo, "E8 ramificado", más adelante). R4, H4, H8 y E8 han sido descritos previamente en el documento PCT/AU2009/000469 (WO/2010/115230) y presentan las siguientes estructuras:

25

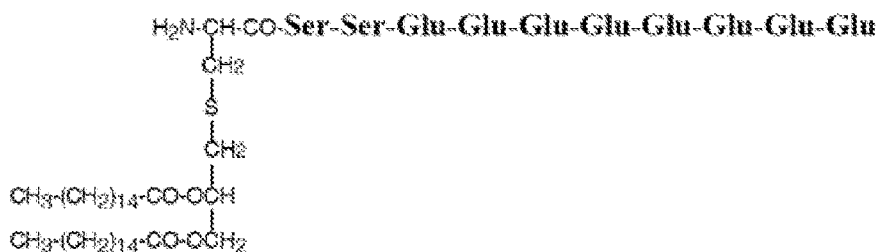


R4 de ejemplo

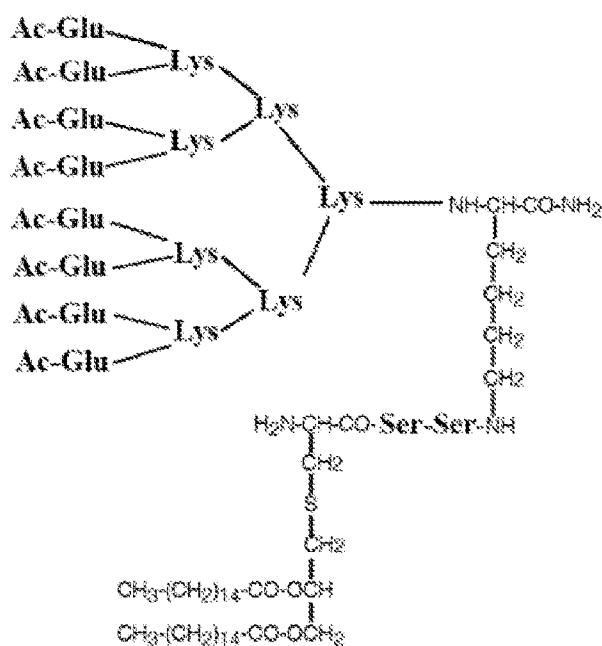


H4 de ejemplo

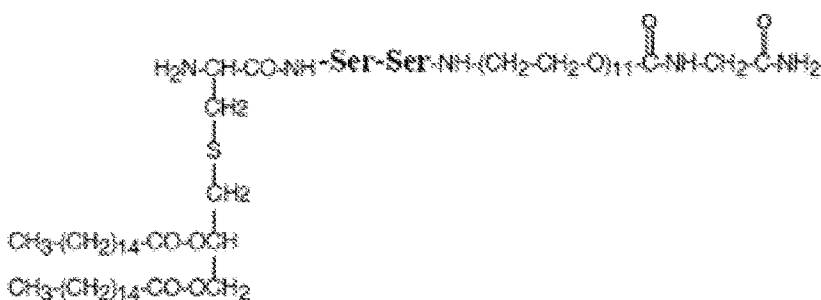
H8 de ejemplo



E8 de ejemplo

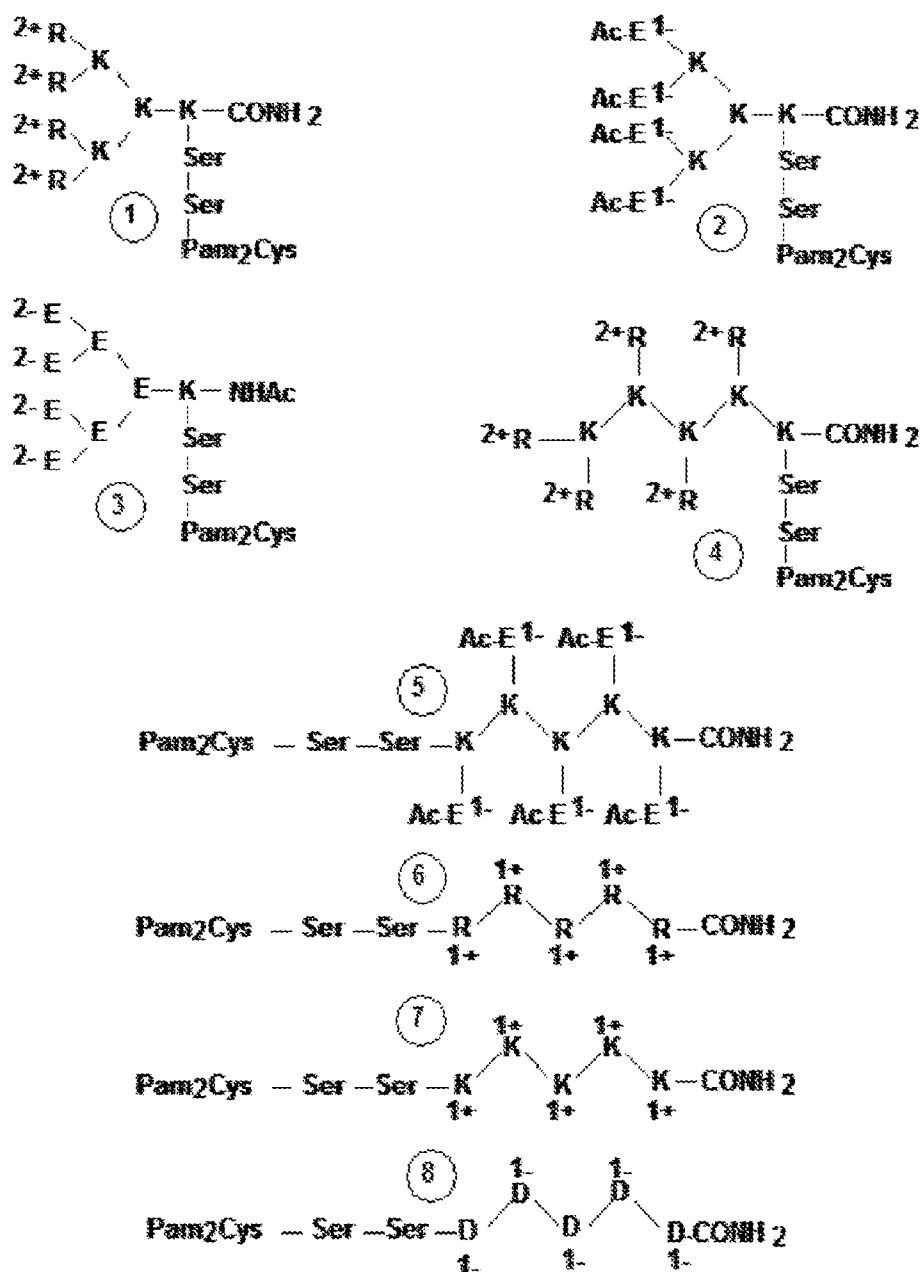


E8 ramificado de ejemplo



PEG de ejemplo

A continuación se muestran representaciones esquemáticas de algunos ejemplos de composiciones inmunogénicas ramificadas (estructuras 1-5) y lineales (estructuras 6-8) que comprenden aminoácidos cargados positivamente (arginina, R; lisina, K) o cargados negativamente (ácido aspártico, D; ácido glutámico, E) en posiciones terminales de manera que sus respectivas cargas electrostáticas se presentan al entorno. Cada composición inmunogénica también contiene dipalmitoil-S-gliceril-cisteína (Pam2Cys) que es un ligando para el receptor de tipo Toll 2. También se incorporan dos restos de serina (Ser). En el caso de la construcción 2, la estructura peptídica se ensambló en la dirección N→C, todas las demás estructuras mostradas en la figura se ensamblaron C→N. Las cargas electrostáticas positivas y negativas se muestran como 2-, 2+, 1-, 1+, etc., dependiendo del tamaño de carga. Ac = grupo acetilo usado para suprimir la carga positiva de grupos alfa-amino en el caso de ácido glutámico situado N-terminal.



Un experto en la técnica apreciará que la presente invención no se limita a los compuestos particulares o grupos funcionales ilustrados que pueden actuar como agentes solubilizantes, y que otros compuestos adecuados o grupos funcionales incluyendo aquellos que pueden actuar como agentes solubilizantes conocidos en la técnica pueden usarse según la presente invención, tales como carbohidratos, con la condición de que el agente solubilizante comprenda también PEG.

La forma en que los agentes solubilizantes pueden conjugarse con un lípido según la presente invención sería bien conocida por un experto en la técnica. Por ejemplo, está prevista la conjugación mediante la química de Fmoc, mediante un puente disulfuro o tioéter, o mediante química de oxima. En una realización particular de la presente invención, se preparó una forma soluble de Pam2Cys mediante la adición de O-(N-Fmoc-2-aminoetil)-O'-(2-carboxietil)-undecaetilenglicol (Fmoc-PEOn-OH, Merck Ltd) a Pam2Cys. Esto dio como resultado la formación de una forma PEGilada del lípido, Pam2Cys-PEG₁₁ que es entonces adecuado para la administración a un sujeto.

Según la presente invención, el resto de TLR2 comprende un conjugado que comprende Pam2Cys conjugado con PEG. En una forma preferida según cualquier realización de la presente invención, el resto de TLR2 comprende un conjugado que comprende Pam2Cys conjugado con PEG₁₁ o PEG₁₂. Preferiblemente, de Pam2Cys y PEG₁₁ o PEG₁₂ están separadas por al menos dos serinas (PEG₁₁-SS-Pam2Cys o PEG₁₂-SS-Pam2Cys).

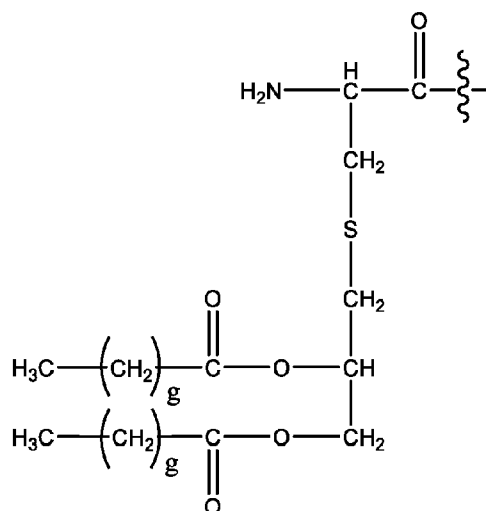
Como se usa en el presente documento, la referencia a un agonista de TLR2 también incluye una sal, solvato, polimorfo o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

A continuación se describen compuestos adicionales que comprenden un agonista de TLR2 que son útiles en cualquier aspecto de la presente invención.

En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 comprende la estructura:

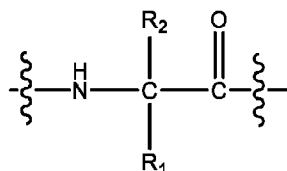
5 A - Y - B

en donde A comprende o consiste en:



en donde cada g es independientemente 12, 14 o 16;

Y es



10 en donde R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH(CH₃)OH y -CH₂OPO(OH)₂, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R₁ y R₂ no son ambos H;

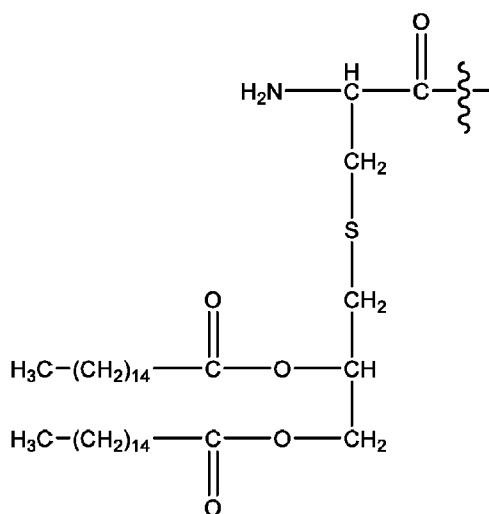
y

15 B comprende o consiste en polietilenglicol (PEG),
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

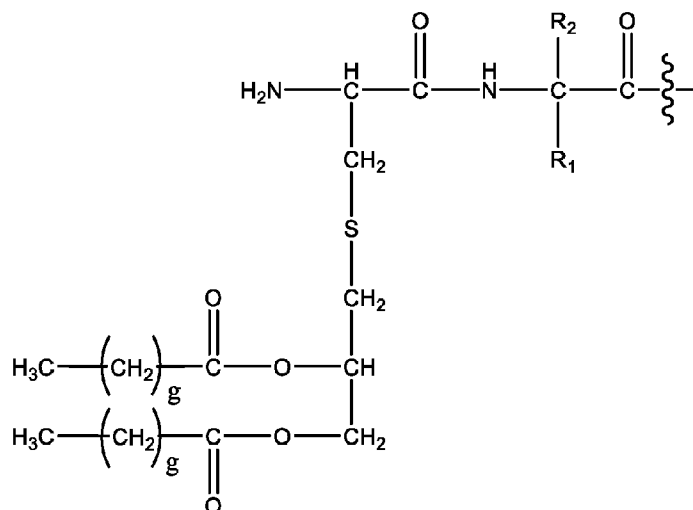
En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 comprende Pam2Cys y PEG, en donde Pam2Cys y PEG están unidos por un resto de serina, homoserina, treonina o fosfoserina,

en donde

20 Pam2Cys en el compuesto tiene la estructura:



En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que comprende:

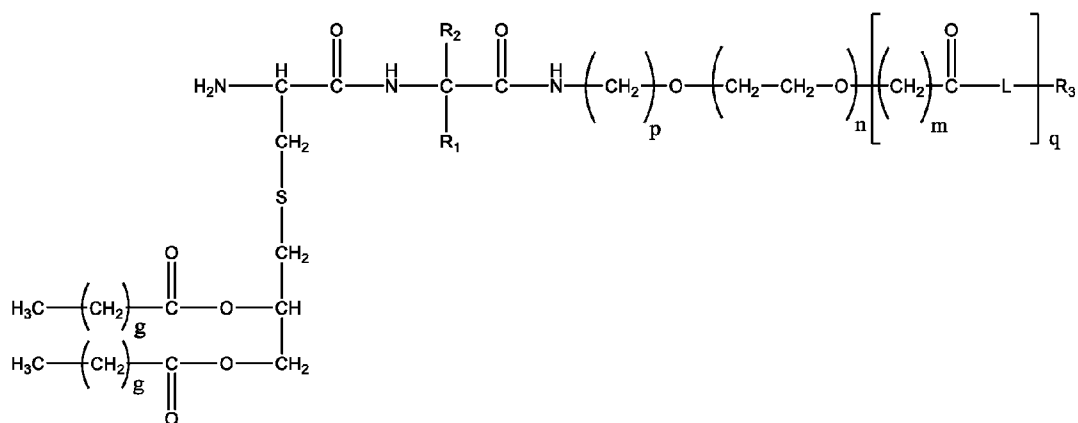


5 en donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

covalentemente unido a polietilenglicol (PEG),

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 es un compuesto de fórmula (I):



(I)

en donde

n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

5 cada g es independientemente 12, 14 o 16;

p es 2, 3 o 4;

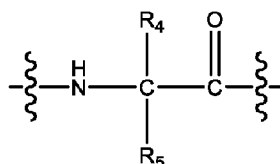
q es nulo o 1;

10 R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

en donde cuando $q = 1$, R_3 es $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

en donde cuando $q = 0$, R_3 es H;

L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:



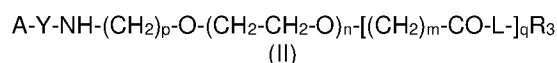
15

en donde R_4 es H; y

R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido

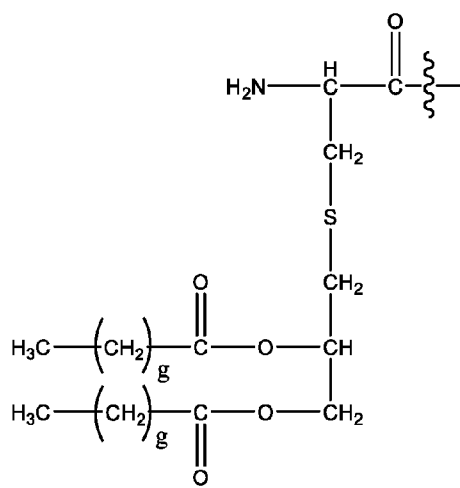
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 es un compuesto de fórmula (II):

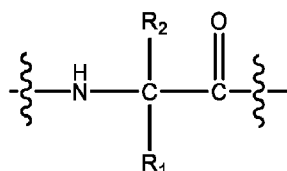


en donde

A tiene la estructura:



Y es



- 5 en donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

cada g es independientemente 12, 14 o 16;

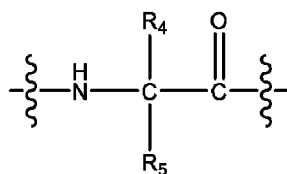
- 10 p es 2, 3 o 4;

q es nulo o 1;

en donde cuando $q = 1$, R_3 es $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

en donde cuando $q = 0$, R_3 es H;

- 15 L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:

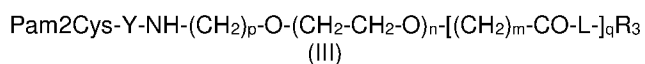


en donde R_4 es H; y

R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

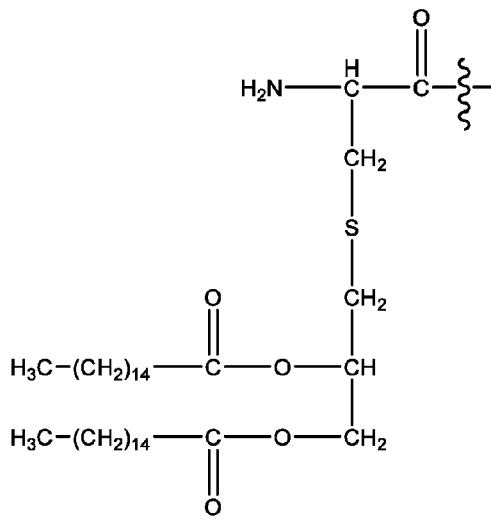
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 es un compuesto de fórmula (III):

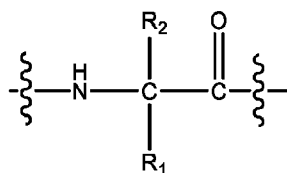


en donde

Pam2Cys tiene la estructura:



Y es:



- 5 en donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;

n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

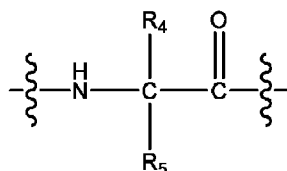
- 10 p es 2, 3 o 4;

q es nulo o 1;

en donde cuando $q = 1$, R_3 es H, $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

en donde cuando $q = 0$, R_3 es H;

- 15 L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:

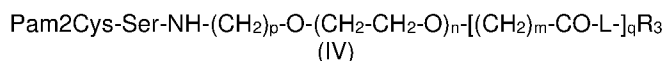


en donde R_4 es H; y

R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

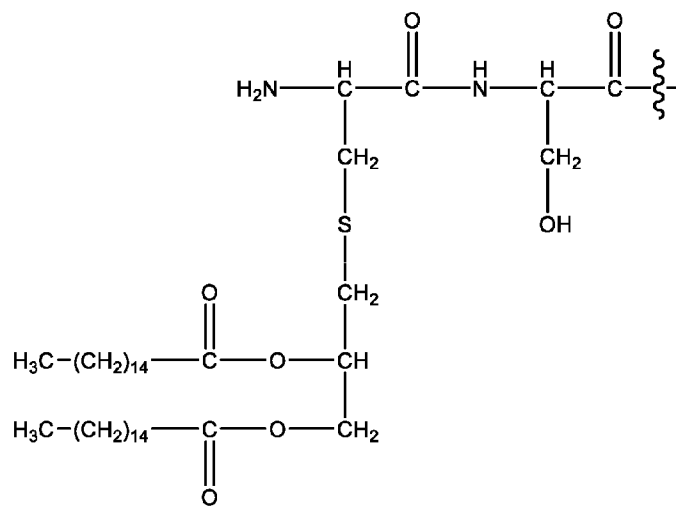
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 es un compuesto de fórmula (IV):



en donde

Pam2Cys-Ser tiene la estructura:



n es de 3 a 100;

5 m es 1, 2, 3 o 4;

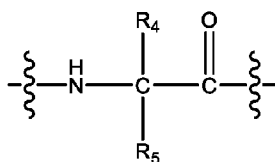
p es 2, 3 o 4;

q es nulo o 1;

en donde cuando q = 1, R₃ es -NH₂ u -OH;

en donde cuando q = 0, R₃ es H;

10 L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:

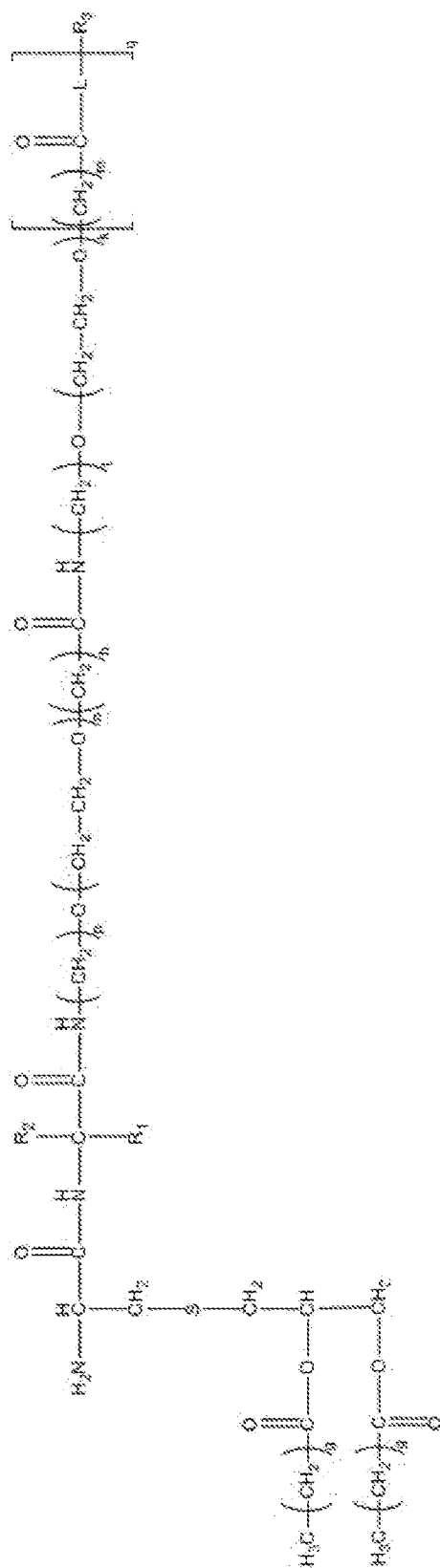


en donde R₄ es H; y

R₅ es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

15 o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto tiene la fórmula (V):



en donde

n es de 3 a 100;

k es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

cada g es independientemente 12, 14 o 16;

p es 2, 3 o 4;

t es 2, 3 o 4;

5 h es 1, 2, 3 o 4;

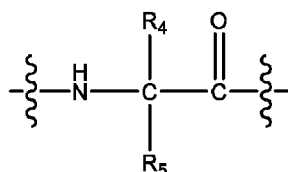
q es nulo o 1;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH(CH₃)OH y -CH₂OPO(OH)₂, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R₁ y R₂ no son ambos H;

10 en donde cuando q = 1, R₃ es -NH₂ u -OH;

en donde cuando q = 0, R₃ es H;

L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:

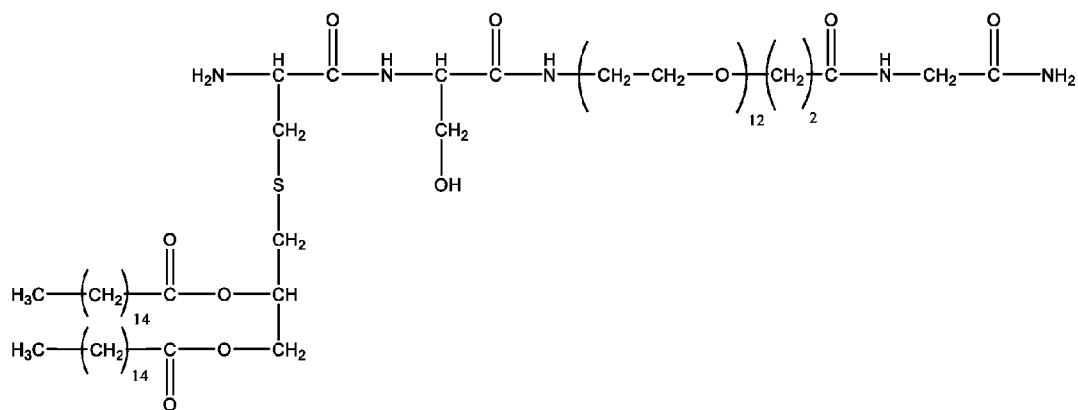


15 en donde R₄ es H; y

R₅ es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización preferida, el compuesto tiene la estructura del compuesto (1):

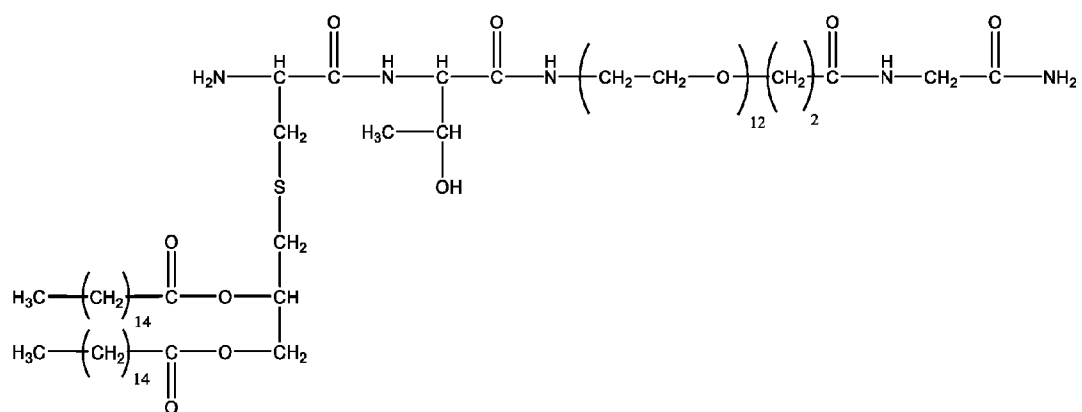


(1)

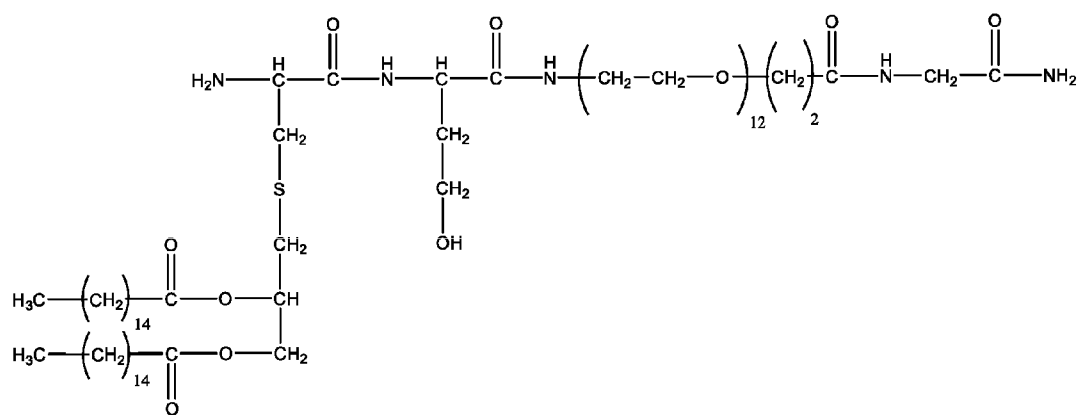
20 o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

Este compuesto también puede denominarse en el presente documento "Pam₂Cys-Ser-PEG" o "INNA-006".

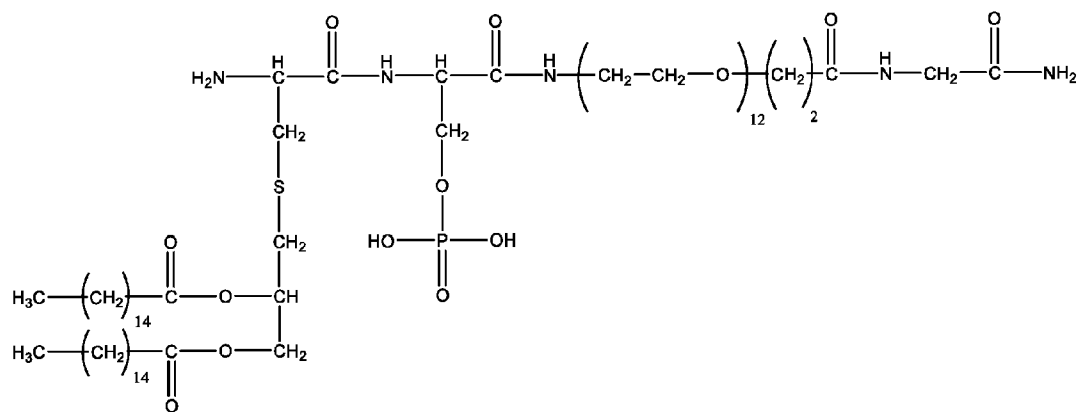
En otras realizaciones preferidas, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



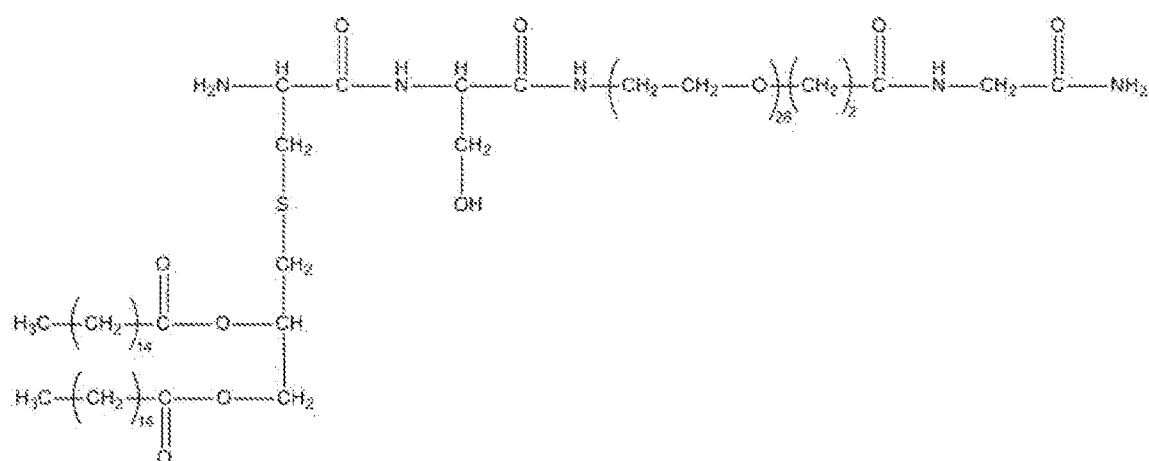
(2),



(3),

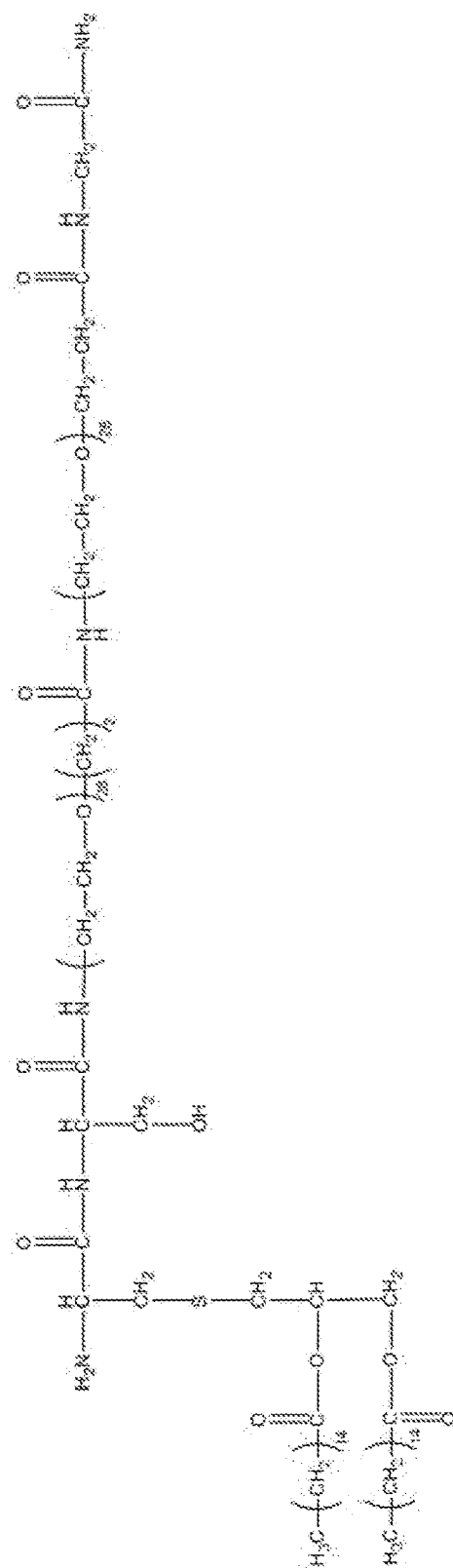


(4),



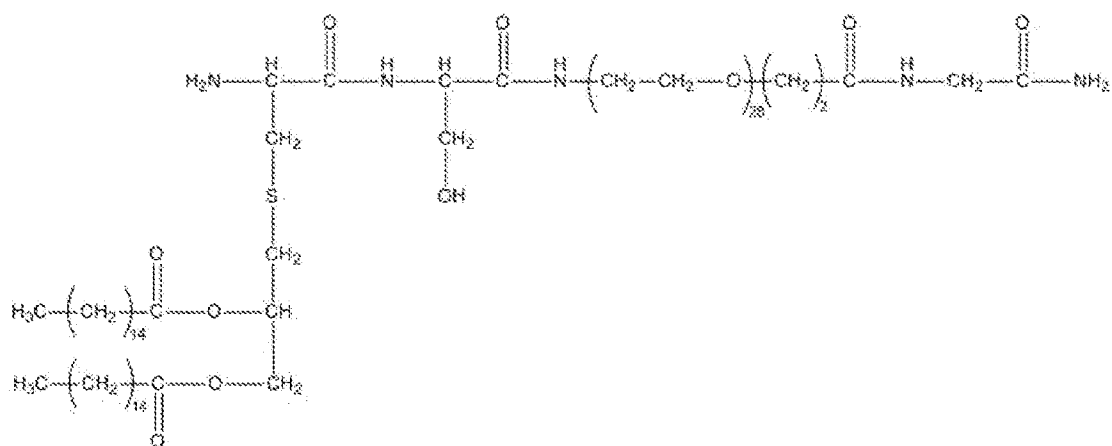
(5)

y



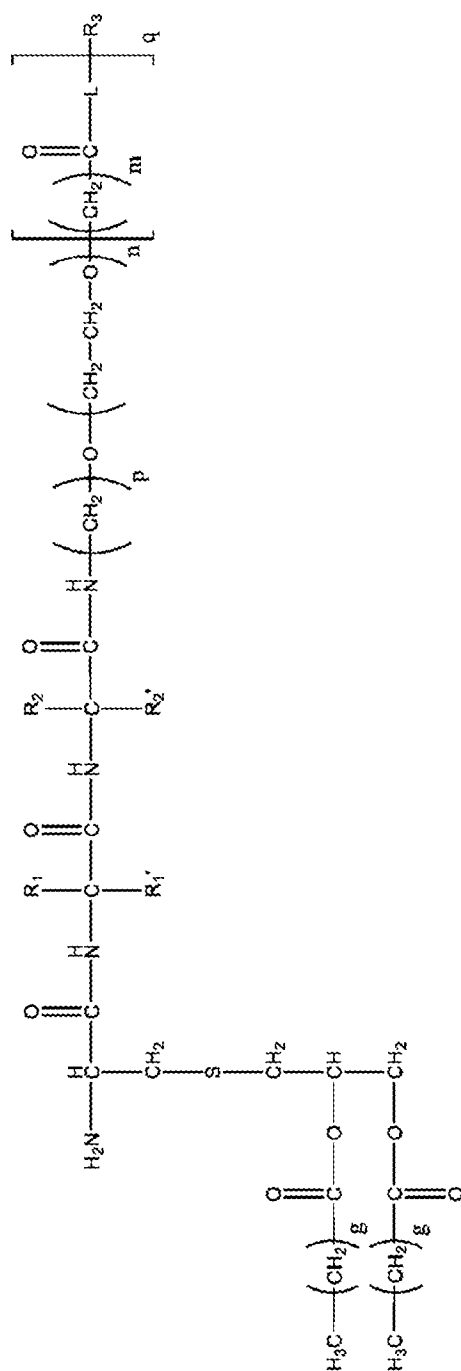
(6)

En una realización particularmente preferida, el compuesto es:



(5).

En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 es un compuesto de fórmula (Ia):



(Ia)

en donde

n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

5 cada g es independientemente 12, 14 o 16;

p es 2, 3 o 4;

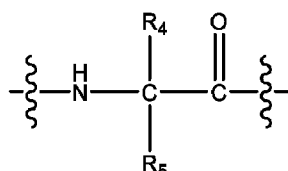
q es nulo o 1;

R_1 , R_1' , R_2 y R_2' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_1' no son ambos H, y R_2 y R_2' no son ambos H;

en donde cuando q es nulo, R_3 es H;

5 en donde cuando q es 1, R_3 es $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:



en donde R_4 es H; y

10 R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

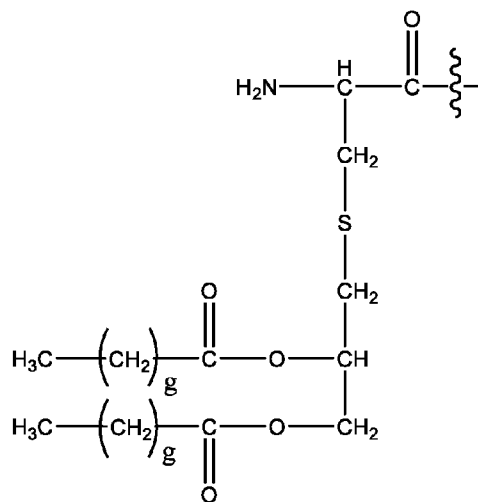
En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 es un compuesto de fórmula (IIa):

15
$$\text{A-Y-NH}-(\text{CH}_2)_p\text{-O}-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{---}[(\text{CH}_2)_m\text{-CO-L}]_q\text{R}_3$$

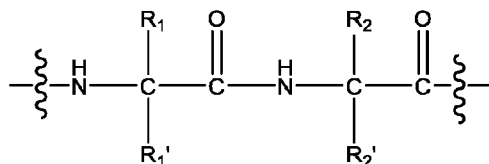
(IIa)

en donde

A tiene la estructura:



Y es



20 en donde R_1 , R_1' , R_2 y R_2' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_1' no son ambos H, y R_2 y R_2' no son ambos H;

n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

cada g es independientemente 12, 14 o 16;

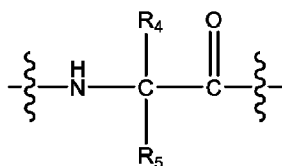
p es 2, 3 o 4;

q es nulo o 1;

5 en donde cuando q es nulo, R₃ es H;

en donde cuando q es 1, R₃ es -NH₂ u -OH;

L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:



10 en donde R₄ es H; y

R₅ es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

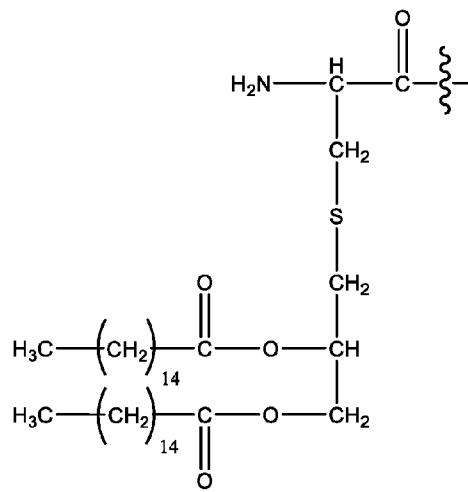
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 es un compuesto de fórmula (IIIa):

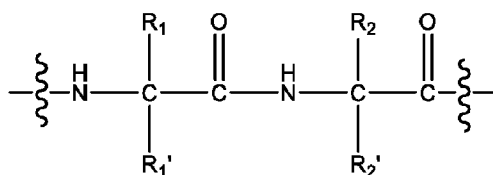
15 Pam2Cys-Y-NH-(CH₂)_p-O-(CH₂-CH₂-O)_n-[(CH₂)_m-CO-L]_qR₃
(IIIa)

en donde

Pam2Cys tiene la estructura:



20 Y es



en donde R₁, R₁', R₂ y R₂' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH(CH₃)OH y -CH₂OPO(OH)₂ en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R₁ y R₁' no son ambos H, y R₂ y R₂' no son ambos H;

n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

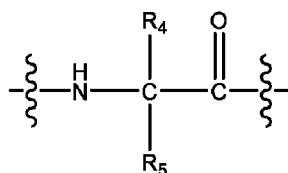
p es 2, 3 o 4;

q es nulo o 1;

5 en donde cuando q es nulo, R₃ es H;

en donde cuando q es 1, R₃ es -NH₂ u -OH;

L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:



10 en donde R₄ es H; y

R₅ es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

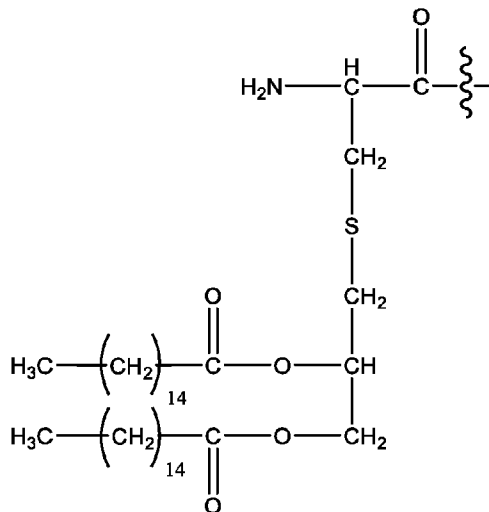
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 es un compuesto de fórmula (IVa):

15 Pam2Cys-Ser-Ser-NH-(CH₂)_p-O-(CH₂-CH₂-O)_n-[(CH₂)_m-CO-L]_qR₃
(IVa)

en donde

Pam2Cys tiene la estructura:



20 n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

p es 2, 3 o 4;

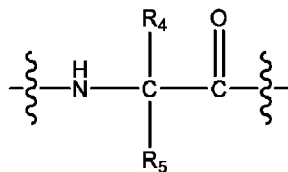
q es nulo o 1;

25 R₁, R₁', R₂ y R₂' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH(CH₃)OH y -CH₂OPO(OH)₂, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R₁ y R₁' no son ambos H, y R₂ y R₂' no son ambos H;

en donde cuando q es nulo, R₃ es H;

en donde cuando q es 1, R₃ es -NH₂ u -OH;

L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:



5

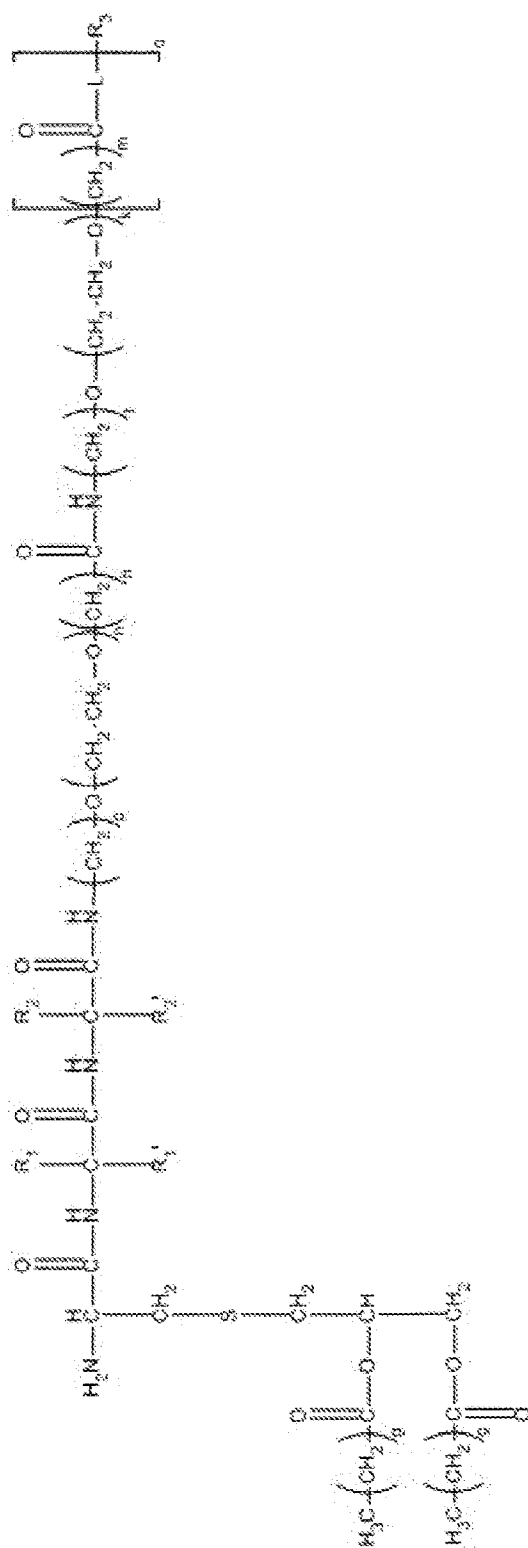
en donde R₄ es H; y

R₅ es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

En cualquier aspecto de la presente invención, el compuesto que comprende un agonista de TLR2 es un compuesto de fórmula (Va):



(Va)

en donde

n es de 3 a 100;

k es de 3 a 100;

h es 1, 2, 3 o 4;

m es 1, 2, 3 o 4;

cada g es independientemente 12, 14 o 16;

p es 2, 3 o 4;

5 t es 2, 3 o 4;

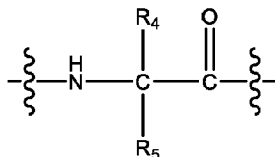
q es nulo o 1;

R_1 , R_1' , R_2 y R_2' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_1' no son ambos H, y R_2 y R_2' no son ambos H;

10 en donde cuando q es nulo, R_3 es H;

en donde cuando q es 1, R_3 es $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:

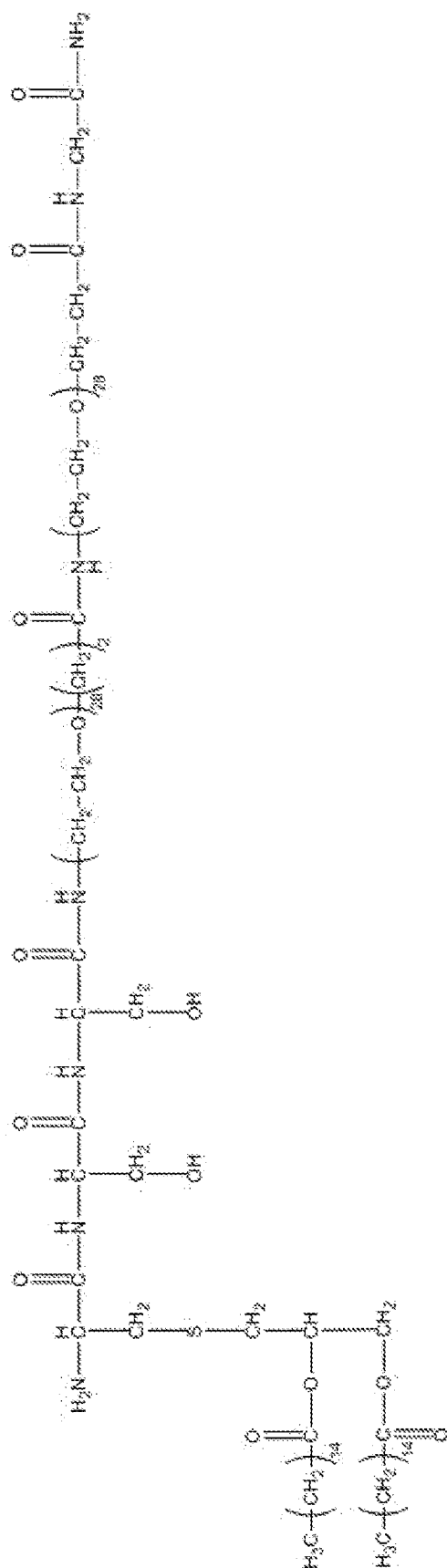


15 en donde R_4 es H; y

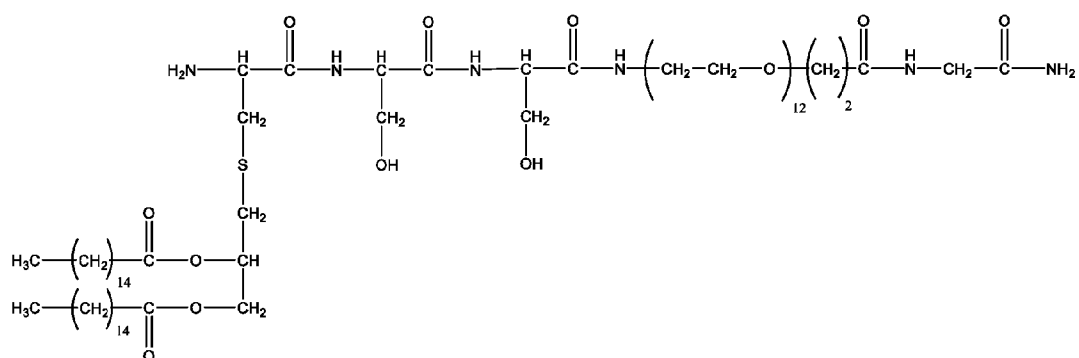
R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto tiene la estructura:



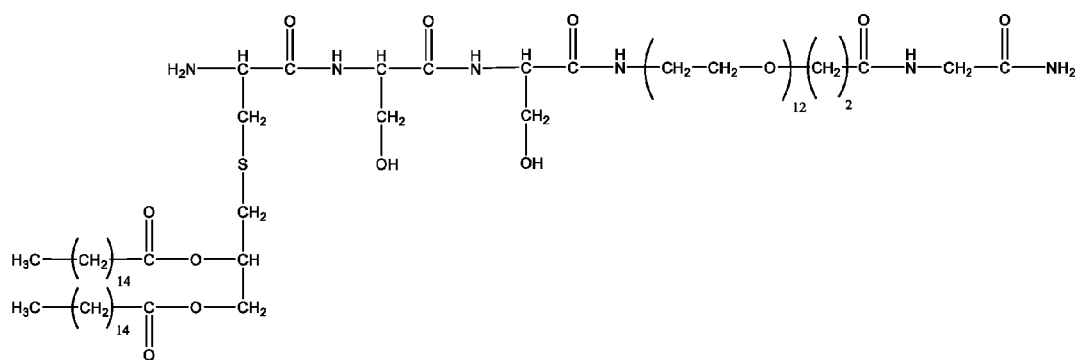
En una realización particularmente preferida de la invención, el compuesto tiene la estructura del compuesto (1a):



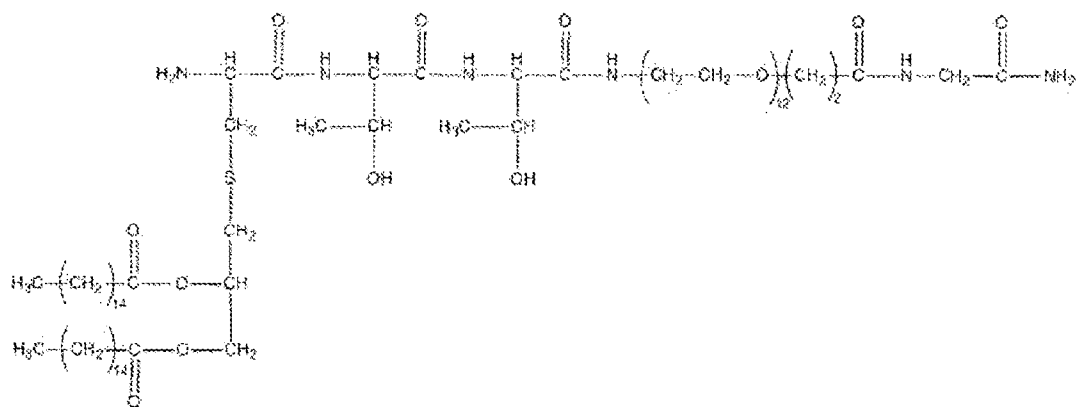
(1a)

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

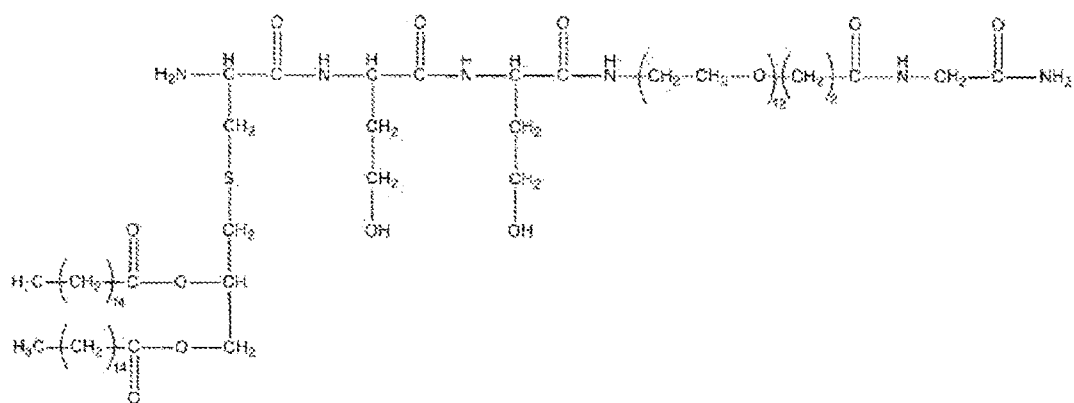
En otras realizaciones preferidas, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



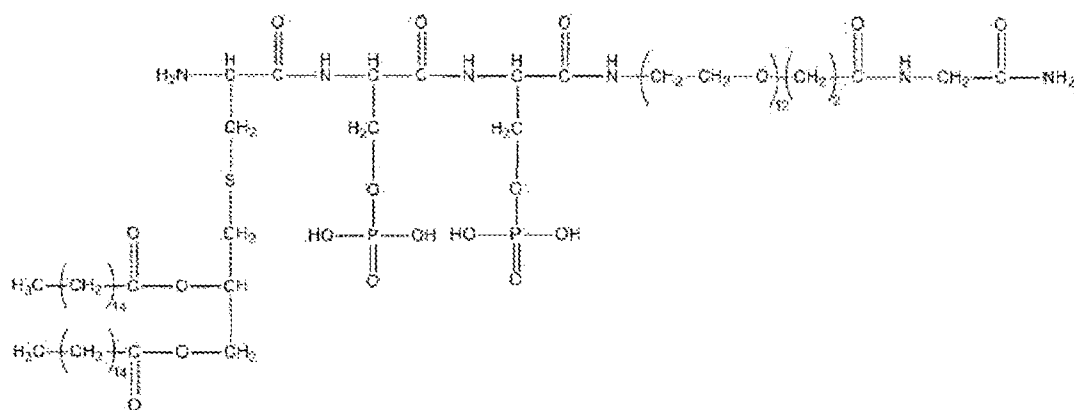
(1a),



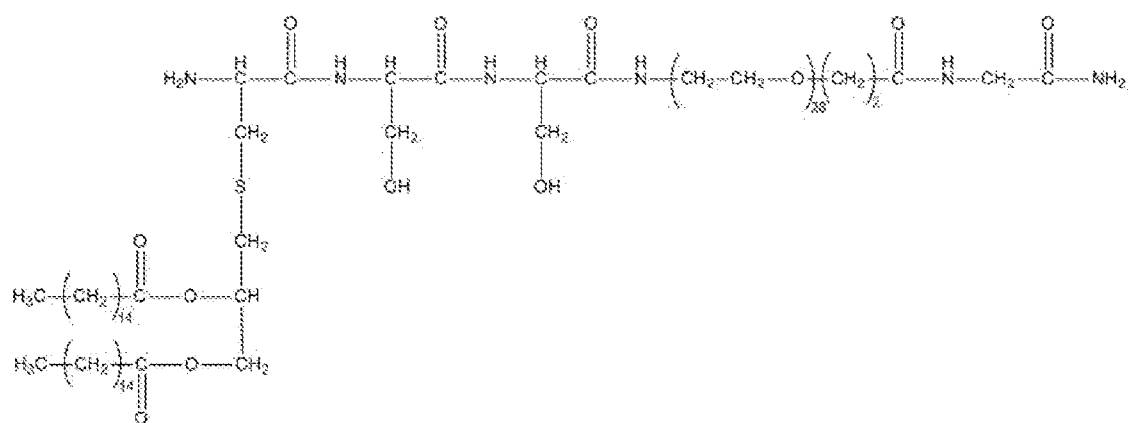
(2a).



(3a).

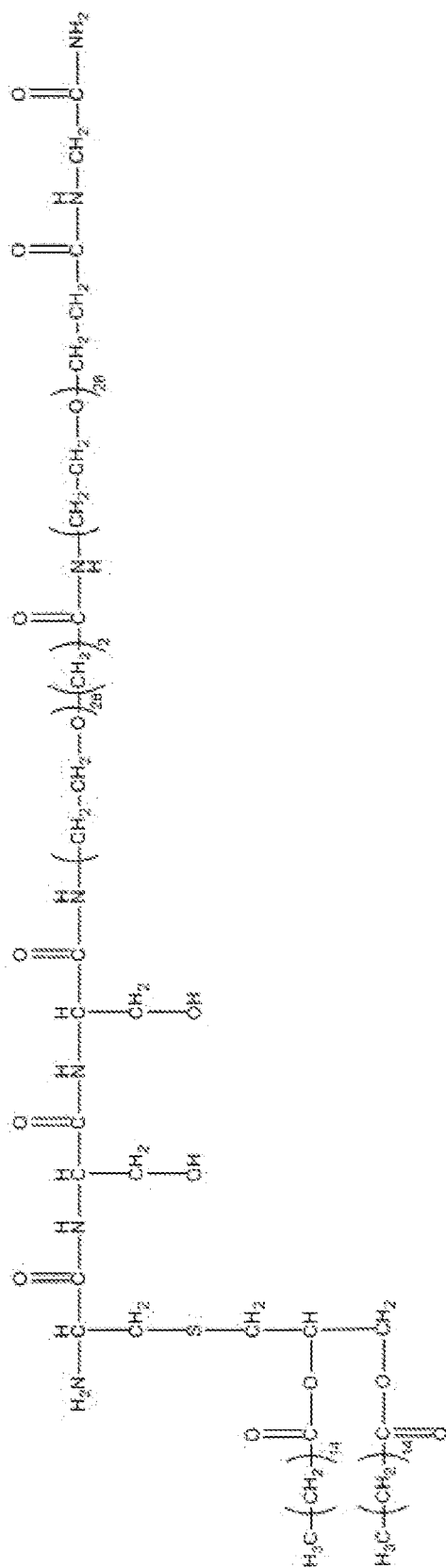


(4a).



(5a),

y



(6a).

También se incluyen como compuestos de la invención sales o profármacos farmacéuticamente aceptables de los

compuestos (1) a (6), o (1a) a (6a) anteriores.

Para todas las estructuras anteriores, cuando están presentes, son preferibles una o más de las siguientes características:

n es entre 10-14, incluso más preferiblemente, n es 11.

5 n es 3 o 5.

n es entre 24-30, incluso más preferiblemente, n es 27.

k es entre 24-30, incluso más preferiblemente k es 27.

m es 1-3, incluso más preferiblemente, m es 2.

h es 1-3, incluso más preferiblemente, h es 2.

10 g es 12, 14 o 16, lo más preferiblemente g es 14.

uno de R₁ y R₂ es hidrógeno.

p es 2.

t es 2.

15 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se puede usar para describir cualquier sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable, o cualquier otro compuesto que tras la administración a un sujeto, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de la invención como se describe en el presente documento, o una sal, profármaco o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, o un metabolito o resto activo del mismo.

20 Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir, pero no se limitan a, sales de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico, y bromhídrico, o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, málico, cítrico, láctico, mícico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.

25 Las sales básicas pueden incluir, pero no se limitan a, las formadas con cationes farmacéuticamente aceptables, tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, zinc, amonio, alquilamonio tales como sales formadas a partir de trietilamina, alcóxiamonio tales como las formadas con etanolamina y sales formadas a partir de etilendiamina, colina o aminoácidos tales como arginina, lisina o histidina. La información general sobre los tipos de sales farmacéuticamente aceptables y su formación es conocida por los expertos en la técnica y es como se describe en textos generales tales como "Handbook of Pharmaceutical salts" P.H. Stahl C.G. Wermuth 1ª edición, 2002, Wiley-VCH.

30 En el caso de compuestos que son sólidos, los expertos en la técnica entenderán que los compuestos, agentes y sales de la invención pueden existir en diferentes formas cristalinas o polimórficas, todas las cuales se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención y fórmulas especificadas.

El término "polimorfo" incluye cualquier forma cristalina de compuestos de la invención como se describe en el presente documento, tales como formas anhidras, formas hidratadas, formas de solvatos y formas de solvatos mixtos.

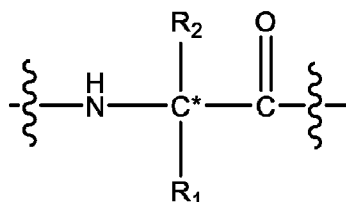
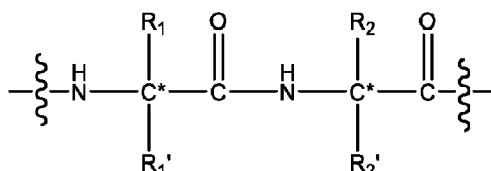
35 Los compuestos descritos en el presente documento pretenden cubrir, cuando sea aplicable, formas solvatadas así como no solvatadas de los compuestos. Por lo tanto, los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos que tienen las estructuras indicadas, incluyendo las formas hidratadas o solvatadas, así como las formas no hidratadas y no solvatadas.

40 Como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un complejo de estequiometría variable formado por un soluto (en esta invención, un compuesto de la invención descrito en el presente documento, o una sal, profármaco o éster farmacéuticamente aceptable del mismo) y un disolvente. Tales disolventes para el propósito de la invención pueden no interferir con la actividad biológica del soluto. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, metanol, etanol y ácido acético. Preferiblemente, el disolvente usado es un disolvente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de disolventes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin limitación, agua, etanol y ácido acético. Lo más preferiblemente, el disolvente usado es agua.

Los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluro de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfato de dimetilo y dietilo; y otros.

50 Los compuestos como se describen en el presente documento también incluyen variaciones isotópicas, tales como la sustitución de hidrógeno por deuterio.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden existir y aislarse en formas ópticamente activas y racémicas. Como entendería un experto en la técnica, la presente invención pretende abarcar cualquier forma racémica, ópticamente activa o estereoisomérica, o mezclas de las mismas, de compuestos de Fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (Ia), (IIa), (IIIa), (IVa) y/o (Va) que poseen las propiedades útiles descritas en el presente documento. Es bien conocido en la técnica cómo preparar dichas formas (por ejemplo, por resolución de mezclas racémicas por recristalización, por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, por síntesis quiral o por separación cromatográfica quiral). En una realización preferida, con respecto a los carbonos mostrados con un * a continuación, el compuesto se proporciona en una mezcla racémica. En otro aspecto preferido, el compuesto se proporciona con exceso de, o solo, la configuración L o el aminoácido de origen natural:



Un "profármaco" es un compuesto que puede no satisfacer completamente los requisitos estructurales de los compuestos proporcionados en el presente documento, pero se modifica *in vivo*, después de la administración a un sujeto o paciente, para producir un compuesto de la invención como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un profármaco puede ser un derivado acilado de un compuesto como se proporciona en el presente documento. Los profármacos incluyen compuestos en donde grupos hidroxilo, carboxilo, amina o sulfhidrilo están unidos a cualquier grupo que, cuando se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo, carboxilo, amino o sulfhidrilo libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados de acetato, formiato, fosfato y benzoato de grupos funcionales alcohol y amina dentro de los compuestos proporcionados en el presente documento. Los profármacos de los compuestos proporcionados en el presente documento pueden prepararse modificando grupos funcionales presentes en los compuestos de tal manera que se escindan las modificaciones *in vivo* para generar los compuestos originales.

Los profármacos incluyen compuestos en donde un resto de aminoácido, o una cadena polipeptídica de dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) restos de aminoácidos que están unidos covalentemente a grupos amino y amido libres de compuestos de Fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (Ia), (IIa), (IIIa), (IVa) y/o (Va). Los restos de aminoácidos incluyen los 20 aminoácidos de origen natural comúnmente designados por símbolos de tres letras y también incluyen, 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, 3-metilhistidina, norvalina, beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, citrulina, homocisteína, homoserina, ornitina y metionina sulfona. Los profármacos también incluyen compuestos en donde carbonatos, carbamatos, amidas y ésteres alquílicos están unidos covalentemente a los sustituyentes anteriores de Fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (Ia), (IIa), (IIIa), (IVa) y/o (Va), u otra estructura como se representa en el presente documento.

El término "respiratorio" se refiere al proceso por el cual se introduce oxígeno en el cuerpo y se descarga dióxido de carbono, a través del sistema corporal que incluye la nariz, garganta, laringe, tráquea, bronquios y pulmones.

Como se usa en el presente documento, las vías respiratorias incluyen las vías respiratorias superiores e inferiores. Típicamente, las vías respiratorias superiores incluyen la nariz y los conductos nasales, senos paranasales, la faringe y la porción de la laringe por encima de las cuerdas vocales (cuerdas). Típicamente, las vías respiratorias inferiores incluyen la porción de la laringe por debajo de las cuerdas vocales, tráquea, bronquios y bronquiolos. Los pulmones pueden incluirse en las vías respiratorias inferiores o como entidad separada e incluyen los bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos.

La expresión "enfermedad respiratoria" o "afección respiratoria" se refiere a una cualquiera de varias dolencias que implican inflamación y afectan a un componente del sistema respiratorio que incluye las vías respiratorias superiores (que incluyen la cavidad nasal, faringe y laringe) y las inferiores (que incluyen tráquea, bronquios y pulmones). Preferiblemente, la enfermedad respiratoria es una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias, tales dolencias incluyen afecciones asmáticas que incluyen fiebre del heno, asma inducida por alérgenos, asma inducida por ejercicio, asma inducida por contaminación, asma inducida por frío, asma inducida por estrés y asma inducida por virus, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas que incluyen bronquitis crónica con flujo de aire normal, bronquitis crónica con obstrucción de las vías respiratorias (bronquitis obstructiva crónica), enfisema, bronquitis asmática, y

enfermedad bullosa, y otras enfermedades pulmonares que implican inflamación que incluyen fibrosis quística, enfermedad del pulmón de cuidador de aves, pulmón del granjero, síndrome de dificultad respiratoria aguda, neumonía, lesión por aspiración o inhalación, embolia grasa en el pulmón, inflamación por acidosis del pulmón, edema pulmonar agudo, enfermedad de montaña aguda, cirugía poscardiaca, hipertensión pulmonar aguda, hipertensión pulmonar persistente del recién nacido, enfermedad de la membrana hialina, tromboembolia pulmonar aguda, sepsis, estado asmático e hipoxia. La inflamación en las vías respiratorias superiores e inferiores puede estar asociada con o causada por infección viral o un alérgeno. Se espera que la actividad antiinflamatoria de los compuestos solos o cuando se coadministran con un glucocorticoide los haría particularmente adecuados para el tratamiento de estas enfermedades o afecciones.

Un síntoma de enfermedad respiratoria puede incluir tos, producción excesiva de esputo, una sensación de falta de aire o rigidez torácica con sibilancia audible. La capacidad de ejercicio puede ser bastante limitada. En el asma, el FEV1.0 (volumen espiratorio forzado en un segundo) como un porcentaje del predicho de forma nomográfica basado en el peso, altura y edad, puede ser menor así como también el caudal espiratorio máximo en una espiración forzada. En la EPOC, el FEV1.0 como una relación de FVC se reduce típicamente a menos de 0.7. El impacto de cada una de estas afecciones también se puede medir por días de pérdida de trabajo/escuela, alteración del sueño, requisito de fármacos broncodilatadores, requisito de glucocorticoides, incluyendo glucocorticoides orales.

La existencia de, mejora en, tratamiento o prevención de una enfermedad respiratoria puede determinarse mediante cualquier método clínica o bioquímicamente relevante del sujeto o una biopsia del mismo. Por ejemplo, un parámetro medido puede ser la presencia o grado de función pulmonar, signos y síntomas de obstrucción; tolerancia al ejercicio; despertares nocturnos; días perdidos en la escuela o el trabajo; uso de broncodilatador; dosis de ICS; uso oral de GC; necesidad de otros medicamentos; necesidad de tratamiento médico; admisión hospitalaria.

Como se usa en el presente documento, el término infección respiratoria significa una infección en cualquier lugar de las vías respiratorias. Los ejemplos de infección respiratoria incluyen, pero no se limitan a resfriados, sinusitis, infección de garganta, tonsilitis, laringitis, bronquitis, neumonía o bronquiolitis. Preferiblemente, en cualquier realización de la invención, la infección respiratoria es un resfriado. Se puede identificar que un individuo tiene una infección de las vías respiratorias mediante pruebas víricas y puede presentar síntomas de ojos llorosos que pican, descarga nasal, congestión nasal, estornudos, dolor de garganta, tos, cefalea, fiebre, malestar, fatiga y debilidad. En un aspecto, un sujeto que tiene una infección respiratoria puede no tener ninguna otra afección respiratoria. La detección de la presencia o cantidad de virus, preferiblemente rinovirus, puede ser por PCR/secuenciación de ARN aislado de muestras clínicas (lavado nasal, esputo, BAL) o serología.

La afección respiratoria asociada con un rinovirus puede ser una afección causada por rinovirus. Preferiblemente, la afección está asociada con o causada por una infección por rinovirus. Una infección por rinovirus puede determinarse por la presencia de rinovirus en una muestra tomada de las vías respiratorias de un sujeto. Se puede identificar que un individuo tiene una infección por RV mediante pruebas virales serológicas o PCR/secuenciación de ARN aislado de muestras clínicas (lavado nasal, esputo, BAL). Los síntomas de la infección por RV incluyen, pero no se limitan a dolor de garganta, secreción nasal, congestión nasal, estornudos y tos; a veces acompañados de dolores musculares, fatiga, malestar, dolor de cabeza, debilidad muscular o pérdida de apetito.

Según la invención, la infección respiratoria es causada por un rinovirus (RV) o exacerbada por un RV. Como se usa en el presente documento, el término RV se refiere a un picornavirus que comprende cualquier ARN monocatenario de sentido positivo con una proteína codificada por virus genómico en la región 5' y una cola de poli-A 3'. Se entenderá que las propias partículas virales no están envueltas y son icosaédricas en estructura. Se comprenderá también que los rinovirus humanos están compuestos por una cápside que contiene cuatro proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP4. VP1, VP2 y VP3 forman la mayor parte de la cápside de proteínas. Los ejemplos de rinovirus humanos pueden incluir cualquiera de los siguientes: HRV-A1, HRV-A2, HRV-A7, HRV-A8, HRV-A9, HRV-A10, HRV-A11, HRV-A12, HRV-A13, HRV-A15, HRV-A16, HRV-A18, HRV-A19, HRV-A20, HRV-A21, HRV-A22, HRV-A23, HRV-A24, HRV-A25, HRV-A28, HRV-A29, HRV-A30, HRV-A31, HRV-A32, HRV-A33, HRV-A34, HRV-A36, HRV-A38, HRV-A39, HRV-A40, HRV-A41, HRV-A43, HRV-A44, HRV-A45, HRV-A46, HRV-A47, HRV-A49, HRV-A50, HRV-A51, HRV-A53, HRV-A54, HRV-A55, HRV-A56, HRV-A57, HRV-A58, HRV-A59, HRV-A60, HRV-A61, HRV-A62, HRV-A63, HRV-A64, HRV-A65, HRV-A66, HRV-A67, HRV-A68, HRV-A71, HRV-A73, HRV-A74, HRV-A75, HRV-A76, HRV-A77, HRV-A78, HRV-A80, HRV-A81, HRV-A82, HRV-A85, HRV-A88, HRV-A89, HRV-A90, HRV-A94, HRV-A95, HRV-A96, HRV-A98, HRV-A100, HRV-A101, HRV-A102 y HRV-A103, que se conocen colectivamente como virus del rinovirus A; HRV-B3, HRV-B4, HRV-B5, HRV-B6, HRV-B14, HRV-B17, HRV-B26, HRV-B27, HRV-B35, HRV-B37, HRV-B42, HRV-B48, HRV-B52, HRV-B69, HRV-B70, HRV-B72, HRV-B79, HRV-B83, HRV-B84, HRV-B86, HRV-B91, HRV-B92, HRV-B93, HRV-B97 y HRV-B99 que se conocen colectivamente como virus del rinovirus B; y HRV-C1, HRV-C2, HRV-C3, HRV-C4, HRV-C5, HRV-C6, HRV-C7, HRV-C8, HRV-C9, HRV-C10, HRV-C11, HRV-C12, HRV-C13, HRV-C14, HRV-C15, HRV-C16, HRV-C17, HRV-C18, HRV-C19, HRV-C20, HRV-C21, HRV-C22, HRV-C23, HRV-C24, HRV-C25, HRV-C26, HRV-C27, HRV-C28, HRV-C29, HRV-C30, HRV-C31, HRV-C32, HRV-C33, HRV-C34, HRV-C35, HRV-C36, HRV-C37, HRV-C38, HRV-C39, HRV-C40, HRV-C41, HRV-C42, HRV-C43, HRV-C44, HRV-C45, HRV-C46, HRV-C47, HRV-C48, HRV-C49, HRV-C50 y HRV-C51 que se conocen colectivamente como virus del rinovirus C.

En cualquier aspecto de la invención, la administración del agonista de TLR2 puede provocar una respuesta inmunitaria innata.

En el asma, los rinovirus humanos se han asociado con la mayoría de las exacerbaciones del asma para las cuales la terapia actual es inadecuada. En cualquier realización de la invención, se proporciona por lo tanto un compuesto para el uso en el tratamiento o prevención de una exacerbación del asma mediada por virus como se define en la reivindicación 3, en donde la exacerbación mediada por virus está causada por una infección por rinovirus.

Como se usa en el presente documento, el término "asma" se refiere a un trastorno respiratorio caracterizado por dificultad episódica en la respiración provocada por uno cualquiera o una combinación de tres factores primarios que incluyen: 1) broncoespasmo (es decir, obstrucción variable y reversible de las vías respiratorias debido a contracción del músculo de las vías respiratorias), 2) inflamación del revestimiento de las vías respiratorias y 3) hipersensibilidad bronquial que da como resultado mucosa excesiva en las vías respiratorias, que puede desencadenarse por exposición a un alérgeno o combinación de alérgenos (es decir, ácaros del polvo y moho), infección vírica o bacteriana (es decir, virus del resfriado común), contaminantes ambientales (es decir, humos o gases químicos), esfuerzo físico excesivo (es decir, durante el ejercicio), estrés o inhalación de aire frío. Un individuo puede caracterizarse por sufrir, por ejemplo, asma inducida por alérgenos, asma inducida por ejercicio, asma inducida por contaminación, asma inducida por virus o asma inducida por resfriado. Se entenderá que el asma provoca períodos recurrentes de sibilancias (un sonido silbante cuando respira), rigidez torácica, falta de aliento y tos.

Como se usa en el presente documento, el término exacerbación del asma se refiere a episodios agudos o subagudos de empeoramiento progresivo de la falta de aliento, tos, sibilancias y rigidez torácica o cualquier combinación de los mismos y puede ir acompañado de una disminución en el flujo espiratorio. La intensidad de las exacerbaciones es variable. A veces, los síntomas son leves y no pueden ser detectados por el paciente y otras veces son episodios muy graves potencialmente mortales. Según la invención, la exacerbación del asma es causada por la infección por rinovirus.

Se puede identificar que un individuo tiene exacerbación del asma por el grado de obstrucción del flujo de aire determinando FEV1 o PEF y su repercusión en el intercambio gaseoso. Se entenderá que FEV1 y PEF son mediciones usadas para evaluar el flujo espiratorio. Dependiendo de los valores obtenidos, una exacerbación se considerará leve si el valor de FEV1 o PEF es equivalente o superior a 70% de su valor personal teórico o mejor previo respectivamente, moderada si la medición de FEV1 o PEF está entre 70% y 50% y grave si estos valores son inferiores a 50%. Se estima que la respuesta funcional al tratamiento es satisfactoria cuando los valores de FEV1 o PEF son superiores a 45% del valor predeterminado y el PEF aumenta al menos 50 l/min 30 minutos después de que se inicie el tratamiento. La respuesta terapéutica inicial de obstrucción del flujo de aire es el factor pronóstico clave para evaluar un ataque. Tabla 1 (*J Investig Allergol Clin Immunol* Vol. 20, Supl. 1: 27-31 (2010)) describe los indicadores de diagnóstico usados para determinar si alguien tiene una exacerbación leve o moderada-grave del asma.

Tabla 1: Clasificación de la gravedad de la exacerbación del asma

	Crisis leve	Crisis de moderada-grave	Insuficiencia respiratoria inminente
Disnea	Leve	Intensidad moderada	Muy intensa
Habla	Párrafos	Frases-palabras	
Frecuencia respiratoria (x')	Aumentada	> 20-30	
Frecuencia cardíaca (x')	<100	>100-120	Bradycardia
Uso de músculos accesorios	Ausente	Presente	Movimiento toracoabdominal paradójico
Sibilancias	Presente	Presente	Silencio auscultatorio
Conciencia	Normal	Normal	Deteriorada
Pulso paradójico	Ausente	>10-25 mmHg	Ausencia (fatiga muscular)
FEV1 o PEF (valores de referencia)	>70%	<70%	
SaO2 (%)	>95%	90-95%	<90%
PaO2 mmHg	Normal	80-60	<60
PaCO2 mmHg	<40	>40	>40

Abreviaturas: FEV₁: volumen espiratorio forzado durante el primer segundo; PEF: flujo espiratorio máximo; x': por minuto; SaO₂: saturación de oxihemoglobina; PaO₂: presión arterial de oxígeno; PaCO₂: presión arterial de dióxido de carbono.

En muchos casos, la exacerbación del asma causada por la infección por rinovirus puede conducir a una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Por lo tanto, los rinovirus humanos están asociados con la EPOC para la que la terapia actual es inadecuada. En cualquier realización de la reivindicación 2, se proporciona por lo tanto un compuesto para el uso en el tratamiento o prevención de una EPOC mediada por virus que comprende administrar un agonista de TLR2 a un sujeto, en donde la EPOC mediada por virus es causada por rinovirus.

Las expresiones "enfermedad pulmonar obstructiva crónica" y "EPOC", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a un trastorno crónico o combinación de trastornos caracterizados por flujo espiratorio máximo reducido y vaciado forzado lento de los pulmones que no cambia notablemente a lo largo de varios meses y no es, o es solo mínimamente, reversible con broncodilatadores tradicionales. Más comúnmente, la EPOC es una combinación de bronquitis crónica, es decir, la presencia de tos y esputo durante más de tres meses durante aproximadamente dos años consecutivos, y enfisema, es decir, daño alveolar. Sin embargo, la EPOC puede implicar bronquitis crónica con flujo de aire normal, bronquitis crónica con obstrucción de las vías respiratorias (bronquitis obstructiva crónica), enfisema, bronquitis asmática y enfermedad bullosa, y combinaciones de las mismas. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es una afección que usualmente pero no exclusivamente resulta de daño pulmonar crónico inducido por exposición al humo de tabaco. Otros contaminantes nocivos en el aire, tales como humos de cocinas interiores y gases de escape de coche pueden provocar o aumentar a largo plazo el riesgo de EPOC. Por lo tanto, se entenderá que EPOC es intercambiable con términos tales como "bronquitis crónica" y "enfisema".

Los síntomas de la EPOC empeoran progresivamente y se produce dificultad respiratoria persistente al hacer ejercicio, conduciendo finalmente a dificultad respiratoria en reposo. Los síntomas más comunes de la EPOC son la dificultad respiratoria (o una "necesidad de aire"), tos crónica y producción de esputo (mucosa). Las actividades diarias, tales como subir un corto tramo de escaleras e incluso las actividades rutinarias diarias, pueden volverse muy difíciles a medida que la afección empeora gradualmente. Los pacientes experimentan también frecuentemente exacerbaciones, es decir, episodios graves de mayor dificultad respiratoria, tos y producción de esputo que duran desde varios días hasta unas pocas semanas. Estos episodios pueden ser gravemente incapacitantes y dar como resultado la necesidad de atención médica urgente (incluyendo hospitalización) y a veces la muerte.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica se sospecha normalmente en personas que experimentan los síntomas descritos anteriormente y pueden confirmarse mediante una prueba respiratoria denominada "espirometría" que mide cuánto y con qué rapidez una persona puede exhalar aire de manera forzada.

Los virus respiratorios también pueden exacerbar la enfermedad en la fibrosis quística. Por ejemplo, la infección vírica de un sujeto diagnosticado con fibrosis quística puede aumentar la susceptibilidad a infecciones bacterianas. En cualquier realización de la reivindicación 2, se proporciona por lo tanto un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de una exacerbación de la fibrosis quística mediada por virus que comprende administrar un agonista de TLR2 a un sujeto, en donde la exacerbación mediada por virus es causada por una infección por rinovirus.

Se entenderá que la fibrosis quística es un trastorno genético que afecta a los sistemas respiratorio, digestivo y reproductivo que implica la producción de revestimientos mucosos anormalmente gruesos en los pulmones y puede conducir a infecciones pulmonares mortales. Se entenderá que un sujeto con fibrosis quística puede presentar una variedad de síntomas incluyendo piel de sabor muy salino; tos persistente, posiblemente con flema, sibilancias o falta de aire, un apetito excesivo pero poca ganancia de peso, y heces grasientas y voluminosas. También se entenderá que la prueba de sudor es la prueba de diagnóstico convencional para la fibrosis quística. Este procedimiento mide la cantidad de sal en el sudor. Un nivel de sal alto indica fibrosis quística.

Los virus respiratorios también pueden exacerbar la enfermedad en pacientes receptores de trasplantes. Por ejemplo, la infección vírica en un receptor de trasplante de pulmón puede aumentar la susceptibilidad a neumonía, rechazo agudo y disfunción crónica del aloinjerto. En cualquier realización de la reivindicación 2, se proporciona por lo tanto un compuesto para usar en el tratamiento o la prevención de una infección vírica en un receptor de trasplante de pulmón que comprende administrar un agonista de TLR2 a un sujeto, en donde la infección vírica es una infección por rinovirus.

La presente invención encuentra también aplicación en el restablecimiento de la inmunidad antivírica en el contexto del uso de glucocorticosteroides crónicos. Se entenderá que un glucocorticoide es un agente que tiene una acción agonista similar al cortisol en los receptores de glucocorticoides que da como resultado una serie de efectos endocrinos y antiinflamatorios. La mayoría de los pacientes con asma grave y EPOC toman esteroides o glucocorticosteroides. El uso de esteroides aumenta durante una exacerbación vírica que puede prolongar la infección por virus y aumentar la susceptibilidad a la infección bacteriana secundaria.

En cualquier realización de la invención, por lo tanto, se proporciona un compuesto para usar en el tratamiento o la prevención de una infección vírica en un sujeto medicado con glucocorticosteroides que comprende administrar un agonista de TLR2 a un sujeto, en donde la infección vírica es una infección por rinovirus. Preferiblemente, la administración de glucocorticosteroides es crónica.

Como se usa en el presente documento, "prevenir" o "prevención" pretende referirse a al menos la reducción de probabilidad del riesgo de (o susceptibilidad a) adquirir una enfermedad o trastorno (es decir, hacer que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrolle en un paciente que puede estar expuesto a o predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o presenta síntomas de la enfermedad). Los parámetros biológicos y fisiológicos para identificar dichos pacientes se proporcionan en el presente documento y también son bien conocidos por los médicos. Por ejemplo, la prevención de la infección respiratoria inducida por RV o la exacerbación inducida por RV del asma puede caracterizarse por una reducción o ausencia de carga viral, o una reducción en un aumento de los mediadores celulares inflamatorios o citoquinas. En algunas realizaciones, la administración del compuesto puede minimizar el desarrollo de la infección para minimizar la carga viral. Preferiblemente, esto reduce la carga viral.

En cualquier aspecto preventivo o profiláctico de la invención, el sujeto puede no tener ningún síntoma detectable de una infección por rinovirus, en el momento de la administración del compuesto.

Los términos "tratamiento" o "tratar" de un sujeto incluyen la aplicación o administración de un compuesto de la invención a un sujeto (o aplicación o administración de un compuesto de la invención a una célula o tejido de un sujeto) con el propósito de retrasar, ralentizar, estabilizar, curar, cicatrizar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, empeorar menos, mejorar, sanar o afectar a la enfermedad o afección, el síntoma de la enfermedad o afección, o el riesgo de (o susceptibilidad a) la enfermedad o afección. El término "tratar" se refiere a cualquier indicación de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como mitigación; remisión; disminución de la velocidad de empeoramiento; disminución de la gravedad de la enfermedad; estabilización, disminución de los síntomas o hacer que la lesión, patología o afección sea más tolerable para el sujeto; ralentización de la velocidad de degeneración o disminución; hacer que el punto final de degeneración sea menos debilitante; o mejorar el bienestar físico o mental de un sujeto. El propio método de tratamiento no está abarcado en el alcance de la invención.

La existencia de, mejora en, tratamiento de, o prevención de una infección o exacerbación respiratoria (p. ej., exacerbación del asma) puede determinarse mediante cualquier método clínico o bioquímicamente relevante como se describe en el presente documento o conocido en la técnica. Un método relevante puede ser la medición de la carga viral, la expresión de interferón o el número de células inflamatorias a través del lavado broncoalveolar (BAL) en el que, en el que se pasa un broncoscopio a través de la boca o nariz a los pulmones y se echa una chorro de fluido en una pequeña parte del pulmón y luego se recoge para su examen. La mejora o tratamiento o prevención puede determinarse directamente a partir del sujeto, o una muestra o biopsia del mismo. La muestra o biopsia puede ser de las vías respiratorias superiores o inferiores. Además, en una infección respiratoria o exacerbación del asma, se puede determinar una respuesta positiva a la terapia midiendo los niveles de quimiocinas y citocinas a través de ensayos conocidos tales como ELISA como se muestra en el presente documento.

Además, por ejemplo, en una infección respiratoria o exacerbación del asma, una respuesta positiva a la terapia sería prevenir un retroceso adicional en la función pulmonar medida por espirometría, pletismografía corporal y capacidad de difusión pulmonar. En particular, para la exacerbación del asma, una respuesta positiva a la terapia sería una mejora de la gravedad inicialmente diagnosticada (como se indica en la Tabla 1). Por ejemplo, un sujeto al que se le ha diagnosticado una exacerbación moderada (la medición de FEV1 o PEF está entre 70% y 50%) mostrará una respuesta positiva a la terapia cuando los valores de FEV1 o PEF sean mayores de 45% del valor predeterminado y el PEF aumente al menos 50 l/min 30 minutos después de que se inicie el tratamiento.

Una respuesta positiva a la terapia también puede ser la prevención o atenuación del empeoramiento de los síntomas respiratorios, p. ej., síntomas de asma (exacerbación), después de una infección por virus respiratorio. Esto se podría evaluar mediante la comparación del cambio medio en la puntuación de la enfermedad desde el inicio hasta el final del período de estudio basándose en el cuestionario de control de asma de Juniper (ACQ-6), y también podría evaluar la puntuación de síntomas de las vías respiratorias inferiores (LRSS - síntomas de rigidez torácica, sibilancias, falta de aire y tos) diariamente después de la infección/aparición de síntomas de resfriado. También se podría evaluar el cambio desde la función pulmonar inicial (flujo espiratorio máximo PEF) y una respuesta positiva a la terapia podría ser la atenuación significativa del PEF reducido. Por ejemplo, un grupo tratado con placebo mostraría una reducción significativa del PEF de la mañana de 15% en el pico de la exacerbación, mientras que el grupo de tratamiento mostraría una reducción no significativa del PEF de menos de 15% de cambio con respecto al valor inicial.

La presente descripción también describe un método para mejorar o mantener la capacidad de un sujeto para controlar una enfermedad respiratoria durante una infección respiratoria por RV, comprendiendo el método administrar un compuesto que comprende un agonista de TLR2 al sujeto, mejorando de este modo la capacidad del sujeto para controlar la enfermedad respiratoria en la infección respiratoria viral. Mejorar o mantener la capacidad de controlar una enfermedad respiratoria puede ser que el sujeto no requiera ninguna intervención adicional al tratamiento generalmente administrado para la enfermedad respiratoria existente. En otras palabras, los únicos tratamientos necesarios para el sujeto es el tratamiento tomado normalmente (es decir, cuando el sujeto no tiene una infección viral) para la afección respiratoria subyacente y el compuesto que comprende un agonista de TLR2 como se describe en el presente documento.

Típicamente, una dosificación terapéuticamente eficaz se formula para contener una concentración (en peso) de al menos aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 50% o más, y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos en la misma. Las composiciones pueden formularse para contener uno o más compuestos, o una sal, polimorfo o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos en una concentración de aproximadamente 0.1 a menos de aproximadamente 50%, por ejemplo, aproximadamente de 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41 o 40%, con concentraciones de más de aproximadamente 0.1%, por ejemplo, aproximadamente 0.2, 0.3, 0.4 o 0.5%, a menos de aproximadamente 40%, por ejemplo, aproximadamente 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 o 30%. Las composiciones de ejemplo pueden contener de aproximadamente 0.5% a menos de aproximadamente 30%, por ejemplo, aproximadamente 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 o 20%, con concentraciones de más de aproximadamente 0.5%, por ejemplo, aproximadamente 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 o 1%, a menos de aproximadamente 20%, por ejemplo, aproximadamente 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10%. Las composiciones pueden contener de más de aproximadamente 1%, por ejemplo, aproximadamente 2%, a menos de aproximadamente 10%, por ejemplo,

aproximadamente 9 u 8%, incluyendo concentraciones de más de aproximadamente 2%, por ejemplo, aproximadamente 3 o 4%, a menos de aproximadamente 8%, por ejemplo, aproximadamente 7 o 6%. El agente activo puede, por ejemplo, estar presente en una concentración de aproximadamente 5%. En todos los casos, las cantidades pueden ajustarse para compensar las diferencias en las cantidades de agentes activos realmente administrados a las células o tejidos tratados.

Aunque la invención encuentra aplicación en seres humanos, la invención también es útil para fines terapéuticos veterinarios. La invención es útil para animales domésticos o de granja tales como ganado vacuno, ovejas, caballos y aves de corral; para animales de compañía tales como gatos y perros; y para animales de zoológico.

La composición según la presente invención se administra en una cantidad eficaz. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere generalmente a una cantidad de un agonista de TLR2, una sal, polimorfo o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención que (i) trata la enfermedad, afección o trastorno particular, (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular, o (iii) retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular descrito en el presente documento. Los efectos indeseables, p. ej., efectos secundarios, a veces se ponen de manifiesto junto con el efecto terapéutico deseado; por lo tanto, un profesional equilibra los beneficios potenciales frente a los riesgos potenciales para determinar cuál es una "cantidad efectiva" apropiada.

La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad y estado general del sujeto, modo de administración y similares. Por lo tanto, puede no ser posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una "cantidad eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en la técnica usando solo experimentación rutinaria. En un aspecto, la dosis administrada a un sujeto es cualquier dosis que reduce la carga viral. Preferiblemente, la dosis no aumenta significativamente la inflamación, por ejemplo, no aumenta significativamente el número absoluto de neutrófilos o la proporción de neutrófilos de células totales del BAL en el pulmón.

En algunas realizaciones, una cantidad eficaz para un sujeto humano se encuentra en el intervalo de aproximadamente 250 nmoles/kg de peso corporal/dosis a 0.005 nmoles/kg de peso corporal/dosis. Preferiblemente, el intervalo es de aproximadamente 250 nmoles/kg de peso corporal/dosis a 0.05 nmoles/kg de peso corporal/dosis. En algunas realizaciones, el intervalo de peso corporal/dosis es de aproximadamente 250 nmoles/kg, a 0.1 nmoles/kg, de aproximadamente 50 nmoles/kg a 0.1 nmoles/kg, de aproximadamente 5 nmoles/kg a 0.1 nmoles/kg, de aproximadamente 2.5 nmoles/kg a 0.25 nmoles/kg, o de aproximadamente 0.5 nmoles/kg a 0.1 nmoles/kg de peso corporal/dosis. En algunas realizaciones, la cantidad es de, o aproximadamente, 250 nmoles, 50 nmoles, 5 nmoles, 2.5 nmoles, 0.5 nmoles, 0.25 nmoles, 0.1 nmoles o 0.05 nmoles/kg de peso corporal/dosis del compuesto. Las pautas de administración se ajustan para adaptarse a las exigencias de la situación y pueden ajustarse para producir la dosis terapéutica óptima.

Los agonistas de TLR2 como se describen en el presente documento pueden ser composiciones formuladas como formulaciones inhaladas, incluyendo polvo seco, pulverizaciones, nieblas o aerosoles. Esto puede ser particularmente preferido para el tratamiento de una infección respiratoria. Para formulaciones de inhalación, la composición o combinación proporcionada en el presente documento puede administrarse mediante cualquier método de inhalación conocido por un experto en la técnica. Tales métodos y dispositivos de inhalación incluyen, pero no se limitan a, inhaladores de dosis medida con propulsores tales como CFC o HFA o propulsores que son fisiológica y ambientalmente aceptables. Otros dispositivos adecuados son inhaladores que funcionan por respiración, inhaladores multidosis de polvo seco y nebulizadores de aerosol. Las formulaciones de aerosol para usar en el presente método incluyen típicamente propulsores, tensioactivos y codisolventes y se pueden cargar en recipientes de aerosol convencionales que se cierran mediante una válvula dosificadora adecuada.

Las composiciones de inhalantes pueden comprender composiciones líquidas o en polvo que contienen el ingrediente activo que son adecuadas para nebulización y uso intrabronquial, o composiciones en aerosol administradas a través de una unidad de aerosol que dispensa dosis medidas. Las composiciones líquidas adecuadas comprenden el ingrediente activo en un disolvente de inhalante acuoso farmacéuticamente aceptable tal como solución salina isotónica o agua bacteriostática. Las soluciones se administran por medio de una bomba o un dispensador de pulverización nebulizada accionado por presión, o por cualquier otro medio convencional para producir o permitir que la cantidad de dosificación requerida de la composición líquida sea inhalada en los pulmones del paciente. Las formulaciones adecuadas, en donde el vehículo es un líquido, para administración, como por ejemplo, un pulverizador nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Alternativamente, la composición puede ser un polvo seco y administrarse a las vías respiratorias como se define en el presente documento.

Se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración y velocidad de excreción, combinación de fármacos (es decir, otros fármacos que se usan para tratar al paciente) y la gravedad del trastorno particular que se somete a terapia.

Un kit para usar en una aplicación terapéutica y/o profiláctica mencionada anteriormente puede comprender:

- un recipiente que contiene una composición terapéutica en forma de uno o más agonistas de TLR2 como se describe en el presente documento, o una sal, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica;

- una etiqueta o prospecto con instrucciones de uso.

5 El kit puede contener uno o más principios activos o ingredientes adicionales para el tratamiento de una afección respiratoria.

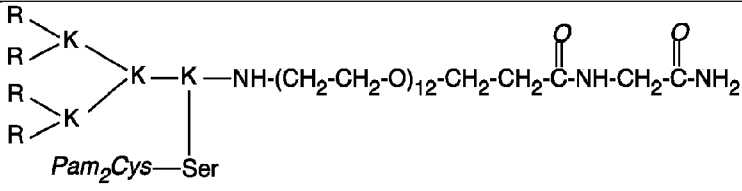
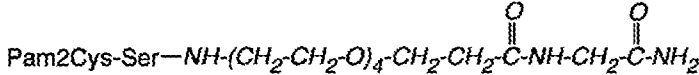
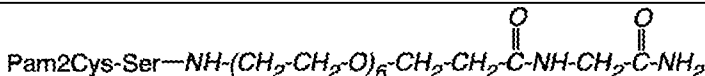
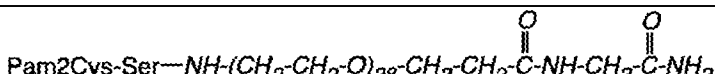
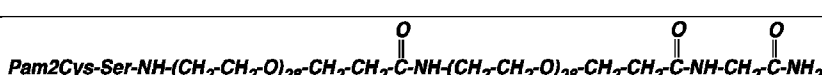
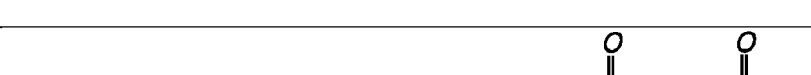
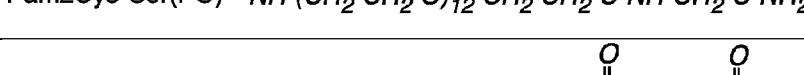
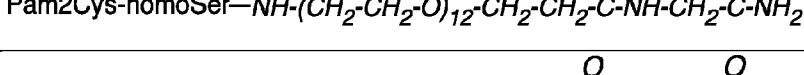
10 El kit o "artículo de fabricación" puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, blíster, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición terapéutica que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o prospecto indica que la composición terapéutica se usa para tratar la afección de elección. En una realización, la etiqueta o prospecto incluye instrucciones de uso e indica que la composición terapéutica o profiláctica puede usarse para tratar una afección respiratoria descrita en el presente documento.

15 El kit puede comprender (a) una composición terapéutica o profiláctica; y (b) un segundo recipiente con un segundo principio activo o ingrediente contenido en el mismo. El kit puede comprender además un prospecto que indica que la composición y otro principio activo pueden usarse para tratar un trastorno o prevenir una complicación derivada de una afección respiratoria descrita en el presente documento.

Ejemplos

20 Como se usa en el presente documento, incluyendo los siguientes Ejemplos, los siguientes compuestos se describen en la tabla a continuación y las estructuras específicas se muestran en otra parte del presente documento. Los compuestos fuera del alcance de las reivindicaciones adjuntas se describen y examinan únicamente con fines ilustrativos.

Estructura del compuesto	Nombre del compuesto
	INNA-001
	INNA-002
	INNA-003
<i>Pam₂Cys-Ser-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys</i>	INNA-004
<i>Pam₂Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys</i>	INNA-005
	INNA-006 (también mostrado en el presente documento como compuesto (1))
	INNA-007

Estructura del compuesto	Nombre del compuesto
	INNA-008
	INNA-009
	INNA-010
	INNA-011 (también mostrado en el presente documento como compuesto (5))
	INNA-012 (también mostrado en el presente documento como compuesto (6))
	INNA-013 (también mostrado en el presente documento como compuesto (4))
	INNA-014 (también mostrado en el presente documento como compuesto (3))
	INNA-015 (también mostrado en la presente memoria como compuesto (2))

Ejemplo 1

Inhibición de la infección por rinovirus en un modelo de ratón

- 5 Este estudio se realizó para determinar si la activación del sistema inmunitario innato por un agonista de TLR2 reduce la carga viral y la inflamación inducida por virus durante la infección por rinovirus en ratones.

Animales

- 10 Se usaron ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad para todos los estudios. Cada grupo contenía 5 ratones. Después de los procedimientos de tratamiento o de exposición, los ratones se vigilaron diariamente para determinar los cambios de peso y los cambios de comportamiento o físicos según se estipula en la aprobación de ética animal para el proyecto A-2016-605. En el momento de la recogida de la muestra, todos los ratones se sacrificaron por administración intraperitoneal con pentobarbital sódico. Todos los ratones se alojaron en instalaciones de HMRI Bioresources en jaulas ventiladas individualmente con no más de cuatro ratones por jaula. Se observaron los ratones diariamente desde el comienzo de cada estudio y se mantuvo una lista de control de la salud.

Procedimientos y tratamientos quirúrgicos de ratón

- 15 El rinovirus serotipo 1B se purificó originalmente a partir de un aislado clínico, se cultivó en células RD-ICAM y se purificó como se ha descrito previamente (Bartlett et al., *Nat Med* (2008) 14, 199-204; Bartlett et al., *Methods Mol Biol* (2015) 1221, 181-188). Se administraron a los ratones 50 µl de moléculas agonistas por vía intranasal bajo anestesia ligera con isoflurano en una cámara de inducción dentro de una cámara de bioseguridad de clase II. En los tiempos indicados posteriores al agonista de TLR-2 PEG-Pam2Cys-R4 y Pam2Cys-R4 se administró a los ratones por vía
20 intranasal 50 µl que contenían 5 x 10⁶ TCID₅₀ de RV1B usando el mismo procedimiento. El día 2 después de la infección, se realizó un lavado broncoalveolar (BAL) para contar el infiltrado de células inflamatorias y medir la expresión de proteínas mediadoras inmunitarias. Se recogieron los pulmones para determinar el ARN total para evaluar las cargas virales. El modelo de infección por RV de ratón y las técnicas asociadas se han desarrollado previamente (Bartlett et al., *Nat Med* (2008) 14, 199-204; Bartlett et al., *Methods Mol Biol* (2015) 1221, 181-188). Los

grupos experimentales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Grupos experimentales

Ratones totales 5 por grupo	Grupos de tratamiento	Protocolo de administración (intranasal)	Tiempo de exposición	Tiempo de recolección
1A 35 (N=5 por grupo)	Control de solución salina PEG-Pam2Cys-R4 5 nmol PEG-Pam2Cys-R4 1 nmol PEG-Pam2Cys-R4 0.1 nmol Pam2Cys-R4 5 nmol Pam2Cys-R4 1 nmol Pam2Cys-R4 0.1 nmol	Profilaxis pulmonar con tres niveles de dosis (día -1)	RV1B el día 0	Recolección el día 2. Análisis de títulos virales en tejido pulmonar por qPCR y/o respuestas inflamatorias en BAL y tejido pulmonar
1B 35 (N=5 por grupo)	Control de solución salina PEG-Pam2Cys-R4 0.1 nmol PEG-Pam2Cys-R4 0.05 nmol PEG-Pam2Cys-R4 0.01 nmol Pam2Cys-R4 0.1 nmol Pam2Cys-R4 0.05 nmol Pam2Cys-R4 0.01 nmol	Profilaxis pulmonar con tres niveles de dosis (día -7)	RV1B el día 0	Recolección el día 2. Análisis de títulos virales en tejido pulmonar por qPCR y respuestas inflamatorias en BAL y tejido pulmonar
1C 35 (N=5 por grupo)	Control de solución salina PEG-Pam2Cys-R4 5 nmol PEG-Pam2Cys-R4 1 nmol PEG-Pam2Cys-R4 0.1 nmol Pam2Cys-R4 5 nmol Pam2Cys-R4 1 nmol Pam2Cys-R4 0.1 nmol	Profilaxis pulmonar con tres niveles de dosis (día -7)	RV1B el día 0	Recolección el día 2. Análisis de títulos virales en tejido pulmonar por qPCR y respuestas inflamatorias en BAL y tejido pulmonar
1D 50 (N=5 por grupo)	Control de solución salina PEG-Pam2Cys-R4 10 pmol PEG-Pam2Cys-R4 5 pmol PEG-Pam2Cys-R4 2 pmol PEG-Pam2Cys-R4 1 pmol Pam2Cys-R4 10 pmol Pam2Cys-R4 5 pmol Pam2Cys-R4 2 pmol Pam2Cys-R4 1 pmol	Profilaxis pulmonar con tres niveles de dosis (día -7)	RV1B el día 0	Recolección el día 2. Análisis de títulos virales en tejido pulmonar por qPCR y respuestas inflamatorias en BAL y tejido pulmonar
1E 70 (N=5/ grupo) (Dosis indicativa mostrada solamente - se determinará la pauta de dosis a partir de los resultados de los estudios 1C y 1D)	Control de solución salina/no infectado Solución salina/RV Peg-SS-Pam2Cys/RV Peg-S-Pam2Cys/RV Pam2CysSK4/RV 10 pmol Peg-SS-Pam2Cys/RV Peg-S-Pam2Cys/RV Pam2CysSK4/RV 5 pmol Peg-SS-Pam2Cys/RV Peg-S-Pam2Cys/RV Pam2CysSK4/RV 2 pmol Peg-SS-Pam2Cys/RV Peg-S-Pam2Cys/RV Pam2CysSK4/RV 1 pmol	día -7, día -7, día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7 día -7	PBS RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B RV1B	Recolección el día 2. Análisis de títulos virales en tejido pulmonar por qPCR y respuestas inflamatorias en BAL y tejido pulmonar

Ratones totales 5 por grupo	Grupos de tratamiento	Protocolo de administración (intranasal)	Tiempo de exposición	Tiempo de recolección
1F 70 (N=5/ grupo) Todos los tratamientos con fármacos con la dosis mínima eficaz (90% de inhibición de carga viral en los pulmones de animales tratados determinado por el estudio 1D y 1E Dosis: 2 pmol	Control de solución salina/no infectado	día -7, -1	PBS	Recolección el día 2. Análisis de títulos virales en tejido pulmonar por qPCR y respuestas inflamatorias en BAL y tejido pulmonar
	Solución salina/RV	día -7, -1	RV1B	
	Peg-SS-Pam2Cys/PBS	día -7, -1	PBS	
	Peg-SS-Pam2Cys/PBS	día -7	PBS	
	Peg-SS-Pam2Cys/PBS	día -1	PBS	
	Peg-SS-Pam2Cys/RV	día -7, -1	RV1B	
	Peg-SS-Pam2Cys/RV	día -7	RV1B	
	Peg-SS-Pam2Cys/RV	día -1	RV1B	
	Peg-S-Pam2Cys/PBS	día -7, -1	PBS	
	Peg-S-Pam2Cys/PBS	día -7	PBS	
	Peg-S-Pam2Cys/PBS	día -1	PBS	
	Peg-S-Pam2Cys/RV	día -7, -1	RV1B	
	Peg-S-Pam2Cys/RV	día -7	RV1B	
	Peg-S-Pam2Cys/RV	día -1	RV1B	
1G 50 (N=5/ grupo)	Control de solución salina/no infectado	día +1,	PBS	Recolección el día 2. Análisis de títulos virales en tejido pulmonar por qPCR y respuestas inflamatorias en BAL y tejido pulmonar
	Solución salina/RV	día +1,	RV1B	
	PEG-PAM2CYS-R4/RV	día +1	RV1B	
	PAM2CYS-R4/RV 0.01 nmol	día +1	RV1B	
	PEG-PAM2CYS-R4/RV	día +1	RV1B	
	PAM2CYS-R4/RV 5 pmol	día +1	RV1B	
	PEG-PAM2CYS-R4/RV	día +1	RV1B	
	PAM2CYS-R4/RV 2 pmol	día +1	RV1B	
	PEG-PAM2CYS-R4/RV	día +1	RV1B	
	PAM2CYS-R4/RV 1 pmol	día +1	RV1B	

Análisis celular de lavado broncoalveolar (BAL)

Después del sacrificio, los ratones se canularon por vía traqueal y se lavó con descarga de 1 ml de solución salina tamponada de Hanks (Hyclone™, GE Life Sciences) a través de las vías respiratorias, 3-5 veces. Las células del BAL se sedimentaron por centrifugación y el líquido sobrenadante se recogió y almacenó a -80°C para los ELISA. Las células sedimentadas eran glóbulos rojos lisados y las células restantes se contaron en un hemocitómetro por exclusión con azul de tripano. Las suspensiones celulares después se citocentrifugaron en portaobjetos y se fijaron y tiñeron con soluciones Diff Quick (POCD) según las recomendaciones del fabricante. Se contaron un mínimo de 200 células totales por portaobjetos y se determinó el número de neutrófilos, linfocitos y macrófagos.

Extracción de ARN y qRT-PCR

El lóbulo pulmonar apical de cada ratón se recogió en solución ARN-later (Ambion). Para el procesamiento, los lóbulos pulmonares se transfirieron a tampón RLT (Qiagen)/2ME para la disociación tisular por TissueLyser II (Qiagen) a 25 Hz, dos veces durante 2 minutos (con rotación de la muestra). Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación y el ARN se extrajo manualmente usando un kit miRNeasy (Qiagen) siguiendo el protocolo de los proveedores recomendado para extraer el ARN total, incluyendo miARN de células y tejidos animales y humanos. Después de la extracción, la concentración de ARN se determinó usando espectrofotometría (Nanodrop) y se usaron 200 ng de ARN para la transcripción inversa con cebadores aleatorios e inhibidor de RNasa (AB, Applied Biosystems). A continuación, el ADNC se usó posteriormente para los análisis de qPCR en un ABI700 usando química TaqMan, FAM-TAMRA (Life Technologies) con mezcla maestra que contenía ROX (Qiagen), cebadores y sondas indicados en la Tabla 3. Los valores de Ct para los genes de interés se dieron con referencia a siete patrones de concentración conocida, comenzando con 107 copias y procediendo en series de dilución 1:10. Los números de copias para todos los genes

de interés se normalizaron al gen de referencia 18s.

Cuantificación de citocinas por ELISA

- 5 Los lóbulos pulmonares restantes se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido, se homogeneizaron en 600 µl de PBS que contenía inhibidores de proteasa (Roche) mediante TissueLyser II ejecutado dos veces a 30 Hz durante 4 minutos. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación, las muestras se diluyeron 1:2 con PBS y se almacenaron a -80°C. Después, se analizó en el fluido del BAL la producción de KC/IL-8 (CXCL1) y TNF-α por ELISA DuoSet (R&D Systems) según las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Secuencias de cebador y sonda para qPCR

Gen	Secuencia (5'-3')		
	Directo	Inverso	Sonda
18s	CGCCGCTAGAGGT GAAATTCT	CATTCTTGGCAAATGCTTTC G	FAM- ACCGGCGCAAGACGGACCA GA-TAMRA
Rinovirus	GTGAAGAGCCsCrT GTGCT	GCTsCAGGGTTAAGGTTAG CC	FAM- TGAGTCCTCCGGCCCCCTGA ATG-TAMRA

- 10 Los análisis de qPCR se llevaron a cabo usando química TaqMan en un volumen total de 12.5 µl por reacción con relaciones óptimas de cebadores directos/inversos adaptados en el ADNc generado a partir del ARN extraído del lóbulo pulmonar apical de cada ratón.

Análisis estadístico

- 15 Para las comparaciones entre cohortes de ratones tratados con control de RV con solución salina, Pam2Cys-R4 o PEG-Pam2Cys-R4, se realizó un análisis de ANOVA de una vía. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo.

Resultados

- 20 Se administró a los ratones por vía intranasal a las vías respiratorias totales (50 µl) un intervalo de dosis de PEG-Pam2Cys-R4 y Pam2Cys-R4 como se indica (véase la Tabla 2). Después del tratamiento, los ratones se infectaron por vía intranasal con RV1B. Las cargas virales en el tracto respiratorio se determinaron por análisis de qPCR del ARN viral y la inflamación pulmonar se determinó mediante tinción diferencial de células inflamatorias del BAL y medición de mediadores inmunitarios de proteínas en el fluido del BAL.

Estudio 1A Tratamiento 1 día antes de la infección

- 25 Los ratones se trataron con la cantidad indicada de PEG-Pam2Cys-R4 y Pam2Cys-R4 un día antes de la infección por vía intranasal con RV. Los controles que no recibieron agonistas de TLR se trataron con solución salina (Figura 1a). La carga viral pulmonar se evaluó por qPCR. Se observó una reducción significativa en la carga viral para todas las dosis ensayadas (Figura 1b).

Estudio 1C Tratamiento 7 días antes de la infección

- 30 El estudio 1C se completó al mismo tiempo que 1A. Los ratones se trataron con la cantidad indicada de PEG-Pam2Cys-R4 y Pam2Cys-R4 siete días antes de la infección por vía intranasal con RV (Figura 2a). Los controles que no recibieron agonista de TLR-2 se trataron con solución salina. El tratamiento con agonista con todas las dosis dio como resultado una reducción muy significativa en la carga viral en comparación con los controles infectados con RV tratados con solución salina (Figura 2b).

- 35 El análisis de las células del BAL el día 2 p.i. indicó que todos los tratamientos aumentaron significativamente el número total de células inflamatorias, la mayoría de las cuales eran macrófagos, aunque se observaron números aumentados de linfocitos a dosis más bajas de tratamiento con agonistas (Figura 3a-b). Las citocinas inflamatorias en el BAL se midieron por ELISA. Se observó una producción significativamente reducida de la quimiocina CXCL1 reclutadora de neutrófilos para todos los grupos de tratamiento en comparación con ratones infectados tratados con solución salina (Figura 4a). También se observó una expresión reducida de TNFα para las dosis más altas de grupos de tratamiento con agonistas en comparación con controles infectados tratados con solución salina (Figura 4b).

- 40 Estudio 1B y 1D Tratamiento con dosis baja 7 días antes de la infección

Habiendo demostrado un potente efecto antiviral de larga duración asociado con la expresión reducida de citocinas inflamatorias, el diseño del estudio 1C se modificó para determinar si la eficacia antiviral se podría mantener con dosis más bajas. Comenzando con la dosis más baja de estudios previos (0.1 nmoles/ratón) se trataron grupos adicionales con 0.05 nmoles/ratón y 0.01 nmoles/ratón de Pam2Cys-R4 o PEG-Pam2Cys-R4 7 días antes del tratamiento viral

(Estudio 1B) o con 10 pmoles/ratón, 5 pmoles/ratón, 2 pmoles/ratón o 1 pmol/ratón de Pam2Cys-R4 o PEG-Pam2Cys-R4 7 días antes del tratamiento viral (Estudio 1D). No se observó pérdida de peso al final del estudio 1B o 1D. Se midió el ARN del RV en el tejido pulmonar para determinar si la reducción de la inflamación estaba asociada con una menor carga viral (Figura 5a-b). Todas las dosis de PEG-Pam2Cys-R4 inhibieron la replicación de RV. Pam2Cys-R4 también produjo una reducción significativa en el ARN viral a las dosis indicadas.

Para las células inmunitarias, Pam2Cys-R4 y PEG-Pam2Cys-R4 produjeron aumentos significativos en el reclutamiento de células después del tratamiento con las dosis indicadas (Fig. 6a, d). El aumento de células del BAL era promovida principalmente por el aumento del número de macrófagos (Fig. 6b, e). También se observó un número significativamente aumentado de linfocitos con las dosis indicadas (Figura 6c,f). Como se muestra en la Figura 6c, los linfocitos constituían aproximadamente 10% de las células totales del BAL en respuesta a las dosis indicadas. La inflamación neutrófila es una característica distintiva de las exacerbaciones víricas del asma y está relacionada con la gravedad de la enfermedad. Se esperaba que una reducción clínicamente significativa en la carga viral se asociara con una la inflamación neutrófila viral reducida de las vías respiratorias. En comparación con los ratones infectados con RV tratados con solución salina, hubo una reducción significativa en neutrófilos cuando se expresaban como un porcentaje de células totales del BAL, o números absolutos de células totales del BAL, a las dosis indicadas (Figura 7a-c). Para proporcionar evidencia adicional de la supresión mediada por agonista de TLR-2 de la inflamación inducida por virus, se midió el nivel de quimioquinas reclutadoras de neutrófilos (CXCL1) y de citocina inflamatoria TNF α en el BAL tanto para el estudio 1B como para el 1D. La replicación viral promueve la expresión de CXCL1, por lo que estos datos respaldan la supresión de la replicación del virus con el tratamiento con agonista de TLR-2. Para todas las dosis de agonista de TLR-2, se observó una reducción altamente significativa en la expresión de CXCL1 cuando se comparó con controles infectados con RV no tratados (Figura 8a, b). El tratamiento no tenía efecto en la producción de TNF α lo que confirma que el tratamiento no estaba produciendo activación de las rutas inflamatorias (Figura 8c, d).

Estudio 1E Comparación de tratamiento de (i) Peg-SS-Pam2Cys, Peg-S-Pam2Cys y Pam2CysSK4; y (ii) INNA-011 y Peg-S-Pam2Cys 7 días antes de la infección (intervalo de dosis 1 pmol - 10 pmol).

A continuación se evaluaron agonistas de TLR2 adicionales (Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys). Habiendo demostrado el efecto antiviral potente y de larga duración asociado con la expresión reducida de citocinas inflamatorias con las dosis más bajas de Pam2Cys-R4 y Peg-Pam2Cys-R4, los autores de la invención buscaron evaluar Peg-SS-Pam2Cys, Peg-S-Pam2Cys e INNA-011 en dosis similares. Por consiguiente, se trataron grupos de ratones con 10 pmol/ratón, 5 pmol/ratón, 2 pmol/ratón y/o 1 pmol/ratón 7 días antes de la infección (o 2 pmol en el caso de INNA-011). También se realizó una comparación con la molécula de Pam2CysSk4 disponible comercialmente usando las mismas dosis.

A continuación se evaluaron los pesos de los ratones a lo largo del tiempo. Los datos de peso de los ratones a lo largo del tiempo se agruparon visiblemente entre los diversos grupos. En el valor inicial (día -7) había una diferencia significativa entre los controles de RV con solución salina y el grupo de 1 pmol de Peg-SS-Pam2Cys ($p=0.046$ ANOVA de una vía) y había una tendencia hacia un peso más bajo dentro del grupo de 1 pmol de Peg-S-Pam2Cys ($p=0.091$ ANOVA de una vía) en el momento del tratamiento. Excepto por la dosis de 1 pmol de Pam2CysSK4, todos los grupos de ratones presentaron una tendencia a la ganancia de peso o no se observaron cambios en el peso (datos no mostrados). Había diferencias significativas entre ratones de 1 pmol de Peg-S-Pam2Cys y de control de RV con solución salina el día -4 y el día 1 después de infección, sin embargo, esto es probablemente debido a la agrupación estrecha del peso de ratones y no debido a la pérdida de peso inducida por el tratamiento con fármaco (datos no mostrados).

Para evaluar la eficacia antiviral de los agonistas de TLR definidos, se cuantificó el número de copias de RV en lisados pulmonares del lóbulo apical del pulmón de tres lóbulos mediante qPCR Taqman. Cada dosis de agonista de TLR dio como resultado una reducción significativa en la infección por RV. La supresión de Peg-S-Pam2Cys parecía ser dependiente de la dosis. Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys tienen mejor eficacia antivírica en comparación con Pam2CysSK4 en una dosis de 10 pmol. Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys redujeron la infección por RV en ~85% (84.82% con 10 pmol de Peg-SS-Pam2Cys y 86.76% con Peg-S-Pam2Cys) en comparación con solo una reducción de 58% con la misma dosis de Pam2CysSK4 ($p=0.0246$ por ANOVA de una vía) (Figura 9a). Notablemente, el tratamiento con INNA-011 reduce el ARN del RV en el pulmón en la misma medida que Peg-S-Pam2Cys (INNA-006) (9(a)(ii)).

La inflamación pulmonar evaluada por leucocitos totales en el BAL mostró que no había diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos con fármaco, en comparación con controles de RV con solución salina (Figura 9b). En este experimento, no fueron posibles recuentos celulares diferenciales debido a la pérdida de células en el punto de preparación del citocentrifugado (células que no se unen a portaobjetos) o en el punto de tinción (células que se desprenden de los portaobjetos cuando se sumergen en soluciones de fijación o tinción). Debido a esto, las soluciones de fijación y tinción se desecharon y sustituyeron. Los ajustes de la citocentrífuga también se cambiaron para aumentar la fuerza centrífuga relativa (300 rpm a 500 rpm) para garantizar leucocitos del BAL diferenciales exitosos en experimentos futuros. Una evaluación de neutrófilos en células del BAL a los 2 días después de infección demostró que INNA-011 y Peg-S-Pam2Cys (INNA-006) redujeron la inflamación neutrófila inducida por RV (Figura 9c).

El tratamiento con Peg-SS-Pam2Cys, Peg-S-Pam2Cys o Pam2CysSK4 redujo los niveles de CXCL1, la quimiocina de neutrófilos clave producida en respuesta a la infección por RV (Figura 9d-e). Todas las dosis de Peg-SS-Pam2Cys, así como la dosis de 10 pmol y 5 pmol de los compuestos Peg-S-Pam2Cys y Pam2CysSK4 redujo eficazmente los

niveles de CXCL1. Además, INNA-011 y Peg-S-Pam2Cys (INNA-006) redujeron la expresión inducida por RV de CXCL1. El TNF- α no aumentó mediante ninguno de los compuestos en este caso, proporcionando evidencia de que los agonistas de TLR definidos no promueven la inflamación.

Estudio 1F Interacción de tiempos del fármaco combinados y efecto tras la infección.

- 5 Para determinar si hay efecto sinérgico en la respuesta antiviral y la inflamación, los ratones recibieron dosis de forma profiláctica 7 días y/o 1 día antes de la infección con 2 pmol de Peg-SS-Pam2Cys o Peg-S-Pam2Cys. Un grupo recibió una dosis específicamente 7 días y 1 día antes de la infección. Después del(los) tratamiento(s), los ratones se infectaron por vía intranasal con RV1B (o tratados de manera simulada) y se registraron los pesos de los ratones (mediciones en gramos o porcentaje de cambio desde el valor inicial), se evaluó la inflamación en el BAL y se
- 10 cuantificaron las cargas víricas en las vías respiratorias. Las mediciones del peso del ratón y el cambio de peso en comparación con el valor inicial (día -7) indicaron que, como se observó previamente, la dosis de 2 pmol de cualquier compuesto no inducía pérdida de peso en ningún punto de tiempo (datos no mostrados). Lo que es más importante, no se observó pérdida de peso cuando los ratones se trataron con una segunda dosis de los agonistas de TLR (6 días después de la primera dosis el día antes de la infección).
- 15 Con el fin de probar el efecto del momento de la administración de estos agonistas de TLR, grupos separados de ratones se trataron por vía intranasal con 2 pmol de Peg-SS-Pam2Cys o Peg-S-Pam2Cys ya sea 7 días después de infección, 1 día después de infección, o una combinación de 7 y 1 días antes de infección. Después se inoculó a los ratones por vía intranasal con simulación o RV1B. La inflamación pulmonar en el BAL se evaluó 2 días después de la infección.
- 20 Para ensayar si el aumento en la inflamación pulmonar se atribuía a una mayor carga viral, o era producido por el fármaco, se evaluaron los números de copias de RV en el pulmón por qPCR. Cada grupo tratado con fármaco tuvo una reducción muy significativa en el número de copias virales y la combinación del tratamiento del día 7 y el día 1 con Peg-S-Pam2Cys mejoró la eliminación viral en comparación con la administración de dosis a ratones solo el día 7 (Figura 10a-b).
- 25 Los neutrófilos del BAL aumentaron solo significativamente en ratones con tratamiento con Peg-SS-Pam2Cys 1 día antes de la infección por RV o simulada. Sin embargo, los cantidades de linfocitos eran inducidas por Peg-SS-Pam2Cys en todos los tiempos de tratamiento (excepto el tratamiento del día -7 con infección por RV1B). La combinación de tratamiento con Peg-S-Pam2Cys 7 días antes, con 1 día antes de la infección también promovió el reclutamiento de linfocitos en el BAL (Figura 10c-d).
- 30 Los leucocitos totales aumentaron en ratones de control con simulación a los que se administró una dosis el día -1 de Peg-SS-Pam2Cys, en ratones con simulación a los que se administró Peg-SS-Pam2Cys tanto en los puntos temporales -7 como -1 y en ratones a los que se administró un tratamiento con Peg-S-Pam2Cys el día -7 en comparación con controles de simulación de solución salina (Figura 10e-f). Es interesante que las mismas pautas de administración en ratones infectados con RV1B no indujeron reclutamiento de leucocitos significativamente mayor en comparación con los controles de RV con solución salina. Al contrario que los experimentos anteriores, el aumento en
- 35 leucocitos totales del BAL no se debe al reclutamiento de macrófagos. Solo el grupo de simulación de Peg-S-Pam2Cys el día -7 tiene mayor cantidad de macrófagos en comparación con su grupo de control de simulación con solución salina.
- 40 Es interesante que a pesar de la inflamación neutrófila pronunciada en el grupo Peg-SS-Pam2Cys d-7/Simulación, la producción de CXCL1 solo aumentó en los grupos Peg-SS-Pam2Cys d-1/RV1B y Peg-S-Pam2Cys d-1/RV1B. También es importante observar que los ratones ya tratados el día -7 estaban protegidos de la inflamación pulmonar, inducida por la administración de Peg-SS-Pam2Cys o Peg-S-Pam2Cys el día -1 (Figura 10g-h). Según experimentos previos, Peg-SS-Pam2Cys o Peg-S-Pam2Cys no indujeron TNF- α en ninguno de los grupos.

Estudio 1G Tratamiento durante la infección por RV

- 45 Los ratones se infectaron por vía intranasal con RV1B y 1 día después de la infección los ratones se trataron con una dosis de 10, 5, 2 o 1 pmol de Peg-SS-Pam2Cys o Peg-S-Pam2Cys para evaluar la eficacia antiviral terapéutica y la interacción con la infección por RV confirmada en la inflamación pulmonar. Después de la infección por RV, se registraron los pesos de los ratones y se determinaron las cargas virales y la inflamación en las vías respiratorias.
- La administración de agonistas de TLR durante la infección redujo significativamente el número de copias de RV en el pulmón (Figura 11a). El estudio 1G y 1F (administración de dosis de agonista de TLR el día -1 y el día 1 después de infección) por lo tanto delimitan la inflamación de la carga viral.
- 50 No hubo diferencias significativas entre el número total de leucocitos en ratones tratados con Peg-SS-Pam2Cys o Peg-S-Pam2Cys durante la infección activa en comparación con ratones infectados tratados con solución salina (RV con solución salina) o RV y controles simulados. Sin embargo, Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys cambiaron ambos el perfil de leucocitos del BAL, reduciendo significativamente la cantidad de macrófagos y aumentando el reclutamiento de neutrófilos (Figura 11b-e). A diferencia de los estudios previos, no había cambios en el número de linfocitos.
- 55 La inflamación neutrófila en el BAL también se asoció con la producción de quimiocina de neutrófilos, CXCL1 y la citocina inflamatoria, TNF- α , las cuales eran ambas dependientes de la dosis del tratamiento con fármaco (Figura 11f-

g). Es importante que CXCL1 y TNF- α no aumentan con las dosis más bajas de Peg-SS-Pam2Cys o Peg-S-Pam2Cys.

Discusión

Este programa de trabajo *in vivo* se llevó a cabo en paralelo con experimentos *in vitro* en células epiteliales bronquiales primarias infectadas con RV. Los datos *in vitro* proporcionan evidencia del efecto antiviral de los agonistas de TLR2 definidos. El objetivo de los estudios en ratones era determinar si los agonistas de TLR2 candidatos (Pam2Cys-R4, Peg-Pam2Cys-R4, Peg-SS-Pam2Cys y PegS-Pam2Cys) son antivirales contra RV *in vivo* cuando se administran a las vías respiratorias inferiores y si la supresión de la infección viral proporcionaba evidencia de beneficio clínico reduciendo la inflamación de las vías respiratorias inducida por virus.

En el estudio, se administró a los ratones de 1A y ratones de 1B 0.1 nmoles, 1.0 nmol y 5 nmoles por ratón. La administración 7 días antes de la infección (estudio 1B) de la dosis más baja (0.1 nmoles) de Peg-Pam2Cys-R4 no produjo pérdida de peso significativa identificando un potencial efecto positivo de la pegilación en los efectos sistémicos de Pam2Cys. Para ambas pautas de administración (día -1 y día -7) hubo evidencia de inflamación celular inducida por agonistas, sin embargo, esto se asoció con cargas virales reducidas en ambos estudios. El tratamiento 7 días antes de la infección proporcionó una reducción impresionante en la carga viral (>90% de ARN viral reducido).

Todas las dosis para el estudio 1B produjeron activación inmunitaria. Esta consistía predominantemente en macrófagos probablemente implicados en la resolución de la inflamación neutrófila. Para dosis más bajas (1 y 0.1 nmoles) había evidencia de mayor reclutamiento de linfocitos indicativo de números más bajos de neutrófilos y resolución de inflamación neutrófila en estos grupos. Los datos de citoquinas respaldaban esto. El tratamiento con agonista de TLR2 7 días antes de la infección redujo el nivel de la quimiocina de neutrófilos CXCL1 inducida por virus. Dosis más altas también redujeron la expresión de TNF α . Este estudio demostró por primera vez que el tratamiento profiláctico (7 días antes de la infección) con un agonista de TLR2 podría inhibir la infección y esto estaba asociado con una reducción en los mediadores inflamatorios inducidos por virus.

Los estudios 1A (administración 1 día antes de la infección) y 1B (administración 7 días antes de la infección) se realizaron con el mismo grupo de ratones. Basándose en la pérdida de peso y el perfil inflamatorio se decidió reducir el intervalo de dosis para el estudio 1C (de 0.1 a 0.01 nmoles/ratón), 7 días antes de la infección con rinovirus. Ningún fármaco causó pérdida de peso cuando se administraron 0.01 nmoles/ratón. Los datos indicaban que la forma pegilada era toleraba mejor en términos de impacto en la pérdida de peso.

La evaluación de las células inflamatorias en el estudio 1C puso de manifiesto un aumento modesto de dos veces o menos en las células totales del BAL, que eran predominantemente macrófagos. Los macrófagos son importantes en la resolución de la inflamación neutrófila y pueden estar implicados mecanísticamente en el control mediado por agonistas de la inflamación inducida por virus en este modelo. De nuevo Peg-Pam2Cys-R4 era menos inflamatorio sin aumento en las células totales del BAL después del tratamiento con 0.05 nmoles/ratón y 0.01 nmoles/ratón. Una señal de linfocitos de nivel bajo, pero significativa era evidente excepto en la dosis más baja del grupo tratado con Peg-Pam2Cys-R4. Los neutrófilos son una lectura clave de la inflamación viral. Se observó una reducción casi significativa en neutrófilos del BAL con tratamiento con agonista. Dada la consistencia de la tendencia a la reducción de neutrófilos, los autores de la invención están seguros de que un estudio repetido para aumentar el tamaño del conjunto de datos mostrará que este efecto (reducción > 50%) es estadísticamente significativo. El máximo de neutrófilos del BAL en el modelo de ratón de infección por RV es 1 día después de la infección, por lo que es probable que estudios futuros que se centren en el control de la inflamación neutrófila viral por el agonista de TLR2 obtengan una señal más clara si se evalúa un día antes.

De acuerdo con la reducción de neutrófilos, el tratamiento con agonista era altamente eficaz en la supresión de la expresión de CXCL1. No hubo efecto en el TNF α lo que confirmaba que el tratamiento no causaba activación significativa de las vías inflamatorias. La replicación viral promueve la activación inmunitaria innata y la expresión de CXCL1, por lo que estos datos respaldan que la replicación del virus y la inflamación inducida por la infección son suprimidas con el tratamiento con agonista de TLR2. El análisis del ARN viral confirmó esto con el tratamiento con Peg-Pam2Cys-R4 induciendo una reducción significativa en la carga viral con todas las dosis. La dosis más alta solamente (0.1 nmoles/ratón) de Pam2Cys-R4 proporcionó una reducción significativa en la carga de virus.

Después de haber completado estudios de prueba de concepto con Pam2Cys-R4 y Peg-Pam2Cys-R4, los autores de la invención a continuación se centraron en Peg-SS-Pam2Cys, Peg-S-Pam2Cys e INNA-011. Aparte de una reducción transitoria en el aumento de peso con la dosis de tratamiento más alta (10 pmoles por ratón), Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys no afectaron al peso de los ratones. La falta de inflamación clínicamente perjudicial era consistente con la falta de inducción de TNF α y la inflamación neutrófila significativamente reducida, producidas por una reducción altamente significativa (>80%) en la carga viral. La potencia de Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys en términos de efecto antiviral era similar y superior a Pam2CSK4 que redujo la carga viral pulmonar en un 50%. Estos datos confirmaban que Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys suprimían potentemente la inflamación viral cuando se administraban siete días antes de la infección con RV. Además, INNA-011 también produjo un efecto inhibitorio significativo sobre la inflamación viral.

A continuación, se investigó la interacción de múltiples dosis de Peg-SS-Pam2Cys y -Peg-S-Pam2Cys y la proximidad

de la administración a la infección por RV. En términos de inflamación pulmonar (examinando la respuesta al tratamiento con fármaco solamente) en ratones no infectados tres días después de la administración (grupos d-1) hubo una respuesta neutrófila a Peg-SS-Pam2Cys (no Peg-SPam2Cys). Esta respuesta se reducía si estaba precedida por el tratamiento seis días antes. El experimento identificó por lo tanto un efecto inesperado de múltiples dosis, de manera que la dosis primaria reducía la respuesta inflamatoria de la dosis secundaria. Una posible explicación para esto es la inducción de rutas de resolución de inflamación tales como macrófagos antiinflamatorios que fagocitan neutrófilos apoptóticos que operan cuando se administra el segundo agonista. Este mismo experimento también identificó una diferencia entre Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys en términos de potencia inflamatoria (Peg-SS-Pam2Cys más inflamatorio). Los niveles de CXCL1 aumentaron significativamente en ratones tratados un día antes de la infección, pero este efecto se suprimía completamente si los ratones habían recibido tratamiento previo el día -7. A pesar de la inflamación suprimida después de múltiples tratamientos no había pérdida de inmunidad antiviral. De hecho, el tratamiento tanto el día -7 como el -1 fue más eficaz (aprox. 90% de reducción en ARN viral) que un único tratamiento el día -7 (70% de ARN viral reducido).

En el estudio final se examinó la eficacia terapéutica de Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys administrados un día después de la infección por RV1B (protocolo de tratamiento). Hubo evidencia clínica de inflamación potenciada en términos de pérdida de peso con las dosis más altas. Esto se reflejaba por la expresión dependiente de la dosis de mediadores inflamatorios y reclutamiento de neutrófilos. Para las dosis más bajas (2 pmol y 1 pmol) no hubo un aumento significativo en KC o TNF α por encima del inducido por infección por RV sin tratamiento. Hubo una reducción significativa en la carga viral pulmonar para dosis de 5 pmol por ratón y menores. La dosis más alta (10 pmol por ratón) era menos eficaz y no significativa para Peg-SPam2Cys. Estos datos son coherentes con los datos de carga viral del estudio 1A (Fig. 4) que también indicaban que la dosis más alta pierde efecto antiviral. Esto es típico de una curva de respuesta a la dosis en forma de campana y a menudo se observa con agonistas-antagonistas mixtos

En resumen, este estudio muestra por primera vez que el tratamiento profiláctico con un agonista de TLR-2 representativo puede inhibir la infección mediada por virus que está asociada con una reducción en la carga viral y mediadores inflamatorios inducidos por virus que incluyen la quimiocina CXCL1. Estos estudios demuestran una potente actividad antiviral contra la infección por RV de los compuestos estructuralmente diversos que comprenden agonistas de TLR2. Además, la actividad antiviral contra la infección por rinovirus puede conseguirse con dosis de agonista que no causen señales clínicas o inmunopatológicas. Estos datos también demuestran que múltiples dosis de agonistas de TLR protegen contra el efecto inflamatorio agudo de la respuesta primaria al tratamiento con agonistas sin comprometer la actividad antiviral. Además, el tratamiento después de infección suprime la replicación viral con tan solo 1 pmol por ratón, induce neutrofilia, pero a dosis bajas no aumenta las citocinas inflamatorias.

Sin estar ligado a ninguna teoría o modo de acción, parece que el mecanismo de protección contra la infección implica potencialmente activación de macrófagos y linfocitos tanto no inmunitaria (epitelio de las vías respiratorias) como de bajo nivel.

Ejemplo 2

Efecto protector y terapéutico del agonista de TLR2 contra infección por rinovirus en células epiteliales bronquiales asmáticas primarias

Este estudio se llevó a cabo para determinar si el tratamiento o prevención con agonistas de TLR2 reduce la carga viral y los mediadores inmunitarios inducidos por virus durante la infección por rinovirus en células epiteliales bronquiales asmáticas humanas diferenciadas en la interfase aire-líquido (ALI).

Diferenciación en la interfase aire-líquido de células epiteliales bronquiales primarias de pacientes con EPOC

Se cultivaron células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de 6 pacientes asmáticos persistentes leves a moderados (Figura 12a) hasta la confluencia (pase 3) en un matraz T75 y se diferenciaron en la interfase aire-líquido (ALI). En resumen, las células primarias se cultivaron en BEGM completo (Lonza) con suplementos de factores de crecimiento en cultivo monocapa sumergido y luego se sembraron a 2 x 10⁵ células en Transwell (Corning n.º cat. 3460) en una placa de 12 pocillos con medio inicial de ALI compuesto por 50% de BEBM/50% de DMEM que contenía hidrocortisona al 0.1%, insulina bovina al 0.1%, epinefrina al 0.1%, transferrina al 0.1%, extracto de pituitaria bovina al 0.4% (todos de Lonza singlequots, n.º cat. CC-3171) y etanolamina (concentración final 80 μ M), MgCl₂ (concentración final 0.3 mM), MgSO₄ (concentración final 0.4 mM), albúmina de suero bovino (concentración final 0.5 mg/ml), anfotericina B (concentración final 250 μ g/ml), ácido retinoico todo trans (30 ng/ml) y penicilina estreptomycin al 2% con 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial humano recombinante (rhEGF) hasta confluencia (al menos tres días tanto en compartimentos apicales como basales). Una vez confluyente, la concentración de rhEGF se cambia a 0.5 ng/ml durante la fase de ALI para la diferenciación en el compartimento basal (debajo del inserto Transwell) sin medio apical hasta el día 21 después de la siembra inicial.

Lecturas de resistencia eléctrica transepitelial

La resistencia eléctrica transepitelial se midió usando un voltímetro epitelial WPI EVOM con corriente AC a través de un conjunto de electrodos de palillos STX2, colocados simultáneamente en el medio apical y el medio basal. Se registró un promedio de tres lecturas para cada punto de tiempo, comenzando el día cero (cuando las células sembradas se

vuelven confluentes), continuando semanalmente durante todo el crecimiento y diferenciación (el día 7, día 14 y 21) y después siguiendo la diferenciación, en relación con el tiempo de infección (-2 h, 0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h después de infección), y la resistencia se expresó como ohmios (Ω)/cm²

Recogida de muestras de cultivos en ALI

- 5 Se recogieron muestras de cultivo en ALI a las 48 y 96 horas después de infección. En cada punto de tiempo, se retiró medio apical de los cultivos y se almacenó a -80°C para los análisis de expresión de proteínas y la mitad de la membrana Transwell se cortó cuidadosamente de los insertos y se recogió en 350 μ l de tampón RLT (Qiagen) que contenía 2-mercaptoetanol al 1% (2ME) para los análisis moleculares posteriores por RT-qPCR, mientras que la membrana Transwell restante se reservó para los análisis de proteínas.

10 Extracción de ARN y qRT-PCR

- Las membranas Transwell en tampón RLT/2ME se agitaron con vórtice en pulsos para separar y lisar las células de la membrana. Se retiraron las membranas y se extrajo el ARN usando un kit miRNeasy (Qiagen) siguiendo el protocolo de los proveedores recomendado para extraer el ARN total, incluyendo miARN de células y tejidos animales y humanos en la plataforma semiautomatizada Qiacube. Después de la extracción, la concentración de ARN se determinó usando espectrofotometría (Nanodrop) y se usaron 200 ng de ARN para la transcripción inversa con cebadores aleatorios e inhibidor de RNasa (AB, Applied Biosystems). A continuación, el ADNc se usó posteriormente para los análisis de qPCR en un ABI700 usando química TaqMan, FAM-TAMRA (Life Technologies) con mezcla maestra que contenía ROX (Qiagen), cebadores y sondas indicados en la Tabla 3. Los valores de Ct para los genes de interés se dieron con referencia a siete patrones de concentración conocida, comenzando con 107 copias y procediendo en series de dilución 1:10. Los números de copias para todos los genes de interés se normalizaron respecto al gen de referencia 18s.

Los análisis de qPCR se llevaron a cabo usando química TaqMan en un volumen total de 12.5 μ l por reacción con relaciones óptimas de cebadores directos/inversos adaptados en ADNc generado a partir de ARN extraído de lisados celulares de la mitad de una membrana Transwell de interfase aire-líquido.

Soluciones madre de virus

- 25 Infección vírica a una MOI de 0.1 2 h de adsorción
RV1-B (Mayo 2010 solución madre 1.55 x 10⁸ TCID₅₀/ml)
MOI 1 = 6.45 μ l de RV1B + 243.55 μ l mínimo
MOI 0.1 = 1/10 de MOI 1
Preparar 7W (250 μ l cada uno) = 175 μ l MOI 1 RV1B + 1575 μ l mínimo
- 30 Tiempos de recolección de infección
En el punto de tiempo:
Volver a leer la TEER (asegurando que no se contaminen de forma cruzada las muestras tratadas con virus)
Retirar el líquido sobrenadante apical
Recoger 500 μ l y almacenar a -80°C
- 35 Retirar los Transwell a una placa de recogida que contiene 1 ml de PBS.
Proteína: seguir el método de GLP855 y AR y extraer proteína de la mitad de la membrana en 200 μ l de tampón de lisis de proteína (almacenar a -80°C)
ARN: seguir GLP855 y extraer el ARN de la mitad de la membrana en 350 μ l de tampón de lisis RLT (almacenar a -80°C)

40 Cuantificación de la producción de citocinas e interferones

- Se analizó en el líquido sobrenadante apical de los cultivos en ALI la producción de IL-6 e IP-10 (CXCL10) mediante matriz de perlas citométricas multiplexada (CBA) según las instrucciones del fabricante con conjuntos BD CBA Flex (BD). Brevemente, las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se mezclaron 50 μ l de muestra con perlas multiplexadas recubiertas con IL-6 o IP-10 antihumano y posteriormente se incubaron con anticuerpos de detección conjugados con ficoeritrina (PE). Las muestras se analizaron en un formato de placa de 96 pocillos, FACS Canto-II, y las perlas recubiertas con IL-6 e IP-10 se diferenciaron basándose en la agrupación de APC y APC-Cy7 y la intensidad de PE de valores desconocidos con referencia a una curva de calibración de concentraciones conocidas usando el software FCAP-Array (versión 3). Se usó ELISA para la cuantificación de IFN- λ , IL-8 y CCL22 (R&D systems DuoSet) e IFN- β (ensayos de PBL) según las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Se usó la prueba T de datos no emparejados no paramétrica (Mann Whitney) para toda la estadística comparando un tratamiento con control de RV con solución salina. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo. Se usó la prueba de Friedman para la evaluación de la expresión de interferón y la expresión de mediadores inflamatorios entre grupos de control de RV con solución salina y el tratamiento con Pam2Cys-R4 a las dosis indicadas.

Resultados

Para determinar si Pam2Cys-R4 podría inducir una respuesta antivírica en células epiteliales de las vías respiratorias asmáticas, se generaron cultivos epiteliales completamente diferenciados de cinco pacientes con asma. Estos cultivos se trataron con dos dosis de Pam2Cys-R4 (0.2 μM o 0.02 μM) en medio de privación 24 horas antes de la infección (pretratamiento; modelo preventivo) o 2 horas después de la infección por RV (postratamiento; modelo terapéutico). Se añadió medio a las células no tratadas. Se observó una tendencia consistente de reducción del ARN viral en cultivos tratados y esto alcanzó significación estadística para el grupo de pretratamiento de 0.02 μM y postratamiento de 0.2 μM a las 96 horas después de infección (Figura 12b-e). Estos datos sugieren que la cinética de la respuesta antivírica puede manipularse con la dosis.

La replicación del RV genera ARN viral que activa los receptores de reconocimiento de patrones de patógenos (PRR), la inmunidad innata y la producción de interferones de tipo I/III (IFN β /IFN λ). Se ha mostrado que este proceso está alterado en el asma, particularmente en formas más graves de la enfermedad. Para determinar si el tratamiento con Pam2Cys-R4 estaba inhibiendo la replicación viral, se midió la producción de IFN inducida por virus. Se midieron los niveles de proteína de tipo I (IFN β) y tipo III (IFN λ) en los medios apicales (Figura 13a-d). Para todas las condiciones de tratamiento había una tendencia de que el tratamiento con agonista de TLR-2 reducía la expresión de IFN y esto se correspondía con la reducción significativa en la replicación viral para el grupo de postratamiento 0.2 μM de 96 h mostrado en la Figura 12.

El agonista indujo la producción de mediadores inflamatorios IP-10, IL-6, IL-8 y CCL22 por células no infectadas y células infectadas (Figura 14a-h). La IL-6 presenta propiedades tanto pro- como antiinflamatorias y su papel en el asma es algo controvertido. Se acepta generalmente que niveles elevados están relacionados con la gravedad del asma. La IL-8 es una quimiocina de neutrófilos y es otro biomarcador del asma aguda grave. CCL22 es una quimiocina que se une al receptor CCR4 en la superficie de células Th2 y células linfoides innatas de tipo 2 y está asociada con inflamación de tipo 2 en asma. Estos datos demuestran que el tratamiento con agonista de TLR-2 puede reducir el pico y la duración de la infección sin producir un aumento importante en la inflamación, como se demuestra por la medición de los marcadores inflamatorios definidos. Estudios clínicos han mostrado que el pico y la duración de la carga viral están asociados con la gravedad de la enfermedad en el asma, respaldando la idea de que la disminución de la replicación viral reducirá la gravedad de la enfermedad.

A continuación, se llevaron a cabo experimentos para evaluar la actividad antivírica de las variantes de agonistas de TLR2 de Pam2Cys-R4, Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys, en comparación con Pam2CSK4 disponible comercialmente. Se llevaron a cabo experimentos iniciales usando la línea celular BCi-NS1 epitelial bronquial humana. Esta es una línea celular epitelial bronquial humana mínimamente inmortalizada que expresa constitutivamente la telomerasa transcriptasa inversa humana. Esta línea celular se derivó del cepillado del epitelio de las vías respiratorias de un voluntario sano y conserva las características de las células primarias originales durante más de 40 pases. Una característica clave retenida por estas células es que pueden diferenciarse en la ALI. Las células no se trataron o se pretrataron con Pam2Cys-R4, Peg-SS-Pam2Cys y Peg-S-Pam2Cys, o Pam2CysSK4 (CSK4) en las dosis indicadas. Las células se infectaron después con RV1B y los niveles de ARN viral se midieron a las 96 h p.i. (Figura 15a-b). En comparación con el control, el tratamiento con Peg-S-Pam2Cys (20 nM y 2 nM) redujo significativamente los niveles de ARN viral en aproximadamente 50% a las 96 h después de la infección.

En resumen, este estudio demuestra que el tratamiento con agonista de TLR-2 del epitelio asmático completamente diferenciado tomado de pacientes humanos con diferentes gravedades de asma, inhibe la replicación viral y la producción asociada de mediadores antivirales innatos inducidos por replicación viral. Estos resultados son significativos porque muestran por primera vez que un agonista de TLR2 puede suprimir la replicación del rinovirus sin el requisito de desencadenar primero la producción de IFN y respuestas antivíricas mediadas por IFN.

Las células epiteliales para este estudio se han adquirido para pacientes con asma persistente de leve a moderada. En comparación con las células de pacientes con enfermedad grave, es más probable que estas células tengan una respuesta antivírica totalmente funcional con la expresión de interferón "normal". Incluso así, se pudo observar un control mejorado de la infección con tratamiento con agonista.

Significativamente, la respuesta antivírica no depende de respuestas mediadas por IFN. Esto es importante porque la expresión de interferón es extremadamente variable, particularmente en formas más graves de asma. Por tanto, controlar la respuesta terapéutica a un agonista de TLR que induce IFN (p. ej., agonista de TLR3 o TLR7) podría ser problemático y podría no conducir a efecto terapéutico o inflamación en exceso y efectos secundarios asociados en ensayos clínicos. La variabilidad en la respuesta a IFN recombinante en asma se ha observado en ensayos clínicos previos. Una disminución de las exacerbaciones sólo se observó en estos ensayos en el subgrupo grave, limitando la

aplicación de este tratamiento en el asma. Como se observaron cargas virales reducidas en células de pacientes asmáticos persistentes leves y moderados en los presentes experimentos, esto sugiere que dirigirse a una ruta antivírica no dependiente de interferón puede tener una aplicación más amplia entre fenotipos de asma.

Pam2Cys-R4 indujo la producción de los mediadores inflamatorios IL-6, IL-8 y CCL22 pero no IP-10 tanto en células infectadas como no infectadas. Según los resultados de los autores de la invención, se ha descrito que la activación de TLR2 induce la expresión epitelial de citocinas y quimiocinas inflamatorias en otros sistemas. La IL-6 presenta propiedades tanto pro- como antiinflamatorias y su papel en el asma es controvertido. Se acepta generalmente que niveles elevados de IL-6 están relacionados con la gravedad del asma. La IL-8 es una quimiocina de neutrófilos y es otro biomarcador del asma aguda grave. CCL22 es una quimiocina que se une al receptor CCR4 en la superficie de células Th2 y células linfoides innatas de tipo 2 y está asociada con inflamación de tipo 2 en asma. Después del tratamiento con Pam2Cys-R4, la expresión aumentada de estos mediadores era modesta (generalmente menos de 2 veces).

Los macrófagos alveolares son la célula inmunitaria residente predominante en las vías respiratorias y las células del BAL de pulmones sanos son típicamente 85% de macrófagos. Se evaluó la respuesta de macrófagos del BAL a la exposición simultánea a RV y Pam2Cys-R4 o Peg-Pam2Cys-R4 para identificar el tipo y magnitud de citocinas inflamatorias inducidas. Se midieron IL-6, IL-8 y TNF α . CXCL10 (IP10) fue indetectable. Para la mayoría de los experimentos, la exposición a RV solo no indujo IL-6, IL-8 ni TNF α . Dado que los macrófagos no son permisivos para la infección por RV, esto no fue inesperado.

Tanto las BEC como los macrófagos expresaban IL-6, IL-8 y TNF α en respuesta a la activación de TLR2. CXCL10 era expresada por el epitelio, pero no por macrófagos del BAL en respuesta a la infección por RV y/o la estimulación por TLR2. Esta observación ayuda a entender las respuestas que podríamos esperar durante estudios clínicos humanos, la expresión de IP10 probablemente indicará que el epitelio está siendo activado mientras que la expresión de citocinas inflamatorias en ausencia de CXCL10 podría indicar que el epitelio no está siendo activado y que las células inmunitarias (macrófagos) están respondiendo.

Habiendo demostrado la prueba de concepto de los experimentos con Pam2Cys-R4 y Peg-Pam2Cys-R4, se avanzó con la selección de candidatos y se evaluó el efecto antiviral de análogos estructurales de Pam2Cys-R4 y Peg-Pam2Cys-R4, en concreto, Peg-SS-Pam2Cys, Peg-S-Pam2Cys. Se usaron Pam2Cys-R4 y el agonista de TLR2 disponible comercialmente Pam2CSK4 como controles.

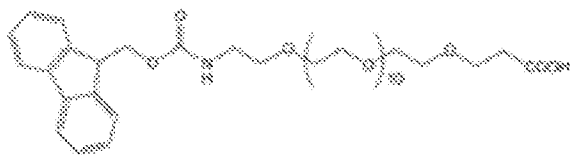
La primera ronda de experimentos se llevó a cabo en la línea celular epitelial bronquial humana sana BCI-NS1. Estas células se comportan como células primarias en cuanto que son capaces de formar epitelio pseudoestratificado en la ALI. Se confirmó que los compuestos agonistas de TLR2 estructuralmente relacionados presentan potente actividad antivírica. En conclusión, estos estudios demuestran la capacidad de los agonistas de TLR-2 representativos para actuar como un antiviral contra la infección por RV en células epiteliales asmáticas.

Ejemplo 3

Síntesis de INNA-003 e INNA-006

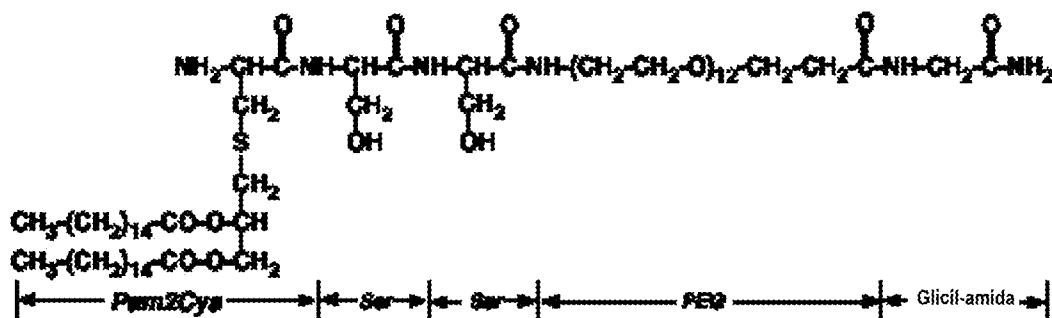
Síntesis de INNA-003 e INNA-006

Reactivos: Soporte de fase sólida: resina RAM TentaGel S (factor de sustitución 0.24 mmol/g; Rapp Polymere, Tübingen, Alemania). Derivados de aminoácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-homo-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-NH-(PEG)₃-COOH, Fmoc-NH-(PEG)₅-COOH, Fmoc-NH-(PEG)₁₁-COOH, Fmoc-NH-(PEG)₂₇-COOH de Merck (Darmstadt, Alemania).

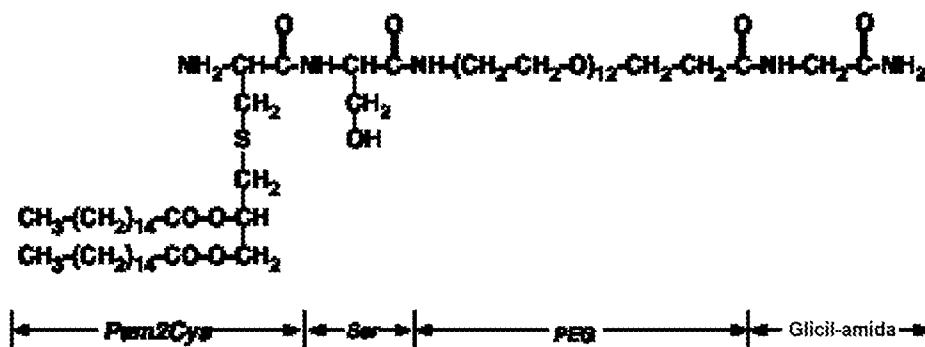


Nota. El uso del número de catálogo de Merck 851024 da lugar a las estructuras mostradas a continuación como "INNA-003" (que también se puede denominar en el presente documento Pam2Cys-SS-PEG) e "INNA-006" (que también se puede denominar en el presente documento Pam2Cys-S-PEG).

INNA-003:



INNA-006, o compuesto (1):



- 5 Acilación: En todas las etapas de acilación se usa un exceso molar de 4 veces de Fmoc-aminoácido, hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) y un exceso molar de 6 veces de diisopropiletilamina (DIPEA). Todas las reacciones de acilación se llevan a cabo durante 60 minutos y la finalización de la reacción se confirma mediante la prueba del ácido trinitrobencenosulfónico (TNBSA). La eliminación del grupo protector Fmoc de los grupos α-amino se logra exponiendo el soporte de fase sólida a diazabicio[5.4.0]undec-7-eno al 2.5% (DBU; Sigma, Steinheim, Alemania) durante 2 x 5 minutos. Se usa dimetilformamida (DMF; Auspep, Melbourne, Australia) para lavar el soporte en fase sólida entre cada etapa de acilación y desprotección. El acoplamiento de Fmoc-NH-(PEG)₁₁-COOH (Merck, Bayswater, Australia) se lleva a cabo de la misma manera que los aminoácidos de acoplamiento.
- 10

Nota. La glicina se acopla primero al soporte en fase sólida RAM TentaGel S seguido de Fmoc-NH-(PEG)₁₁-COOH.

Cuantificación de péptidos

- 15 La cuantificación de los materiales basados en péptidos se determinó mediante análisis de aminoácidos realizado al vacío por hidrólisis de muestras a 110°C en viales de vidrio sellados en presencia de HCl 6 N que contiene fenol al 0.1%. La derivatización de los aminoácidos se llevó a cabo después usando reactivos AccQTag de Waters según las instrucciones del fabricante seguido de análisis en un sistema de UPLC Waters Acquity (Waters Millipore) usando una ultracolumna AccQTag (2.1 mm x 100 mm; Waters Millipore).
- 20 Preparación de INNA-003 e INNA-006

En el caso de INNA-003 se acoplan dos restos de serina sucesivamente después de la adición del resto de PEG y en el caso de INNA-006 se incorpora una sola serina después de la adición del resto de PEG.

Lipidación (adición de Pam2Cys).

- 25 Síntesis de S-(2,3-dihidroxipropil)cisteína: Se añade trietilamina (6 g, 8.2 ml, 58 mmoles) al hidrocloreto de L-cisteína (3 g, 19 mmoles) y 3-bromo-propan-1,2-diol (4.2 g, 2.36 ml, 27 mmoles) en agua y la solución homogénea se mantiene a temperatura ambiente durante 3 días. La solución se reduce al vacío a 40°C hasta un residuo blanco que luego se precipita con acetona (300 ml) y el precipitado se aísla por centrifugación. El precipitado se lava dos veces más con acetona y se seca para producir la S-(2,3-dihidroxipropil)cisteína como un polvo amorfo blanco.
- 30 Síntesis de N-fluorenilmetoxycarbonil-S-(2,3-dihidroxipropil)-cisteína (Fmoc-Dhc-OH): Se disuelve S-(2,3-dihidroxipropil)cisteína (2.45 g, 12.6 mmol) en carbonato sódico al 9% (20 ml). Se añade entonces una solución de fluorenilmetoxycarbonil-N-hidroxisuccinimida (3.45 g, 10.5 mmoles) en acetonitrilo (20 ml) y se agita la mezcla durante 2 h, se diluye con agua (240 ml) y se extrae con éter dietílico (25 ml x 3). La fase acuosa se acidifica a pH 2 con ácido clorhídrico concentrado y después se extrae con acetato de etilo (70 ml x 3). El extracto se lava con agua (50 ml x 2) y solución saturada de cloruro de sodio (50 ml x 2). El extracto se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se evapora a

sequedad. El producto final se obtiene aplicando alto vacío para eliminar el disolvente residual.

Acoplamiento de Fmoc-Dhc-OH al péptido unido a la resina: Se activa Fmoc-Dhc-OH (100 mg, 0.24 mmol) en DCM y DMF (1:1, v/v, 3 ml) con HOBt (36 mg, 0.24 mmol) y DICI (37 μ l, 0.24 mmol) a 0°C durante 5 min. La mezcla se añade después a un recipiente que contiene el péptido unido a resina (0.04 mmol, 0.25 g de resina amino-péptido). Después de agitar durante 2 h, la solución se separa por filtración en un embudo de vidrio sinterizado (porosidad 3) y la resina se lava con DCM y DMF (3 x 30 ml cada uno). Se vigila la terminación de la reacción usando el ensayo TNBSA. Si es necesario se realiza un doble acoplamiento.

Palmitoilación de los dos grupos hidroxilo de la resina Fmoc-Dhc-péptido: Se disuelven ácido palmítico (204 mg, 0.8 mmol), DIPCDI (154 μ l, 1 mmol) y DMAP (9.76 mg, 0.08 mmol) en 2 ml de DCM y 1 ml de DMF. La resina Fmoc-Dhc-péptido unido a resina (0.04 mmol, 0.25 g) se suspende en esta solución y se agita durante 16 h a temperatura ambiente. La solución se separa por filtración y la resina se lava luego con DCM y DMF a fondo para eliminar cualquier residuo de urea. La eliminación del grupo Fmoc se realiza con DBU al 2.5% (2 x 5 min).

Escisión del péptido del soporte sólido: Reactivo B (TFA al 93%, agua al 5% y triisopropilsilano al 2%) durante dos horas. Nota, el péptido no precipitará en éter enfriado. La mayor parte del TFA debe eliminarse y después el residuo se disuelve en acetonitrilo al 50% y se purifica inmediatamente o se liofiliza.

Purificación y caracterización de INNA-003 e INNA-006:

Después de la escisión del soporte sólido, INNA-003 e INNA-006 se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa usando una columna C4 VYDAC (10 mm x 250 mm; Alltech, NSW, Australia) instalada en un sistema de HPLC Waters (Waters Millipore, Milford, MA, EE. UU.). La identidad de los materiales objetivo se determinó por espectrometría de masas y el material purificado se caracterizó después por HPLC analítica usando una columna VYDAC C8 (4.6 mm x 250 mm) y se encontró que era mayor de 95%. El análisis de masas se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas de trampa iónica Agilent serie 1100 LC/MSD (Agilent, Palo Alto, CA, EE. UU.).

Preparación del compuesto (2) o Pam2Cys-Thr-PEG, se incorpora una sola treonina después de la adición del resto PEG11. La adición de Pam2Cys (lipidación) se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

Preparación del compuesto (3) o Pam2Cys-homoSer-PEG, se incorpora una sola homoserina después de la adición del resto PEG11. La adición de Pam2Cys (lipidación) se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

Preparación del compuesto (4) o Pam2Cys-fosfoSer-PEG, se incorpora una sola fosfoserina después de la adición del resto PEG11. La adición de Pam2Cys (lipidación) se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

Preparación de Pam2Cys-Ser-PEG3, se acopló el resto PEG3 en lugar de PEG11 después del acoplamiento del primer aminoácido glicina. Después del acoplamiento de un solo resto de serina, se llevó a cabo la adición de Pam2Cys (lipidación) como se ha descrito anteriormente.

Preparación de Pam2Cys-Ser-PEG5, se acopló PEG5 en lugar de resto PEG11 después del acoplamiento del primer aminoácido glicina. Después del acoplamiento de un solo resto de serina, se llevó a cabo la adición de Pam2Cys (lipidación) como se ha descrito anteriormente.

Preparación del compuesto (5), se acopló PEG27 en lugar del resto PEG11 después del acoplamiento del primer aminoácido glicina. Después del acoplamiento de un solo resto de serina, se llevó a cabo la adición de Pam2Cys (lipidación) como se ha descrito anteriormente.

Preparación del compuesto (6), el resto PEG27 se acopló secuencialmente dos veces después del acoplamiento del primer aminoácido glicina. Después del acoplamiento de un solo resto de serina, se llevó a cabo la adición de Pam2Cys (lipidación) como se ha descrito anteriormente.

Preparación del compuesto (2a), se incorporan dos treoninas después de la adición del resto PEG11. La adición de Pam2Cys (lipidación) se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente.

Preparación del compuesto (3a), se incorporan dos homoserinas después de la adición del resto PEG11. La adición de Pam2Cys (lipidación) se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente.

Preparación del compuesto (4a), se incorporan dos fosfoserinas después de la adición del resto PEG11. La adición de Pam2Cys (lipidación) se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente.

Preparación del compuesto (5a), se acopló PEG27 en lugar del resto PEG11 después del acoplamiento del primer aminoácido glicina. Después del acoplamiento de dos restos de serina, se lleva a cabo la adición de Pam2Cys (lipidación) como se ha descrito anteriormente.

Preparación del compuesto (6a), el resto PEG27 se acopló secuencialmente dos veces después del acoplamiento del primer aminoácido glicina. Después del acoplamiento de dos restos de serina, se lleva a cabo la adición de Pam2Cys (lipidación) como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 4

Los objetivos principales del siguiente estudio eran determinar si la eficacia antiviral de un compuesto que comprende un agonista de TLR2 y la supresión de la inflamación inducida por virus posterior se mantiene por tratamiento con el compuesto en presencia de FP, y si el tratamiento profiláctico con el compuesto revierte la supresión de FP de la defensa antiviral innata durante la infección por rinovirus en ratones.

Animales experimentales

Se usaron ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad para todos los estudios. Cada grupo contenía 8 ratones. Después de los procedimientos de tratamiento o de exposición, se vigiló en los ratones diariamente los cambios de peso y cambios de comportamiento o físicos según se estipula en la aprobación de ética animal. En el momento de la recogida de muestra, todos los ratones se sacrificaron con administración intraperitoneal de pentobarbital sódico.

Administración de INNA-006 e infección por rinovirus serotipo 1B (RV1B)

El rinovirus serotipo 1B se purificó originalmente a partir de un aislado clínico y se cultivó en células RD-ICAM y se purificó como se ha descrito previamente en *Nat Med* 14, 199-204 (2008) y *Methods Mol Biol* 1221, 181-188 (2015). Se administraron 50 µl de moléculas agonistas por vía intranasal (i.n.) a los ratones bajo anestesia ligera con isoflurano en una cámara de inducción dentro de una cabina de bioseguridad de clase II. En los tiempos indicados después de la administración del agonista de TLR-2, los ratones se infectaron por vía i.n. con 50 µl que contenían 5 x 10⁶ TCID₅₀ de RV1B usando el mismo procedimiento. El día 2 después de la infección se realizó un lavado broncoalveolar (BAL) para el recuento en el infiltrado de células inflamatorias y medir la expresión de proteínas mediadores inmunitarios. Se recogieron los pulmones para determinar el ARN total para evaluar las cargas virales. El modelo de ratón de infección por RV y las técnicas asociadas se describen en publicaciones *Nat Med* 14, 199-204 (2008) y *Methods Mol Biol* 1221, 181-188 (2015).

Análisis de células del lavado broncoalveolar (BAL)

Después del sacrificio, se introdujo una cánula traquealmente en los ratones y se lavó con descarga de 1 ml de solución salina tamponada de Hanks (Hyclone™, GE Life Sciences) a través de las vías respiratorias, 3-5 veces. Las células del BAL se sedimentaron por centrifugación y el líquido sobrenadante se recogió y almacenó a -80°C para los ELISA. Las células sedimentadas eran glóbulos rojos lisados y las células restantes se contaron en un hemocitómetro por exclusión con azul de tripano. Las suspensiones celulares se citocentrifugaron luego sobre portaobjetos y se fijaron y tiñeron con soluciones Diff Quick (POCD) según las recomendaciones del fabricante. Se contaron un mínimo de 200 células totales por portaobjetos y se determinó el número de neutrófilos, linfocitos y macrófagos.

Extracción de ARN y qRT-PCR

El lóbulo pulmonar apical de cada ratón se recogió en RNA-later (Ambion). Para el procesamiento, los lóbulos pulmonares se transfirieron a tampón RLT (Qiagen)/2ME para la disociación tisular mediante TissueLyser II (Qiagen) a 25 Hz, dos veces durante 2 minutos (con rotación de la muestra). Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación y el ARN se extrajo manualmente usando un kit miRNeasy (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado de los proveedores para extraer el ARN total, incluyendo miARN de células y tejidos animales y humanos. Después de la extracción, la concentración de ARN se determinó usando espectrofotometría (Nanodrop) y se usaron 200 ng de ARN para la transcripción inversa con cebadores aleatorios e inhibidor de RNasa (AB, Applied Biosystems). A continuación, el ADNc se usó posteriormente para los análisis de qPCR en un QuantStudio 6 usando química TaqMan, FAM-TAMRA (Life Technologies) con mezcla maestra que contenía ROX (Qiagen), cebadores y sondas indicados en la tabla 1. Los valores de Ct para los genes de interés se dieron con referencia a siete patrones de concentración conocida, partiendo de 10⁷ copias y procediendo en series de dilución 1:10. La cantidad de copias para todos los genes de interés se normalizaron respecto al gen de referencia 18s.

Cuantificación de citocinas por ELISA

Se analizó después en el fluido del BAL la producción de KC/IL-8 (CXCL1) y TNF-α mediante ELISA DuoSet (R&D Systems) según las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Secuencias de cebador y sonda para qPCR

Gen	Secuencia (5'-3')		
	Directa	Inversa	Sonda
18s	CGCCGCTAGAGGT GAAATTCT	CATTCTTGGCAAATGCTT TCG	FAM- ACCGGCGCAAGACGGAC CAGA-TAMRA

Gen	Secuencia (5'-3')		
	Directa	Inversa	Sonda
Rinovirus	GTGAAGAGCCsCrT GTGCT	GCTsCAGGGTTAAGGTT AGCC	FAM- TGAGTCCTCCGGCCCCCT GAATG-TAMRA

Los análisis de qPCR se realizaron usando química TaqMan en un volumen total de 12.5 ul por reacción con relaciones óptimas de cebadores directos/inversos adaptados en el ADNc generado a partir del ARN extraído del lóbulo pulmonar apical de cada ratón.

5 Protocolo del estudio

Restablecimiento de la inmunidad antivírica después del tratamiento con propionato de fluticsona (FP) con corticosteroides (CS). Se administró de forma profiláctica a los ratones el candidato principal usando los protocolos de administración óptimos previamente determinados. Los ratones se trataron con FP (PBS para los controles) 1 hora antes de la infección con RV1B (o infección simulada con PBS). Se evaluaron la inmunidad antivírica innata (proteína IFN tipo I/III en el BAL) y la carga vírica del tejido pulmonar (ARN viral, qPCR) 24 h después de la infección.

Resultados

Restablecimiento de la inmunidad antivírica después del tratamiento con CS (propionato de fluticsona FP). Se administró de forma profiláctica a los ratones 2 pmol de INNA-006 al tracto respiratorio total siete días antes de la infección, o (por separado). Se vigiló la pérdida de peso diariamente después del primer tratamiento. Los ratones se trataron después con FP (PBS para los controles) 1 hora antes de la infección con RV1B (o infección simulada con PBS). La carga viral de tejido pulmonar (ARN viral, qPCR) se evaluó 48 h después de la infección y la inflamación pulmonar se determinó mediante tinción diferencial de células inflamatorias del BAL y medición de mediadores inmunitarios proteicos en el fluido BAL.

Los ratones se trataron por vía i.n. con 2 pmol de INNA-006 y día-7 o combinados día-7 y día-1 antes de la administración i.n. de FP e infección i.n. con RV (todo en las vías respiratorias totales. Los controles que no recibieron agonistas de TLR se trataron con solución salina. La pérdida de peso se evaluó como % de cambio desde el día del primer tratamiento (día -7). No se observó ninguna pérdida de peso significativa tras el tratamiento con INNA-006 o FP en comparación con los controles relevantes (datos no mostrados).

El análisis de células inflamatorias indicaba que el tratamiento con INNA-006 D-7 dio como resultado un aumento de macrófagos y linfocitos cuando se administraba junto con FP. El tratamiento combinado con INNA-006 D-7 y D-1 aumentó los macrófagos y los linfocitos en el BAL. También se observó un aumento de macrófagos con INNA-006 D-7 y D-1 combinados en ratones tratados con FP. Sorprendentemente, el tratamiento con INNA-006 mejoró completamente la respuesta inflamatoria neutrófila inducida por RV y resistente a esteroides en ratones infectados con RV (Figura 16).

El mediador inflamatorio CXCL1 en el BAL se midió por ELISA (Figura 17). La inflamación neutrófila inducida por RV resistente a esteroides se correspondía con un aumento de la producción de proteína CXCL1 (KC, IL-8 de ratón). INNA-006 suprimía la producción de CXCL1 y evitaba respuestas inflamatorias resistentes a esteroides.

La carga viral pulmonar se evaluó por qPCR. El tratamiento con FP aumentó la carga pulmonar viral en ratones de control con solución salina solamente. INNA-006 redujo la carga pulmonar de virus en todos los grupos, pero el tratamiento repetido con INNA-006 antes del FP en realidad potenció la eficacia antivírica (Figura 18).

La característica más llamativa de los datos del BAL de este estudio fue la supresión completa de la inflamación neutrófila resistente a esteroides inducida por RV por INNA-006 en todos los protocolos de tratamiento. La inflamación neutrófila suprimida se correspondía con niveles drásticamente reducidos de quimiocina de neutrófilos CXCL1 de ratón (KC).

El tratamiento repetido con 2 pmol de INNA-006 (día -7 y día -1) aumentó el número total de leucocitos, correspondiente al reclutamiento de macrófagos y linfocitos. También se observó un aumento del reclutamiento de macrófagos en ratones tratados con FP con el protocolo de administración de INNA-006, así como en ratones tratados con FP. El número de linfocitos aumentó en los grupos D-7 INNA-006 FP RV y D-1 y d-1 INNA-006 Veh RV, mediante un mecanismo desconocido. Una dosis única con 2 pmol de INNA-006 siete días antes de la infección dio como resultado una producción significativa de TNF- α en el BAL, pero esto no se observó cuando se administraron dosis repetidas de INNA-006 (D-7 y D-1). El tratamiento con FP también redujo la producción de TNF- α estimulada por INNA-006.

De acuerdo con la reducción de neutrófilos, el tratamiento con agonista era altamente eficaz en la supresión de la expresión de CXCL1. La replicación viral promueve la activación inmunitaria innata y la expresión de CXCL1, por lo que estos datos respaldan que la replicación del virus y la inflamación inducida por infección se suprimen con el

tratamiento con agonista de TLR-2. El análisis del ARN viral confirmó esto con el tratamiento con INNA-006 que induce una reducción significativa en la carga viral con ambos protocolos de tratamiento. La mejor supresión del ARN pulmonar viral se observó realmente en ratones con tratamiento repetido con INNA-006 junto con FP.

- 5 En conclusión, estos estudios demuestran que la actividad antivírica contra la infección por RV con agonistas de TLR se mantiene e incluso se potencia con el tratamiento con FP.

Ejemplo 5 - Activación de TLR2 por diversos compuestos

- Se determinó la comparación de las capacidades de diversos compuestos para estimular la actividad de luciferasa en un sistema indicador basado en células NF- κ B. Los compuestos ensayados incluyen INNA-006 (o compuesto (1)); INNA-013 (o compuesto (4)); INNA-014 (o compuesto (3)); INNA-015 (o compuesto (2)); INNA-010; INNA-011 (o compuesto (5)); INNA-012 (o compuesto (6)); e INNA-009. Las células HEK293T, cotransfectadas transitoriamente con un plásmido de TLR2 humano y un sistema indicador de plásmido de luciferasa-NF- κ B, se expusieron a diversas diluciones de cada compuesto. La unión exitosa al receptor y los sucesos de transducción de señales posteriores se determinaron midiendo la luminiscencia debida a la actividad de luciferasa (los resultados se muestran en la Fig. 19 - columnas de izquierda a derecha para cada concentración están en el siguiente orden INNA-006 (o compuesto (1)); INNA-013 (o compuesto (4)); INNA-014 (o compuesto (3)); INNA-015 (o compuesto (2)); INNA-010; INNA-011 (o compuesto (5)); INNA-012 (o compuesto (6)); e INNA-009.

- Los resultados demuestran que los compuestos más potentes eran aquellos con una única serina, treonina u homoserina que separaba el Pam2Cys y el PEG, o una longitud de 12, 28, o dos grupos de 28, monómeros de óxido de etileno. Sin embargo, todos los compuestos dieron como resultado una unión exitosa al receptor y la posterior transducción de señales.

Ejemplo 6 - Comparación de INNA-006 y Pam3Cys-Ser-PEG3000 usando un ensayo de luciferasa *in vitro*

Comparación de la actividad agonista de TLR2 *in vitro* de Pam3Cys-Ser-PEG3000 e INNA-006: Células HEK293T, cotransfectadas transitoriamente con un plásmido de TLR2 humano y un sistema indicador de plásmido de luciferasa-NF- κ B, se expusieron a diversas diluciones de INNA-006 o Pam3Cys-Ser-PEG3000.

- 25 La unión exitosa al receptor y los sucesos de transducción de señales posteriores se determinaron midiendo la luminiscencia debida a la actividad de luciferasa (Fig. 20). Los resultados demuestran que Pam3Cys-Ser-PEG3000 es inferior a INNA-006 en su capacidad para señalizar NF- κ B en el intervalo de dosis ensayado (12.2 pM a 3.125 pM).

Ejemplo 7 - Unión y especificidad de TLR

- 30 Se evaluó la capacidad de INNA-006 para activar una variedad de otros receptores de reconocimiento de patrones de TLR. Estas evaluaciones se llevaron a cabo usando paneles de TLR tanto humanos como de ratón. Estos ensayos detectan un indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) bajo el control de un promotor que es inducible por activación de NF- κ B en células HEK293.

- El indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) está bajo el control de un promotor inducible por el factor de transcripción NF- κ B. Este gen indicador permite el control de la señalización a través del TLR, basándose en la activación de NF- κ B. En una placa de 96 pocillos (volumen total de 200 μ l) que contiene las células apropiadas (50.000-75.000 células/pocillo), se añaden a los pocillos 20 μ l del artículo de ensayo o el ligando de control positivo. El medio añadido a los pocillos se diseña para la detección de la expresión de SEAP inducida por NF- κ B. Después de una incubación de 16-24 h, la densidad óptica (DO) se lee a 650 nm en un detector de absorbancia Molecular Devices SpectraMax 340PC.

- 40 Ligandos de control

hTLR2: HKLM (*Listeria monocytogenes* inactivada por calor) a 1×10^8 células/ml

hTLR3: Poli(I:C) HMW a 1 μ g/ml

hTLR4: LPS de *E. coli* K12 a 100 ng/ml

hTLR5: flagelina de *S. typhimurium* a 100 ng/ml

- 45 hTLR7: CL307 a 1 μ g/ml

hTLR8: CL075 a 1 μ g/ml

hTLR9: CpG ODN2006 a 1 μ g/ml.

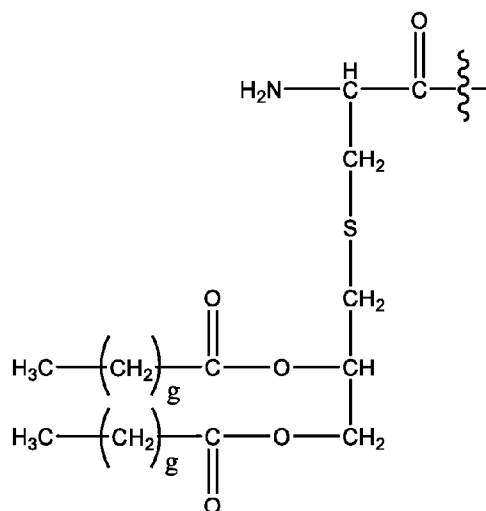
En las condiciones ensayadas, se confirmó que INNA-006 era capaz de activar su diana propuesta (TLR-2) y no mostró activación de ningún otro TLR ensayado en estos ensayos (Fig. 21).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende un agonista de TLR2 para usar en el tratamiento o prevención de una afección respiratoria asociada con rinovirus en un sujeto, en donde el agonista de TLR2 comprende un lipopéptido o un resto lipídico, en donde el resto lipídico se selecciona de palmitoilo, miristoilo y estearoilo, y en donde el agonista de TLR2 está unido a un resto solubilizante, en donde el resto solubilizante comprende un polietilenglicol (PEG).
2. Un compuesto que comprende un agonista de TLR2 para usar en el tratamiento o prevención de una exacerbación mediada por virus de una afección respiratoria en un sujeto, en donde la exacerbación mediada por virus es una exacerbación mediada por rinovirus, en donde el agonista de TLR2 comprende un lipopéptido o un resto lipídico, en donde el resto lipídico se selecciona de palmitoilo, miristoilo y estearoilo, y en donde el agonista de TLR2 está unido a un resto solubilizante, en donde el resto solubilizante comprende un polietilenglicol (PEG).
3. Un compuesto de la reivindicación 1 o 2, en donde la afección respiratoria es asma.
4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto se administra en una composición que comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde la afección respiratoria es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, fibrosis quística o afecciones pulmonares asociadas con trasplante de pulmón o uso de glucocorticosteroides crónicos.
6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la afección respiratoria es una infección por rinovirus.
7. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2, en donde el agonista de TLR2 comprende un lipopéptido seleccionado del grupo que consiste en: Pam2Cys, Pam3Cys, Ste2Cys y Oct2Cys, preferiblemente Pam2Cys.
8. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto que comprende un agonista de TLR2 comprende la estructura:

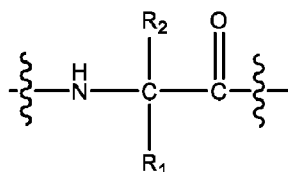
A-Y-B

en donde A comprende o consiste en:

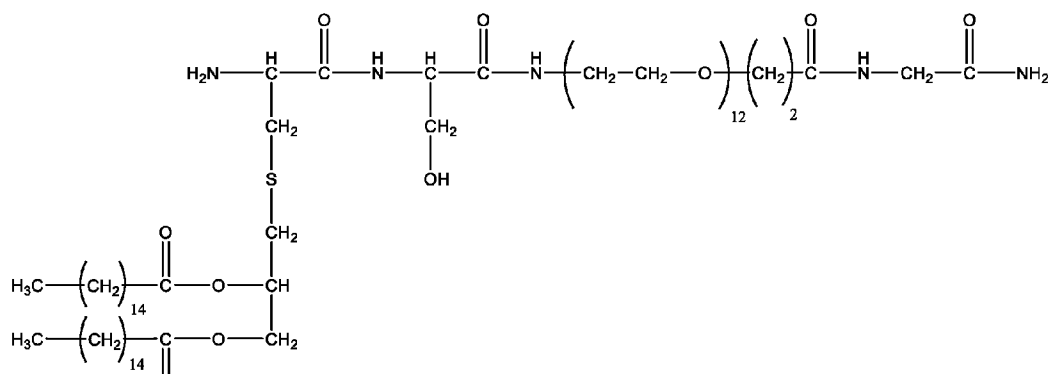


en donde cada g es independientemente 12, 14 o 16;

Y es

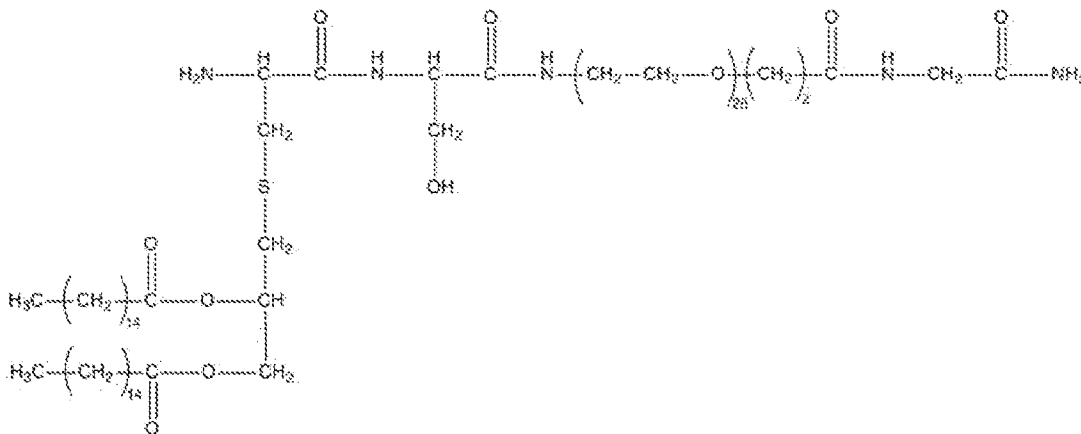


en donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_2 no son ambos H;



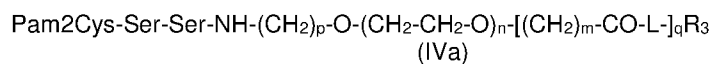
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto tiene la estructura del compuesto (5):



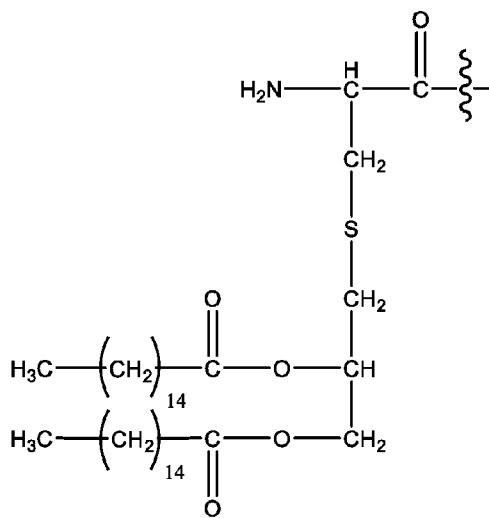
5

13. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto es de fórmula (IVa):



en donde

10 Pam2Cys tiene la estructura:



n es de 3 a 100;

m es 1, 2, 3 o 4;

p es 2, 3 o 4;

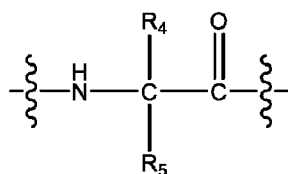
q es nulo o 1;

5 R_1, R_1', R_2 y R_2' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_1' no son ambos H, y R_2 y R_2' no son ambos H;

en donde cuando q es nulo, R_3 es H;

en donde cuando q es 1, R_3 es $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:



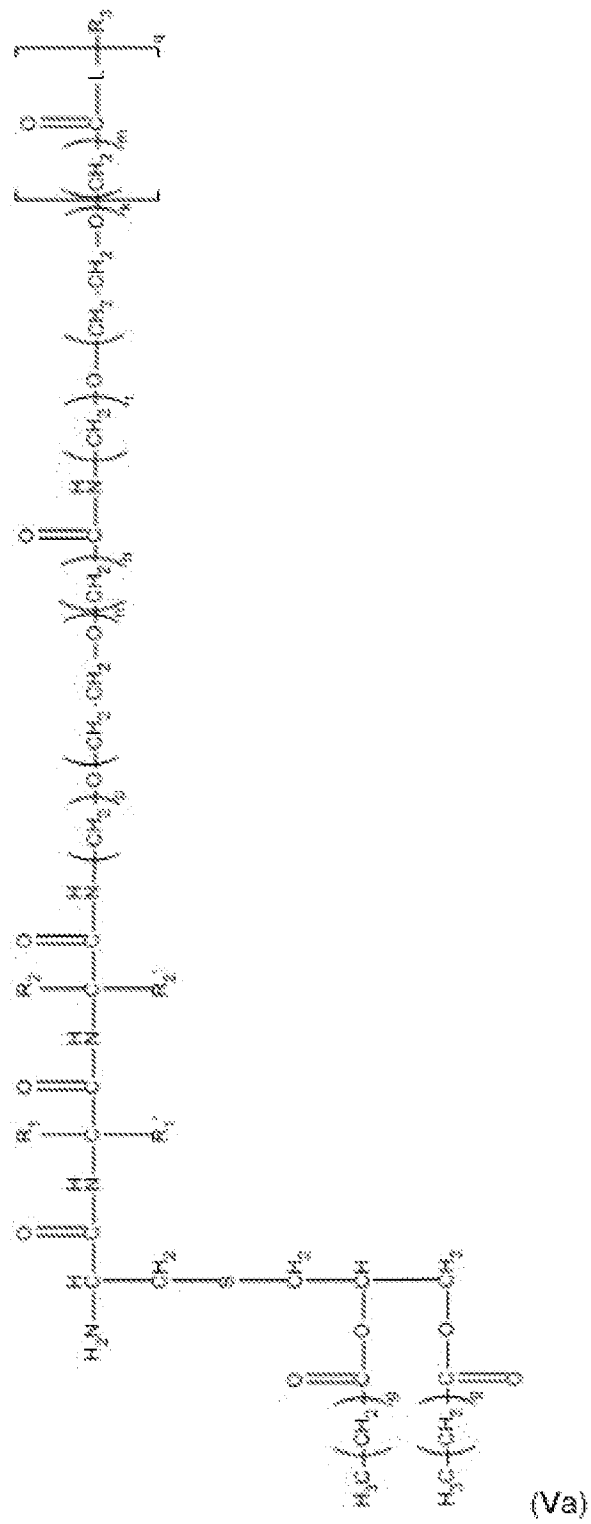
10

en donde R_4 es H; y

R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

14. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto es de fórmula (Va):



en donde

n es de 3 a 100;

k es de 3 a 100;

h es 1, 2, 3 o 4;

m es 1, 2, 3 o 4;

cada g es independientemente 12, 14 o 16;

p es 2, 3 o 4;

t es 2, 3 o 4;

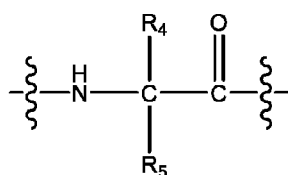
q es nulo o 1;

- 5 R_1 , R_1' , R_2 y R_2' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, en donde uno cualquiera de los hidrógenos de alquilo puede estar sustituido por un halógeno, y en donde R_1 y R_1' no son ambos H, y R_2 y R_2' no son ambos H;

en donde cuando q es nulo, R_3 es H;

en donde cuando q es 1, R_3 es $-\text{NH}_2$ u $-\text{OH}$;

- 10 L es nulo o consiste en 1 a 10 unidades, en donde cada unidad es un alfa aminoácido natural o se deriva de un alfa aminoácido natural, y tiene la fórmula:



en donde R_4 es H; y

R_5 es la cadena lateral, o segundo hidrógeno del aminoácido,

- 15 o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el agonista de TLR2 se administra una vez al día o una vez a la semana.

16. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el uso comprende además administrar un corticosteroide, preferiblemente un glucocorticoide.

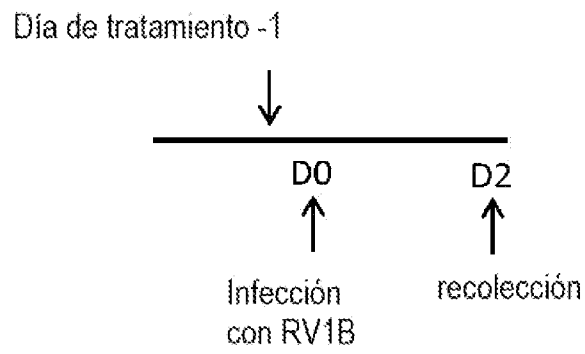
- 20 17. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el compuesto se formula o adapta para la administración a las vías respiratorias.

18. Un compuesto o composición según la reivindicación 17, en donde el compuesto o composición se formula o adapta para la administración por inhalación o intranasal.

- 25 19. Un compuesto o composición según la reivindicación 18, en donde el compuesto o composición se formula como una pulverización nasal o como gotas nasales.

Figura 1

(a)



(b)

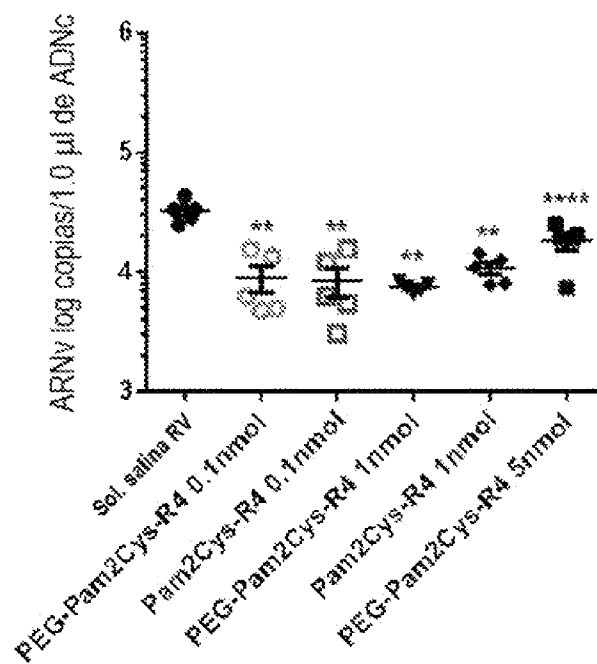
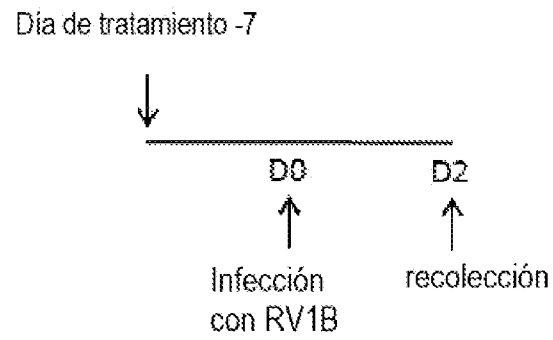


Figura 2

(a)



(b)

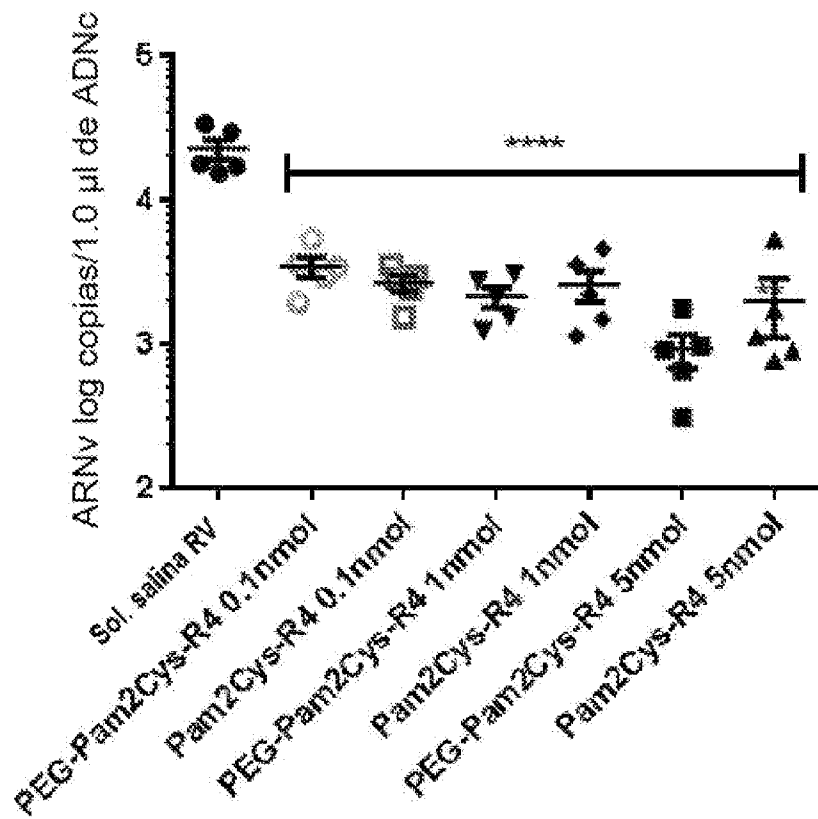
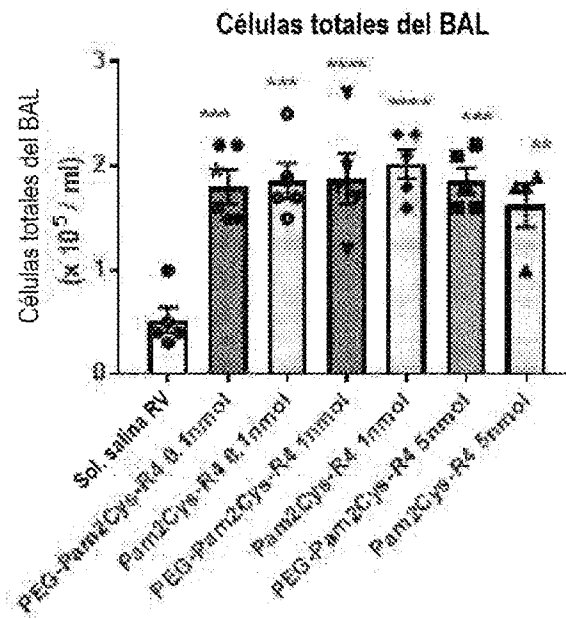


Figura 3

(a)



(b)

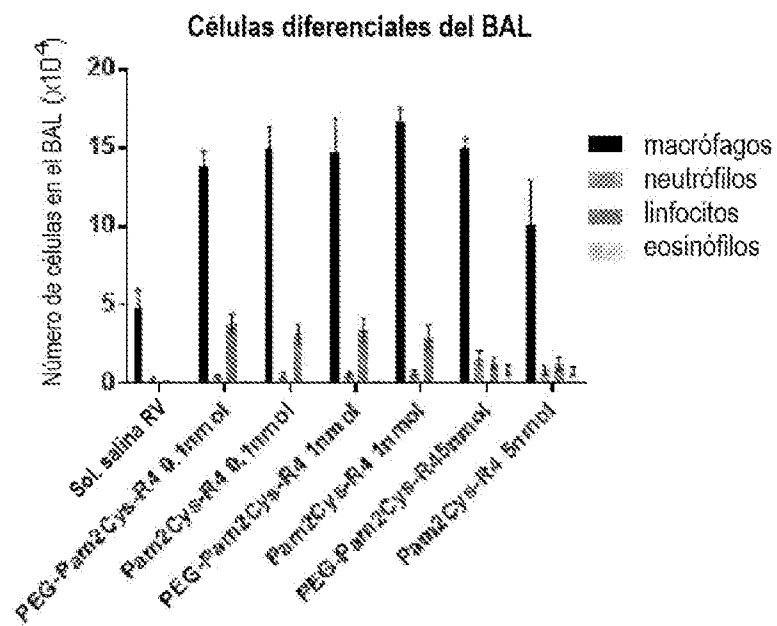
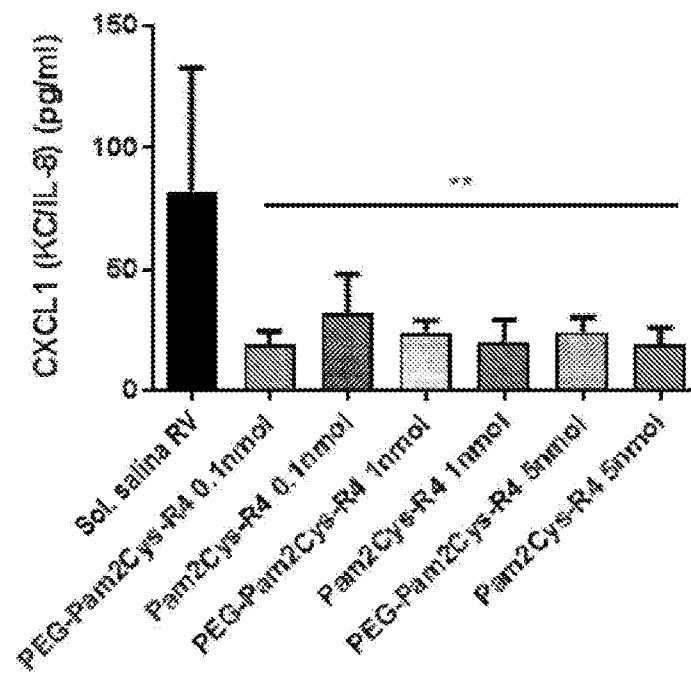


Figura 4

(a)



(b)

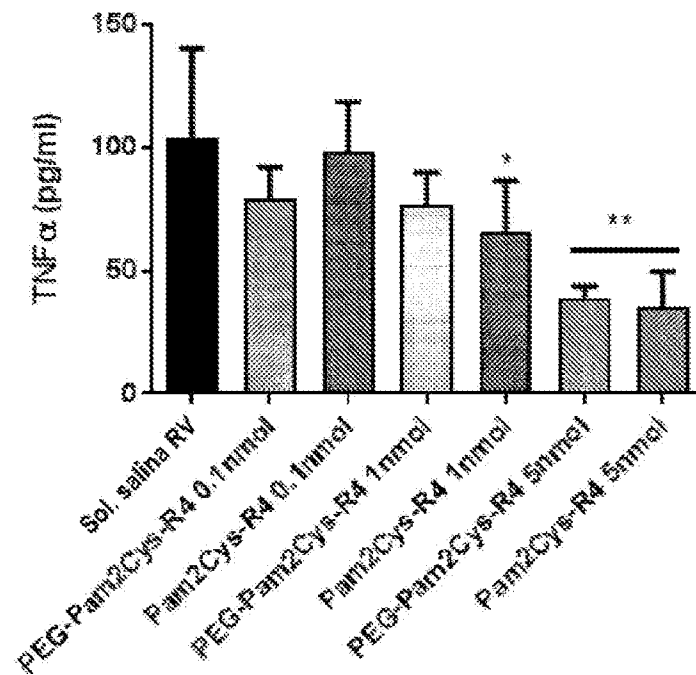
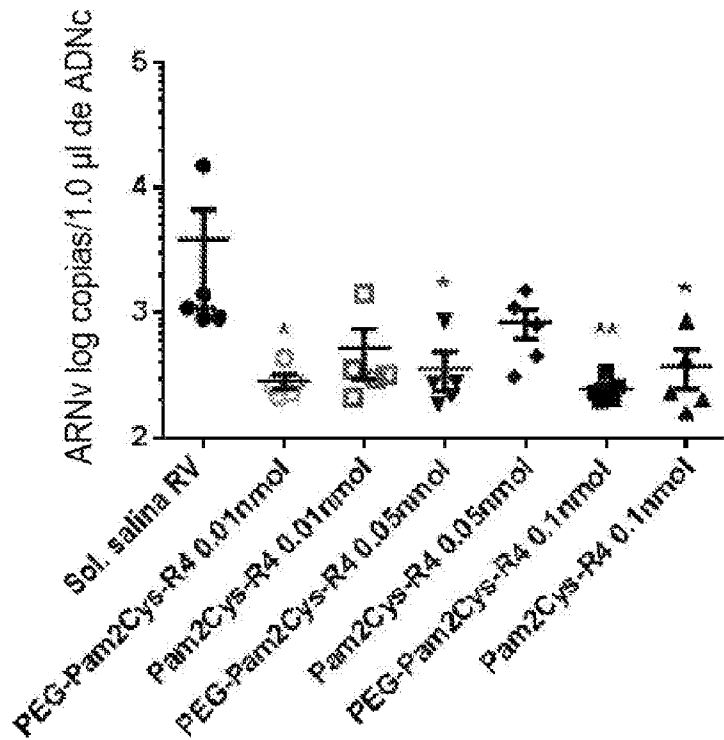


Figura 5

(a)



(b)

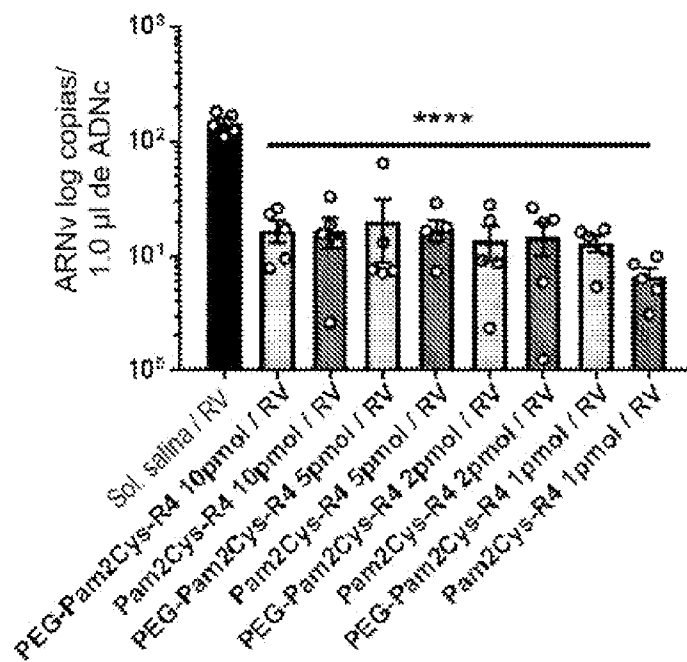
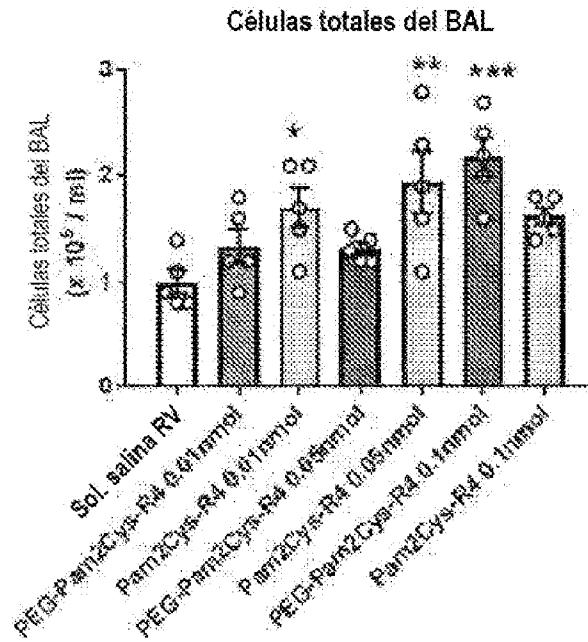


Figura 6

(a)



(b)

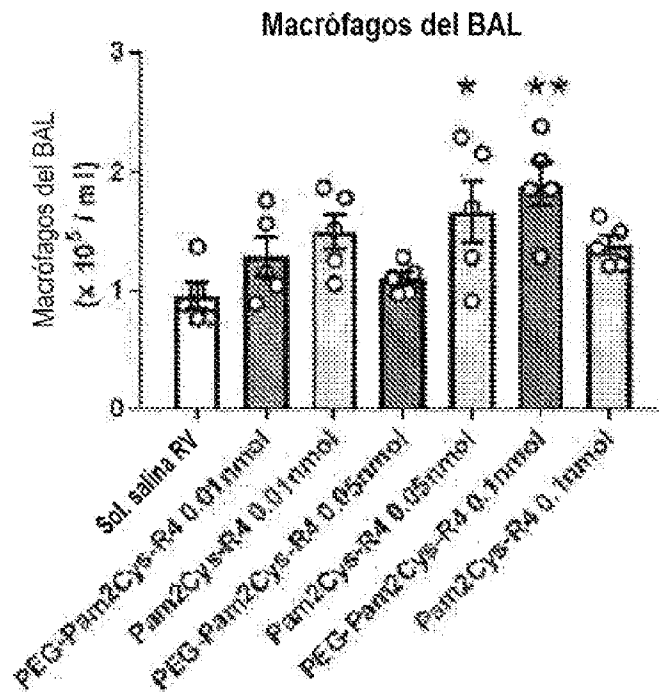
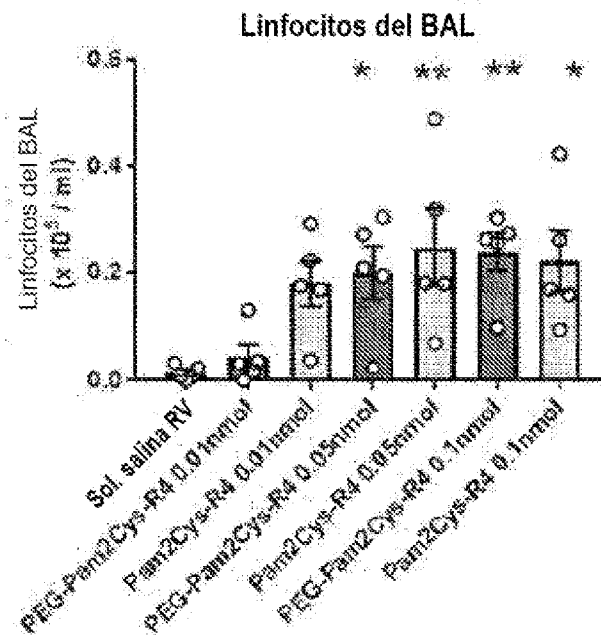


Figura 6 continuación

(c)



(d)

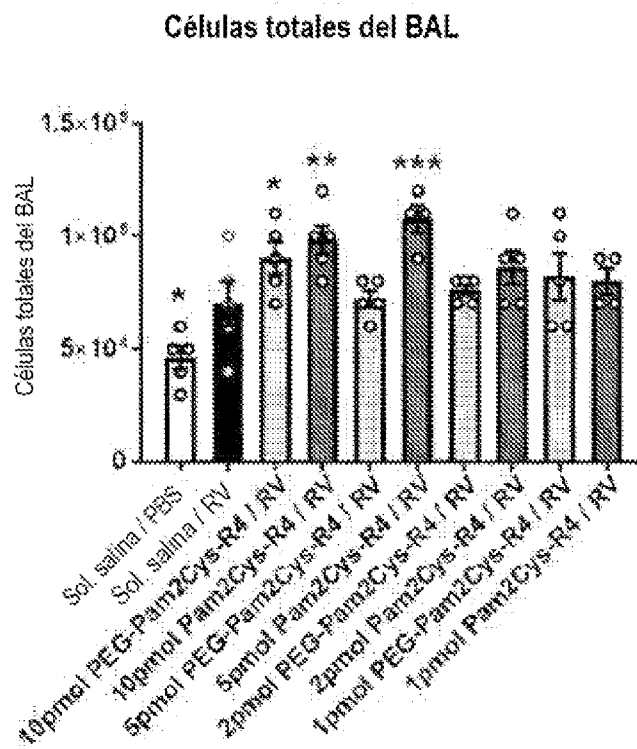
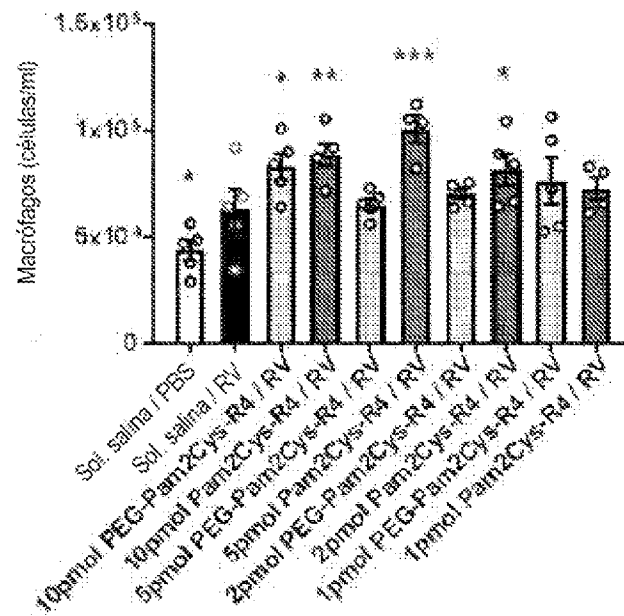


Figura 6 continuación

(e)

Macrófagos del BAL



(f)

Linfocitos del BAL

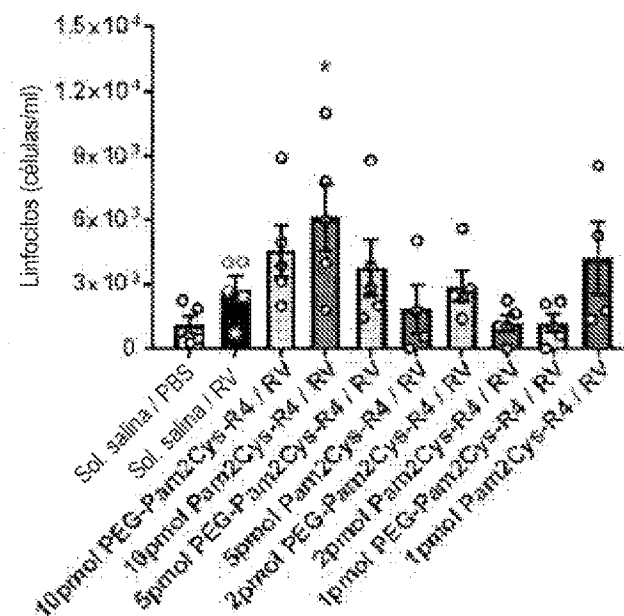
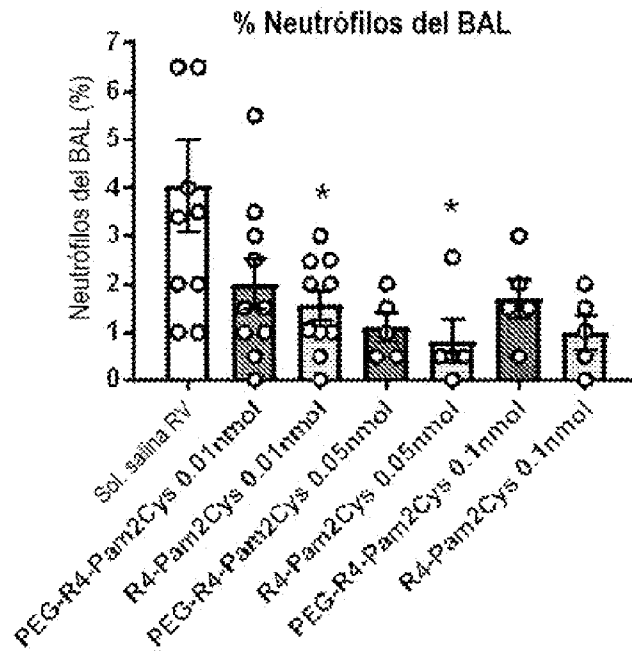


Figura 7

(a)



(b)

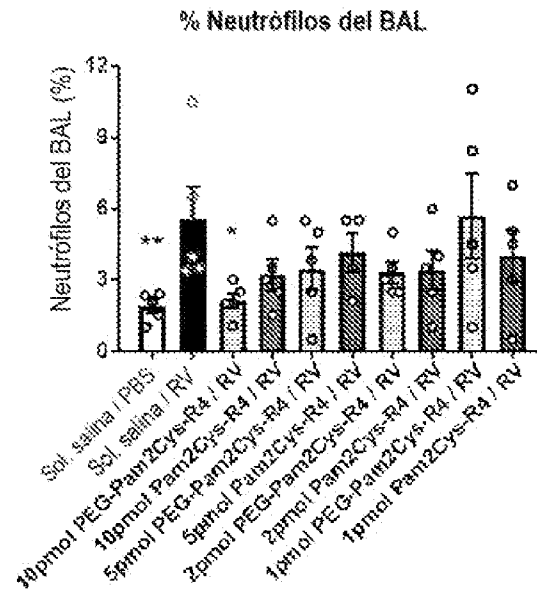


Figura 7 continuación

(c)

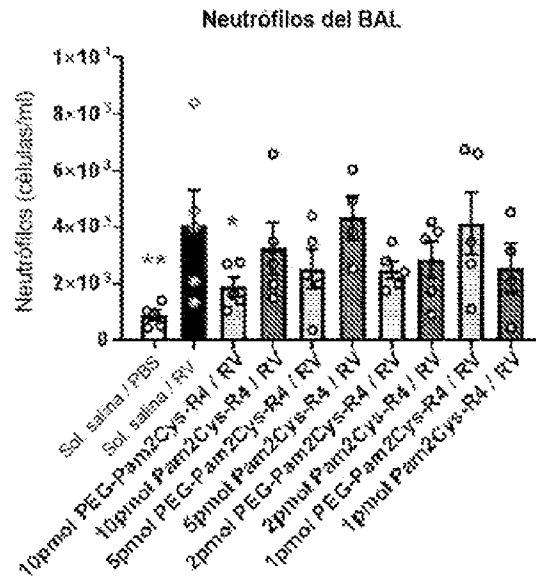
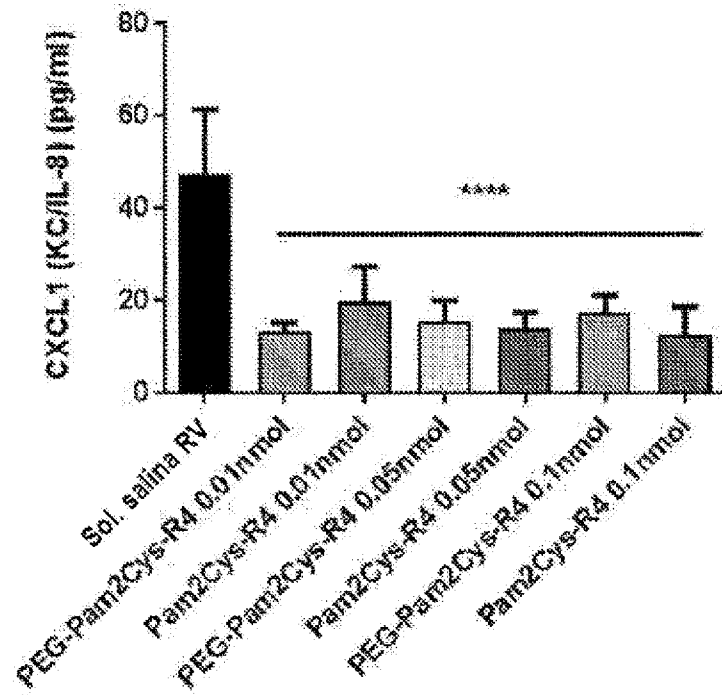


Figura 8

(a)



(b)

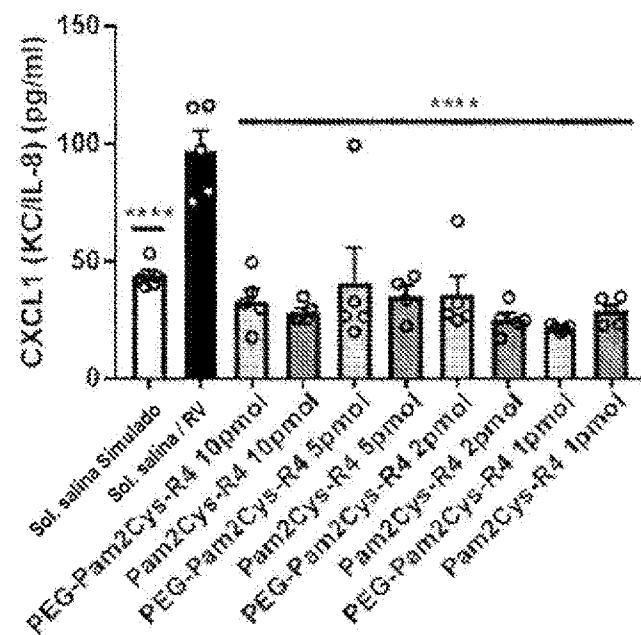
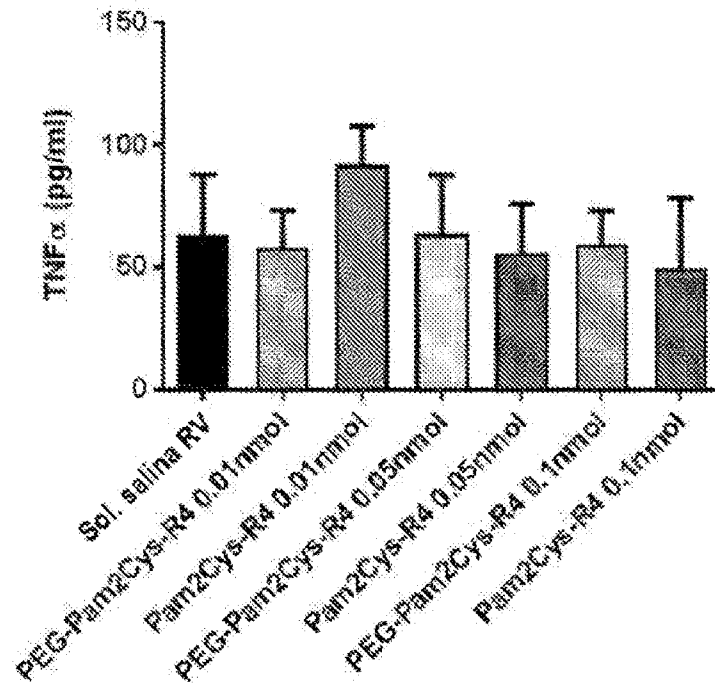


Figura 8 continuación

(c)



(d)

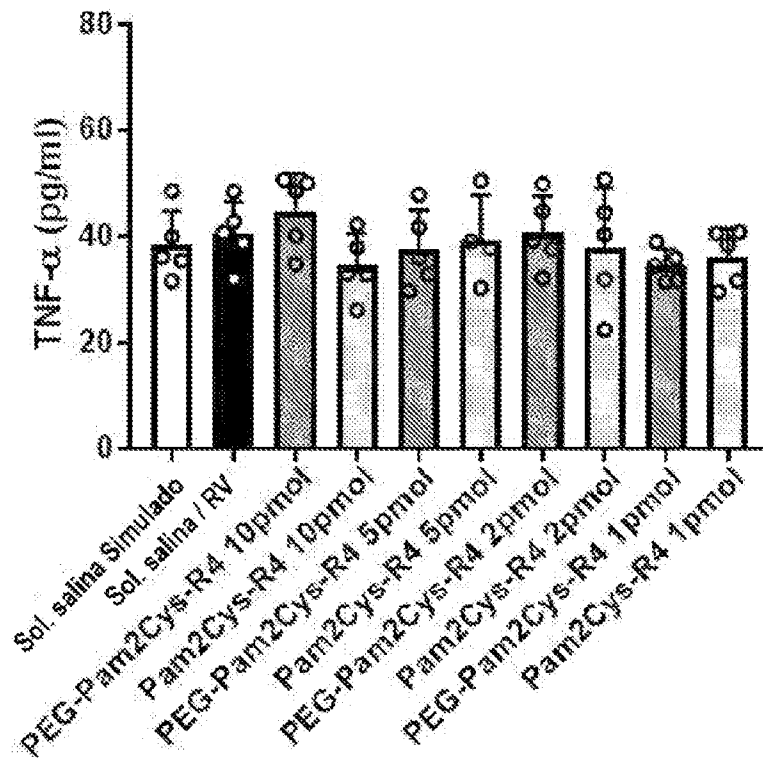
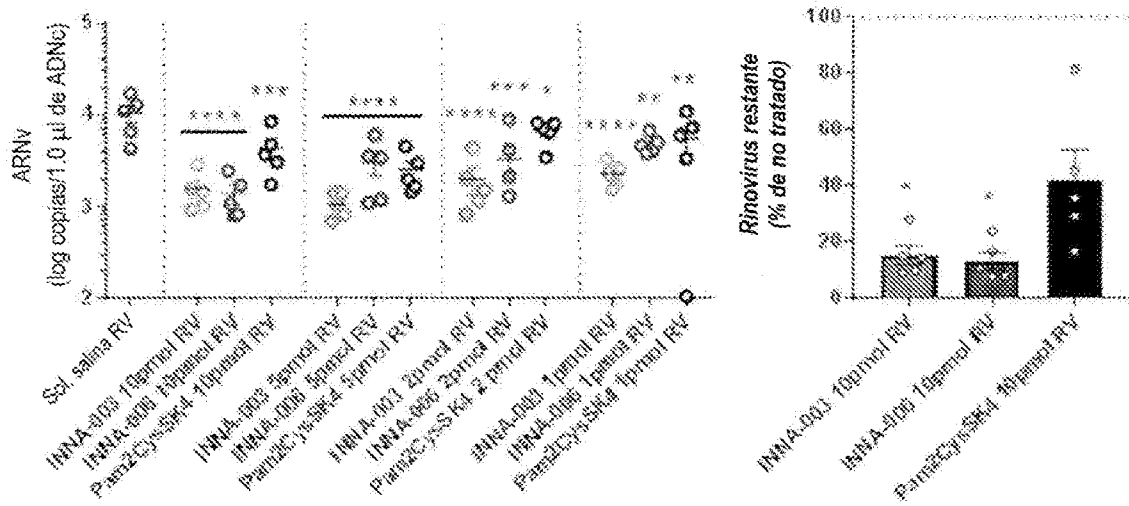


Figura 9

(a) (i)



(iii)

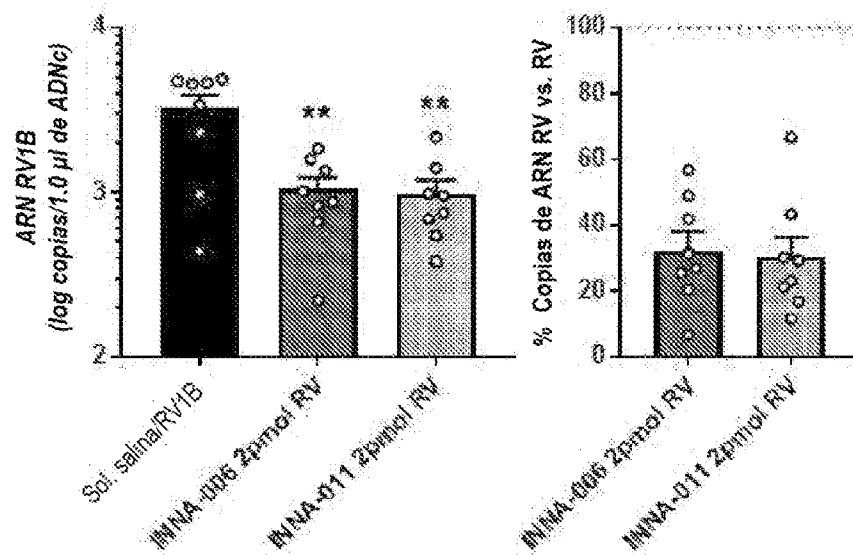
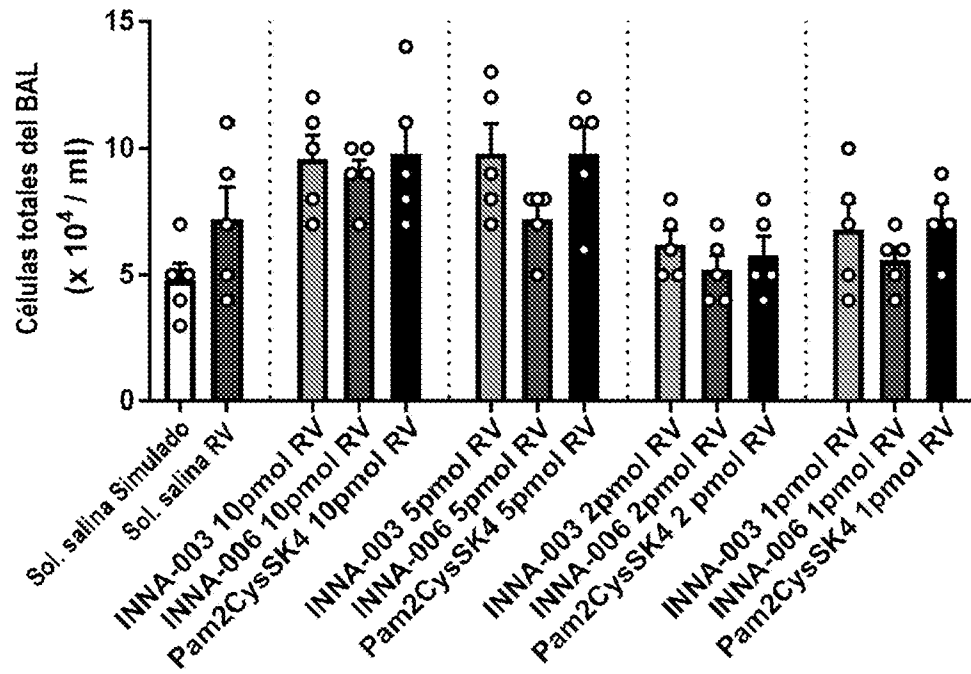


Figura 9 continuación

(b)



(c)

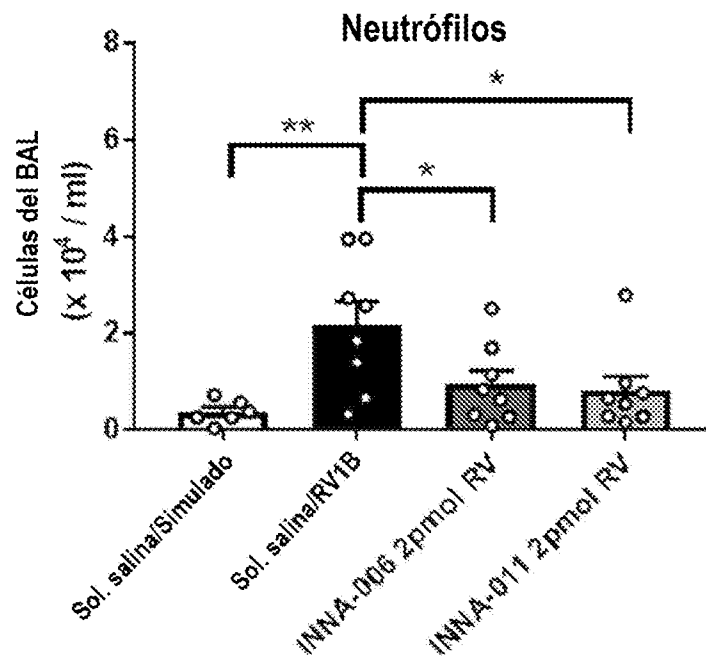


Figura 9 continuación

(d)

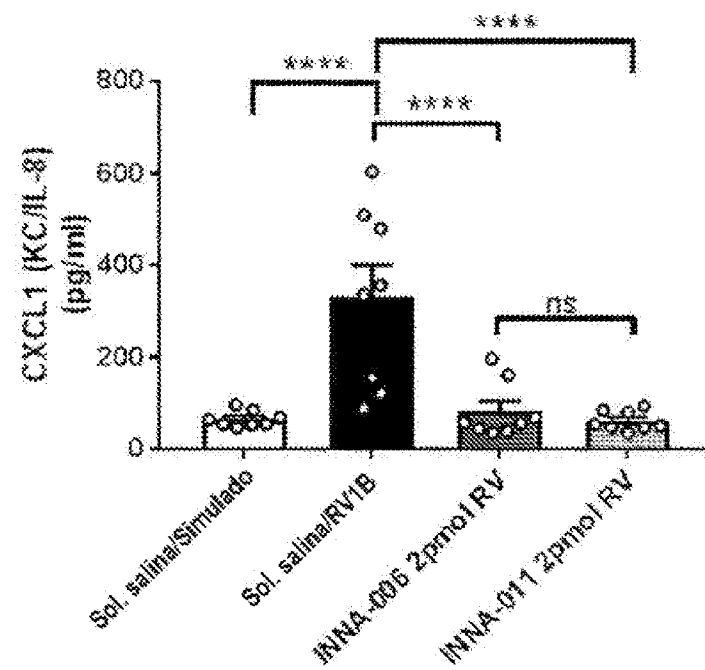
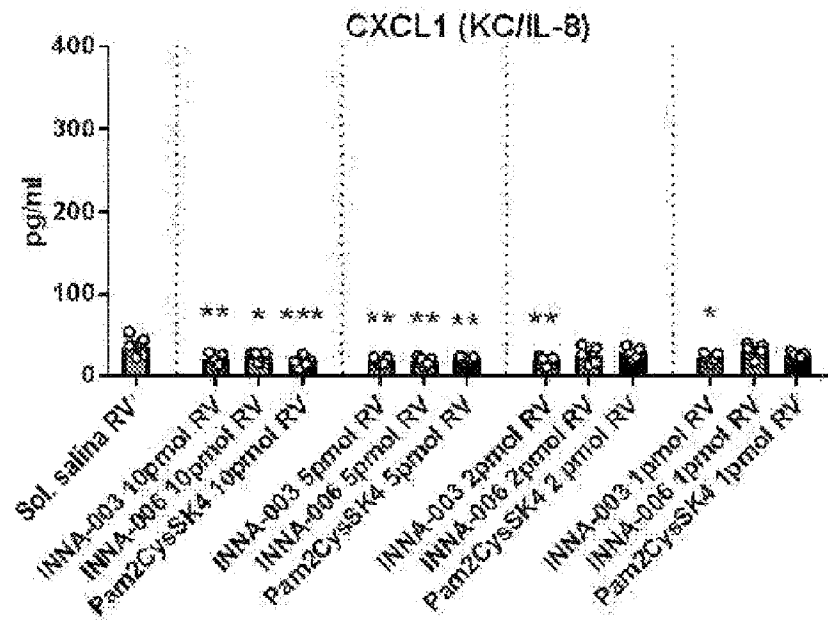


Figura 9 continuación

(e)

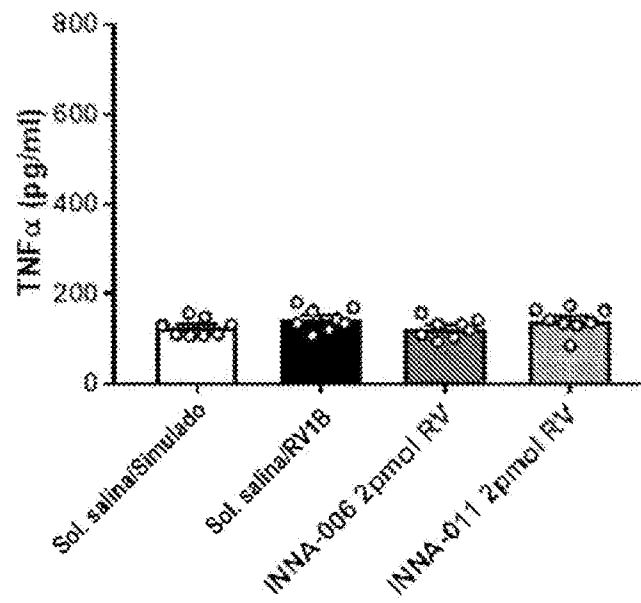
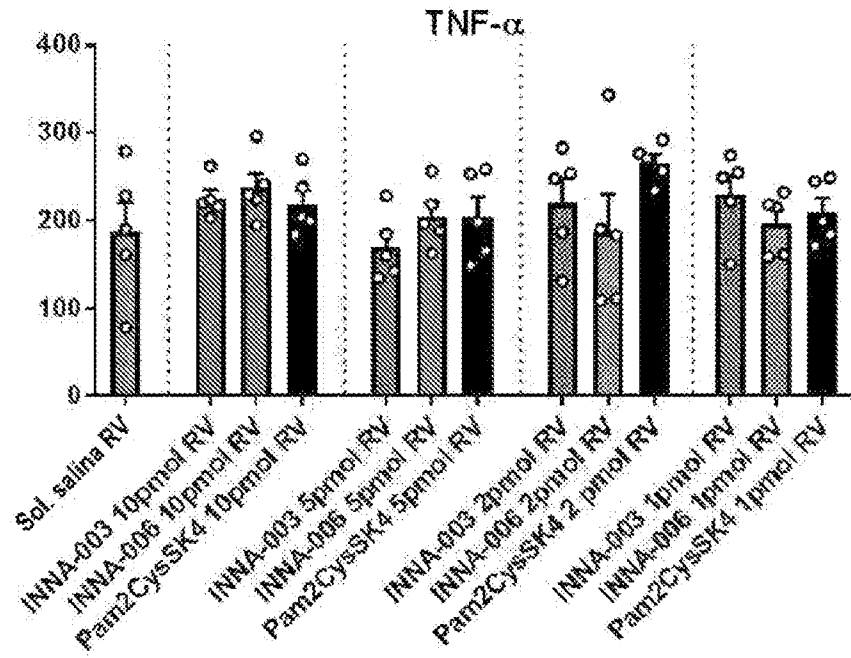
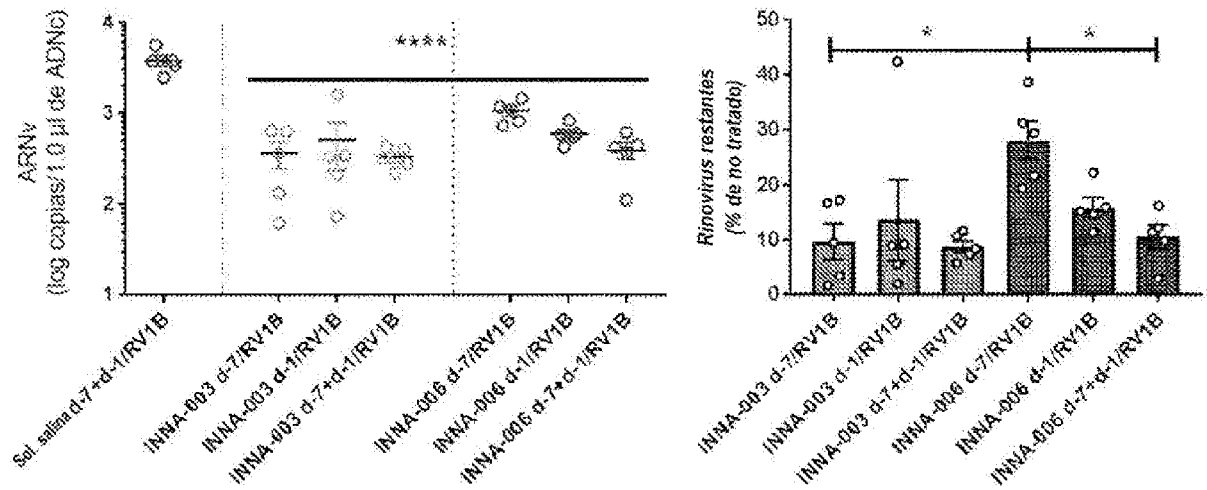


Figura 10

(a)



(b-c)

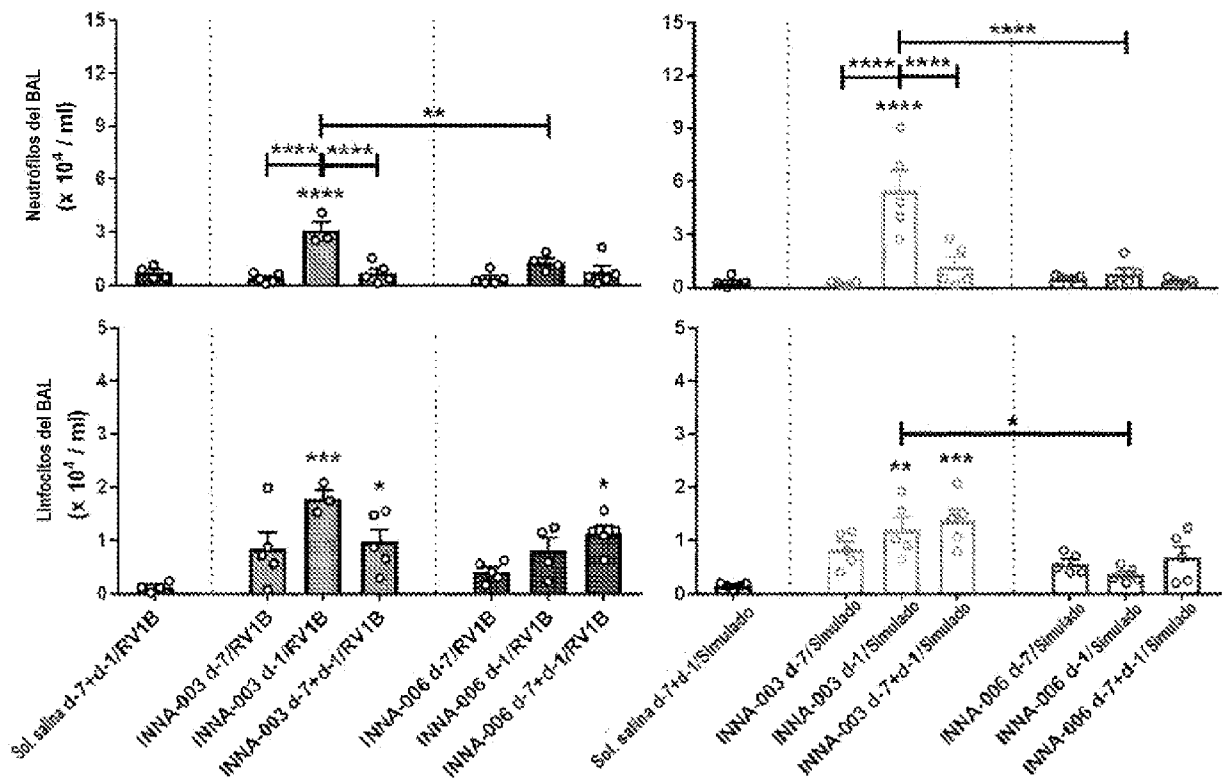


Figura 10 continuación

(d-e)

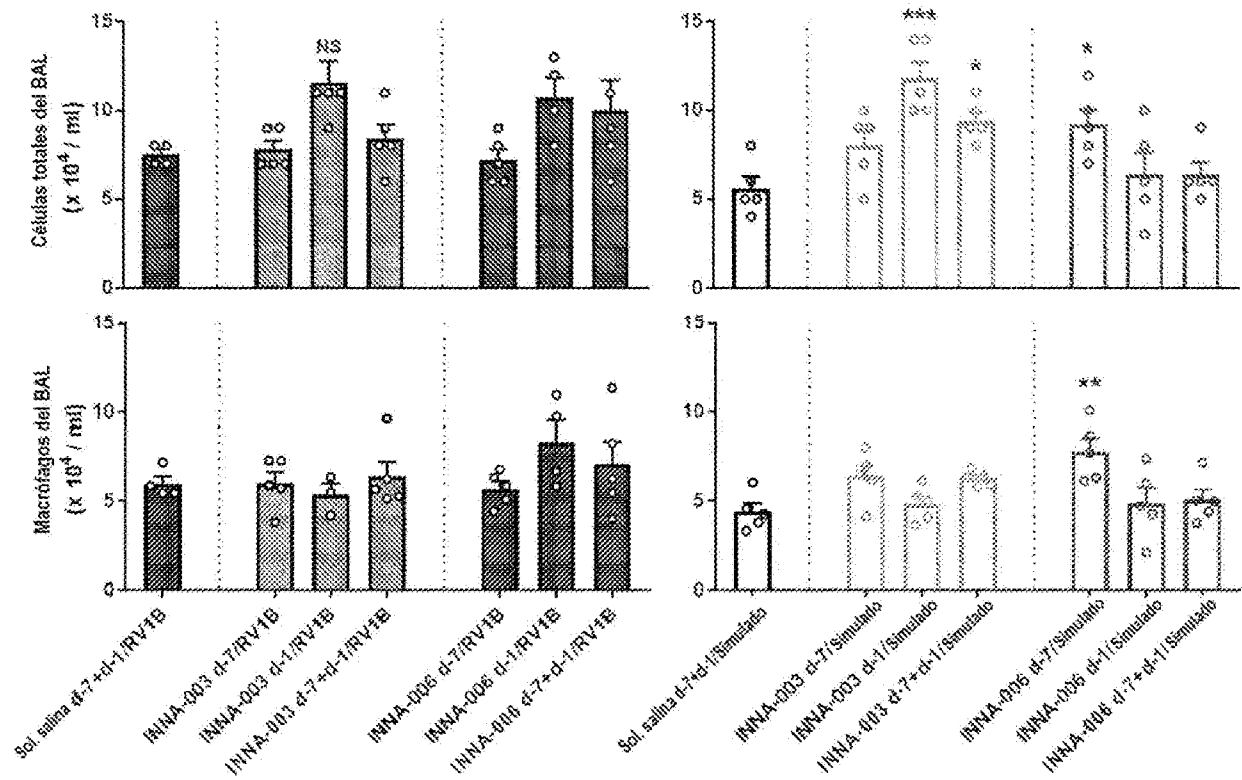


Figura 10 continuación

(f-g)

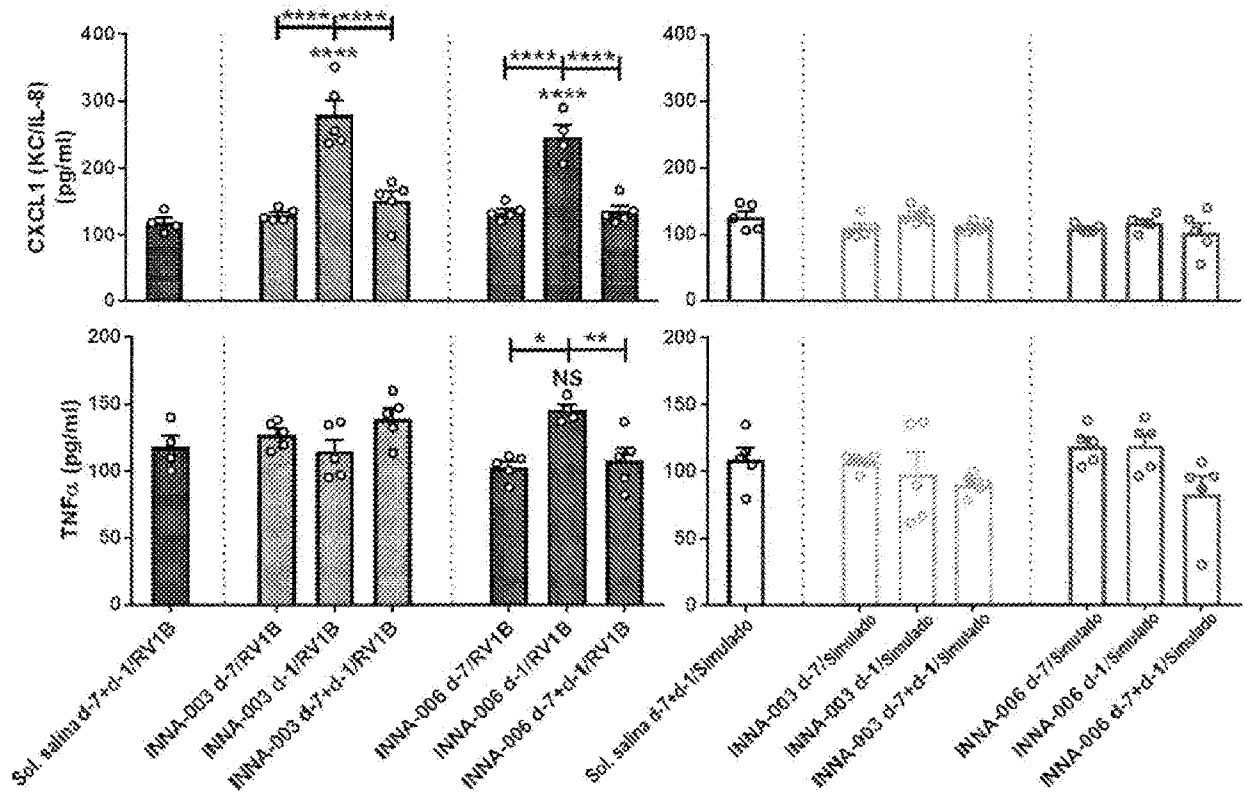
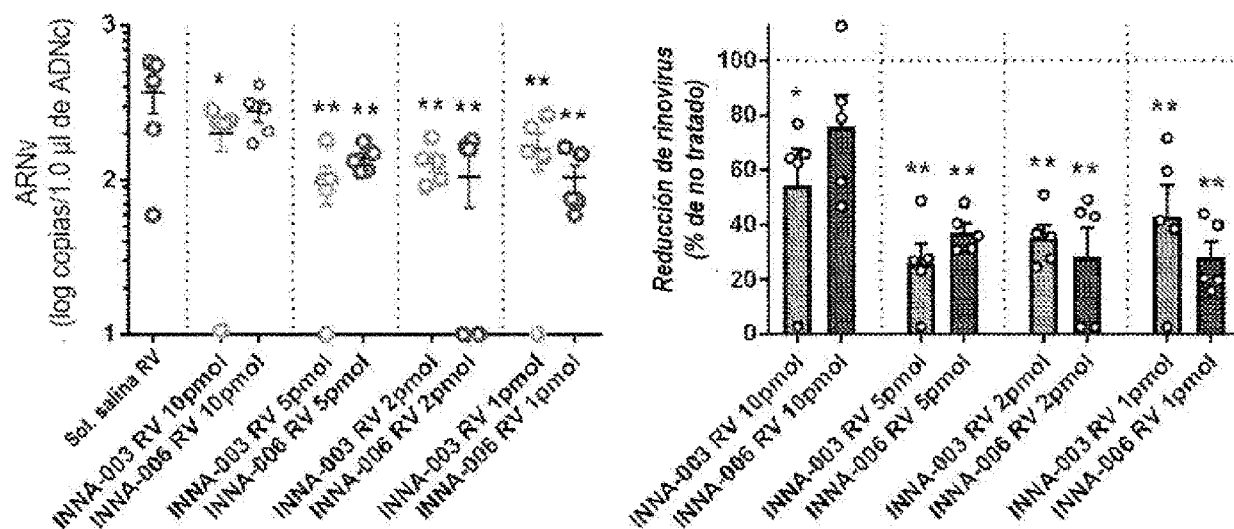


Figura 11

(a)



(b-e)

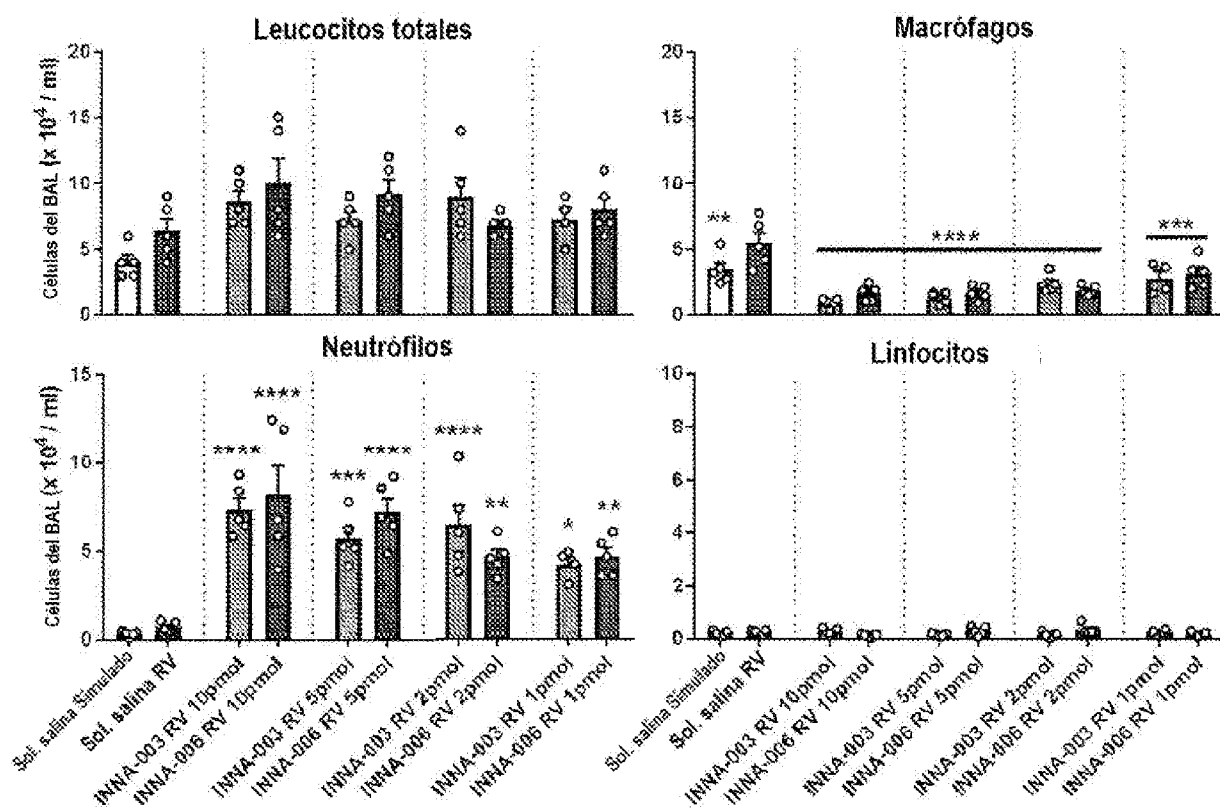


Figura 11 continuación

(f-g)

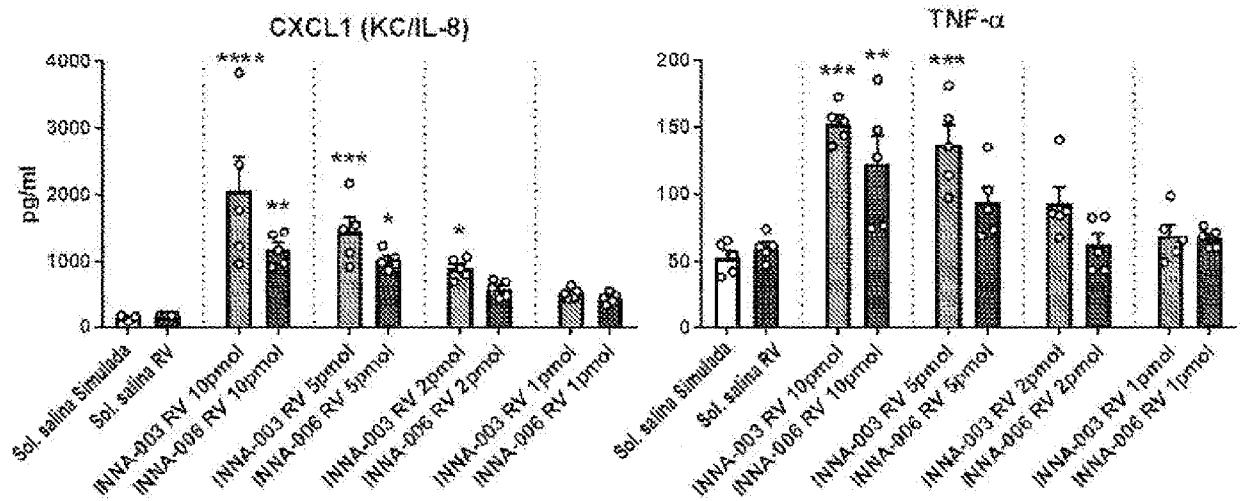


Figura 12

(a)

Estudio N.º	Fecha de nacimiento	Gravedad del asma	Edad de inicio del asma	Neutrófilos	Eosinófilos	Macrófagos	Peso kg	BMI	FEV ₁ porcentaje previsto	FVC porcentaje previsto	FEV ₁ /FVC
AS090	13-Jun-45	Moderada Persistente		41.75	43.5	9.25	n/a	n/a	67	88	70
AS116	23-Ene-89	Leve Persistente	Infancia	8.75	6.25	37	113	36	91	97	81
AS131	16-May-70	Leve Persistente		5	3.75	89.25	n/a	n/a	89	89	80
AS140	18-Nov-52	Moderada Persistente	Infancia	77	3	20	101	36	101	98	n/a
AS153	29-Jul-41	Leve Persistente	Edad adulta	19.25	5	44.5	58	22	85	97	n/a
AS178	10-Jul-44	Leve Persistente	Infancia	11.75	5	27.25	102	34	74	75	73

(b)

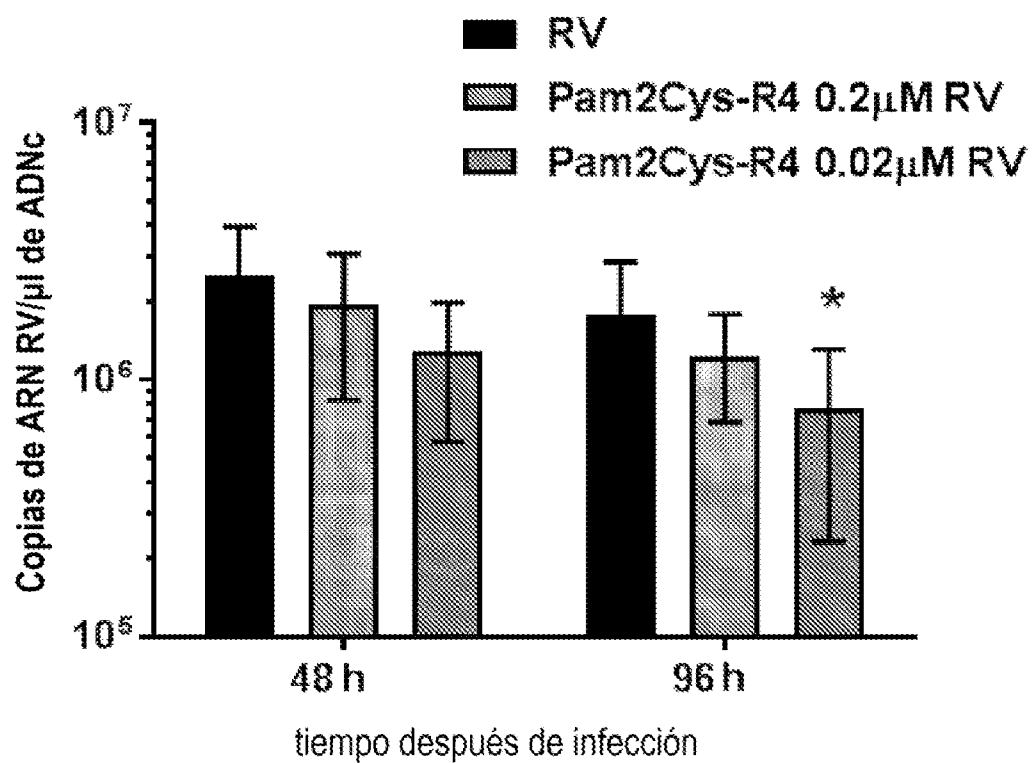


Figura 12 continuación

(c)

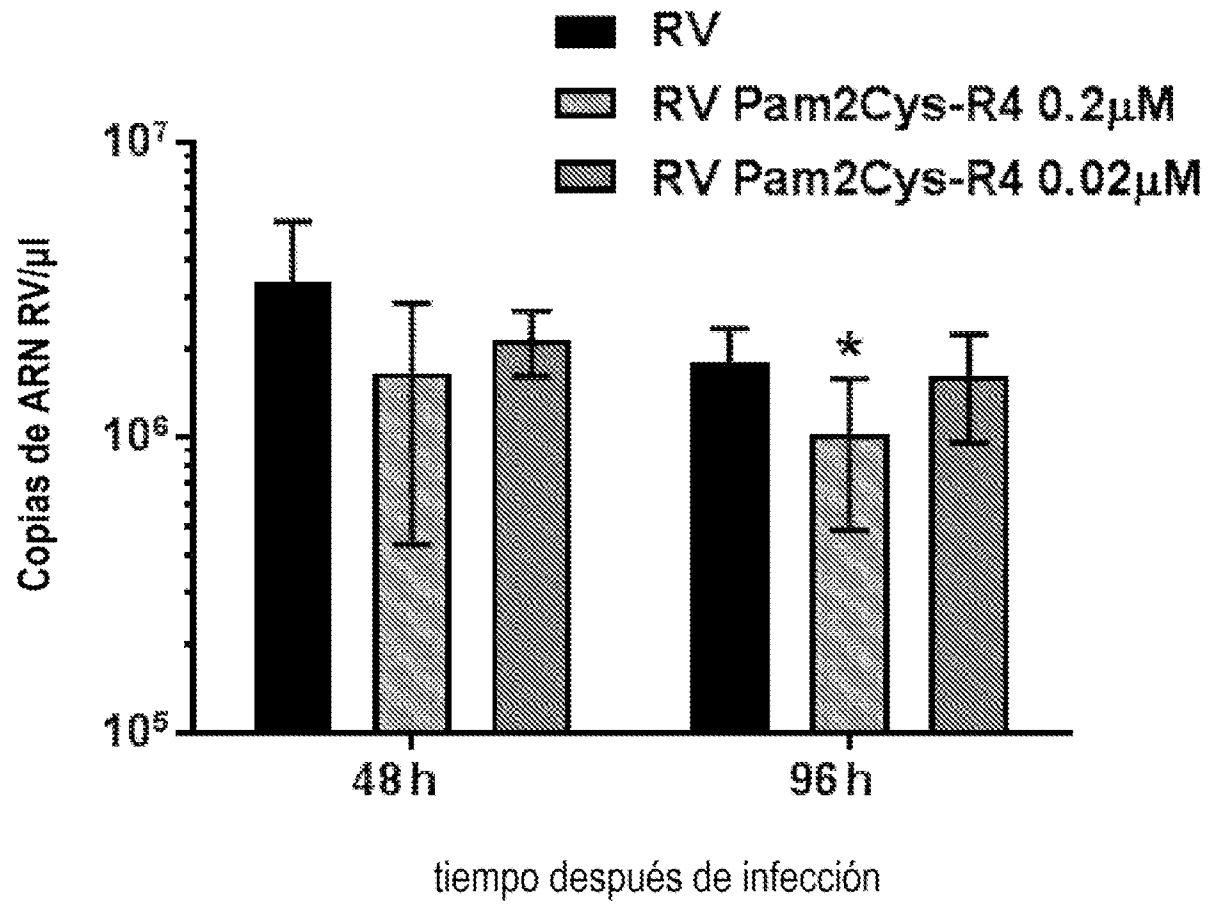
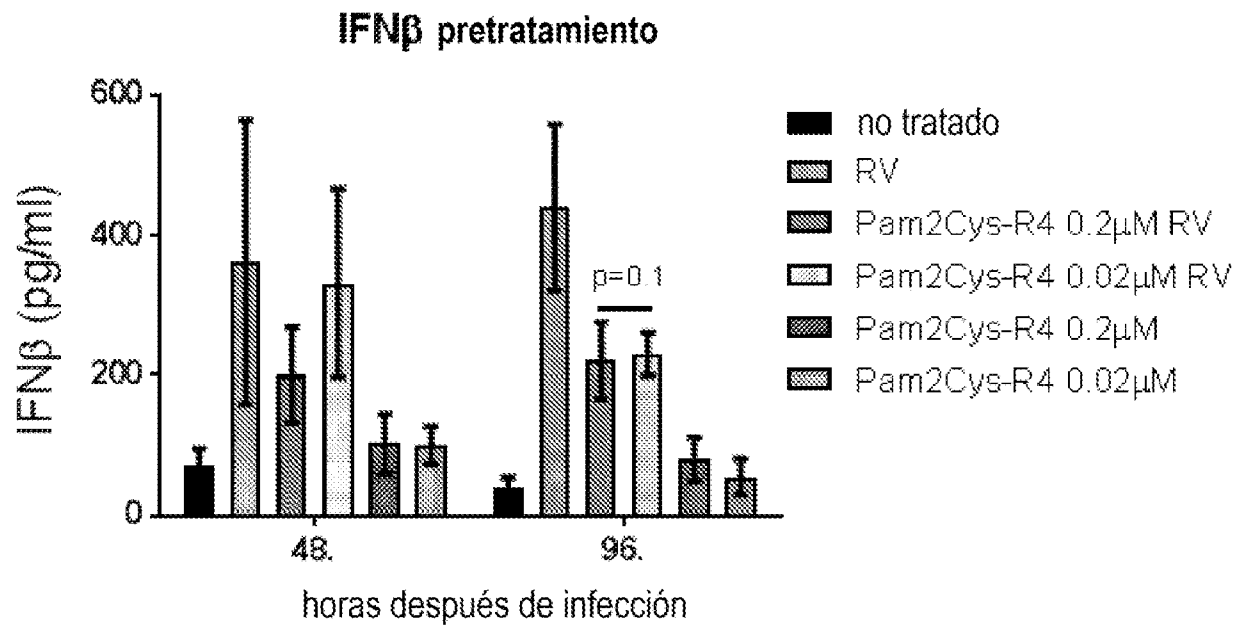


Figura 13

(a)



(b)

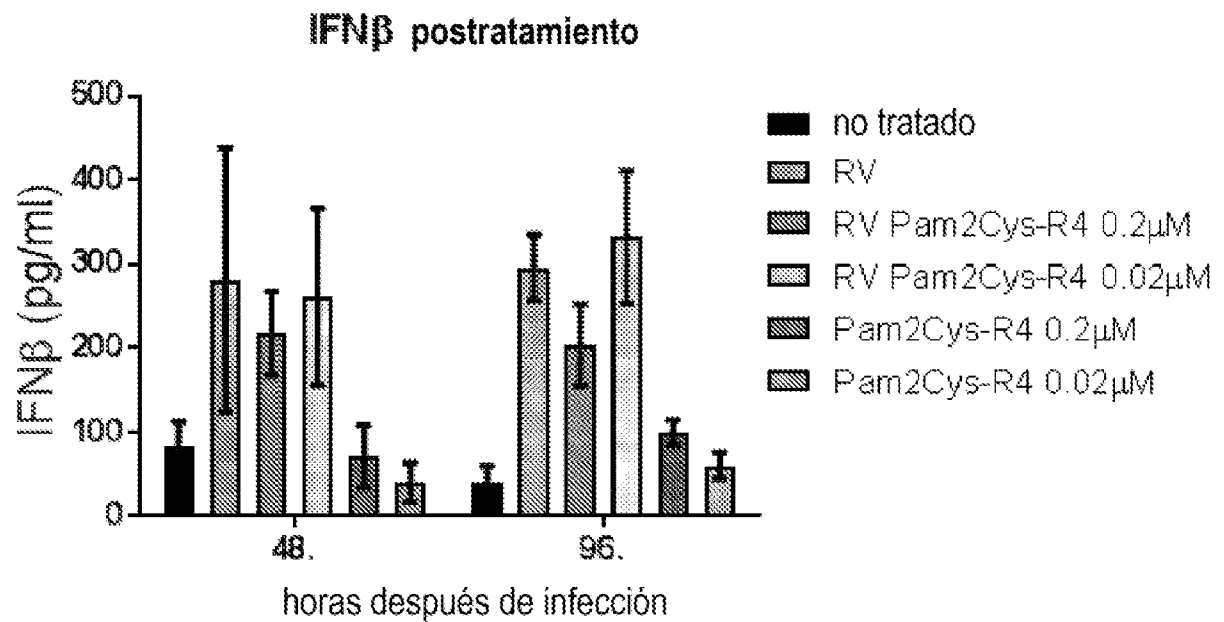
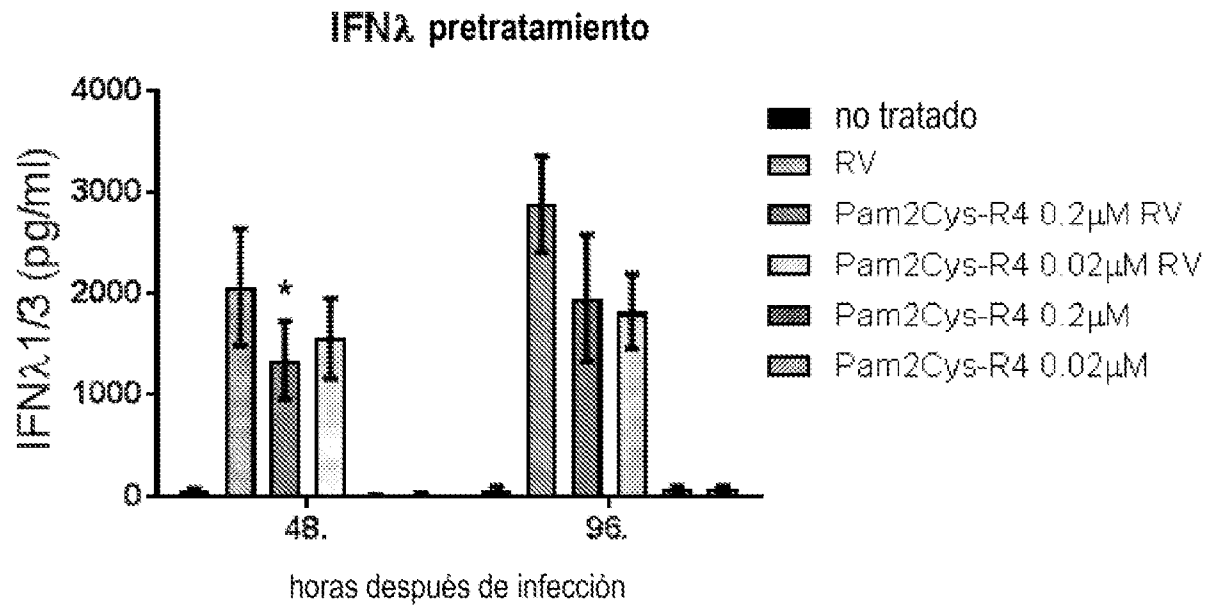


Figura 13 continuación

(c)



(d)

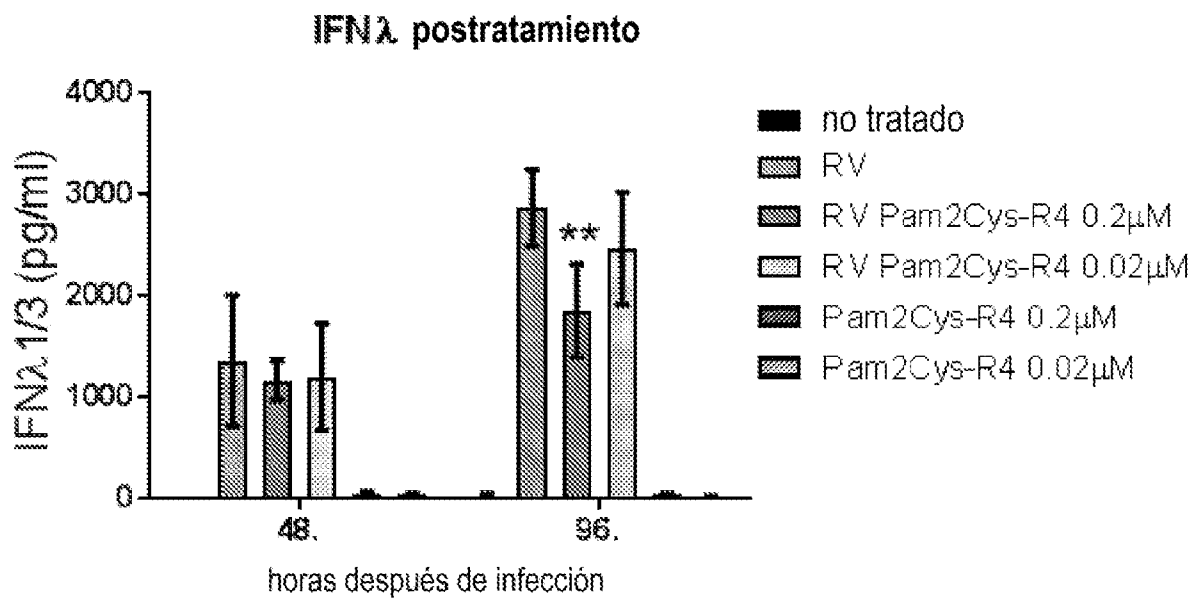
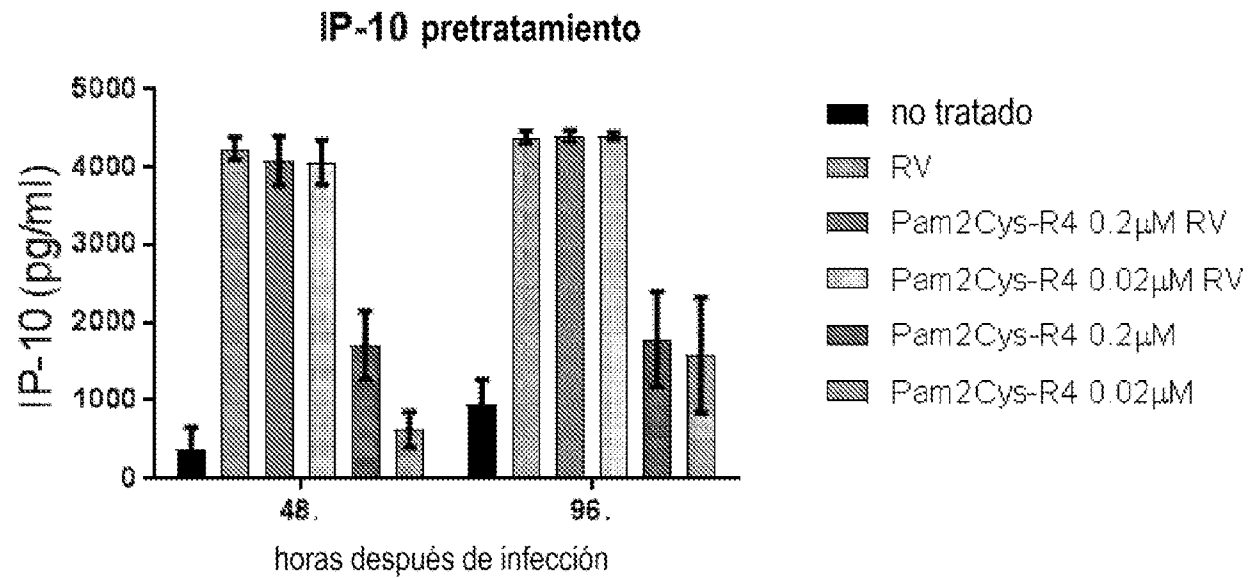


Figura 14

(a)



(b)

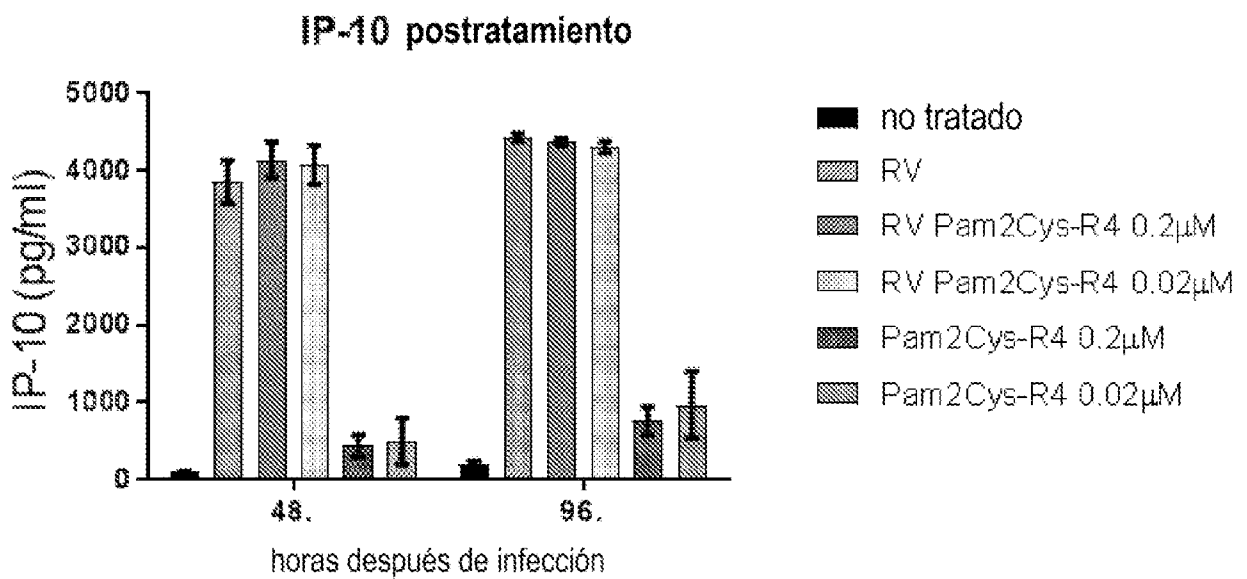
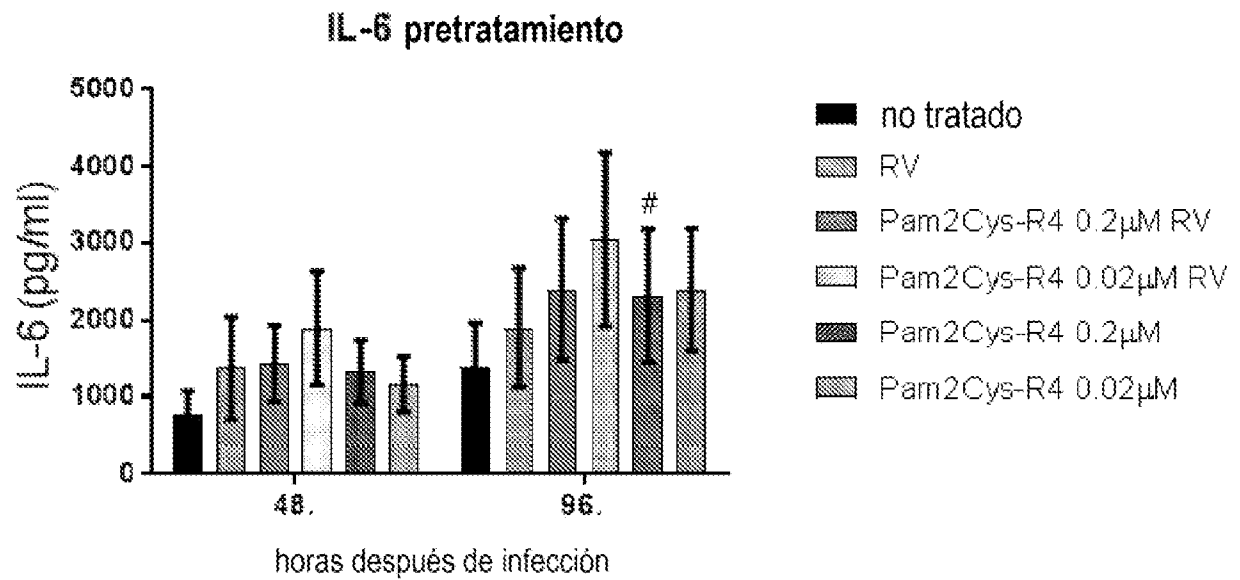


Figura 14 continuación

(c)



(d)

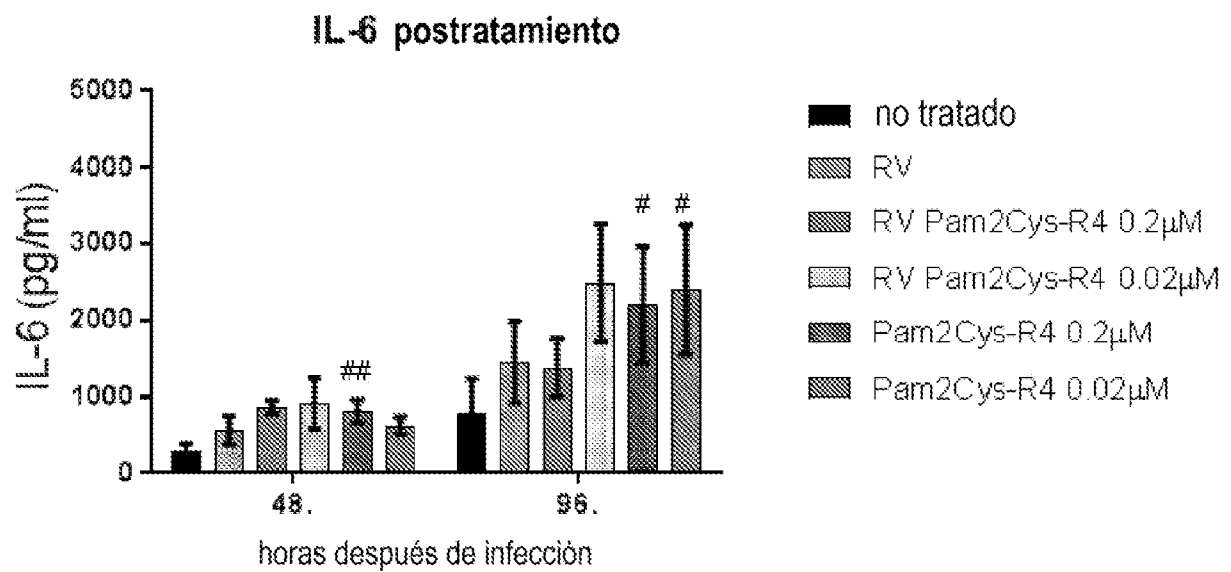
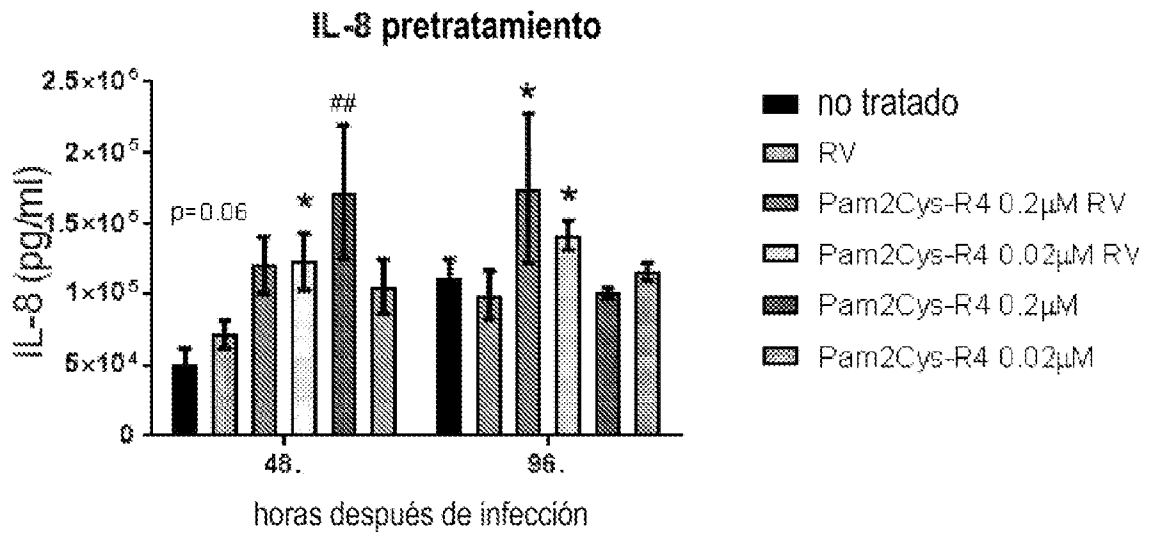


Figura 14 continuación

(e)



(f)

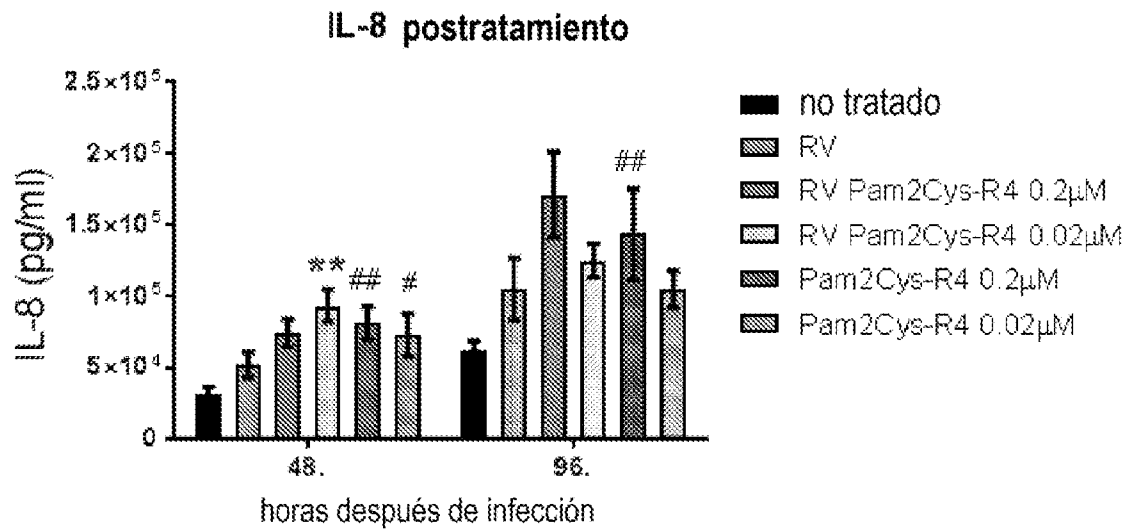
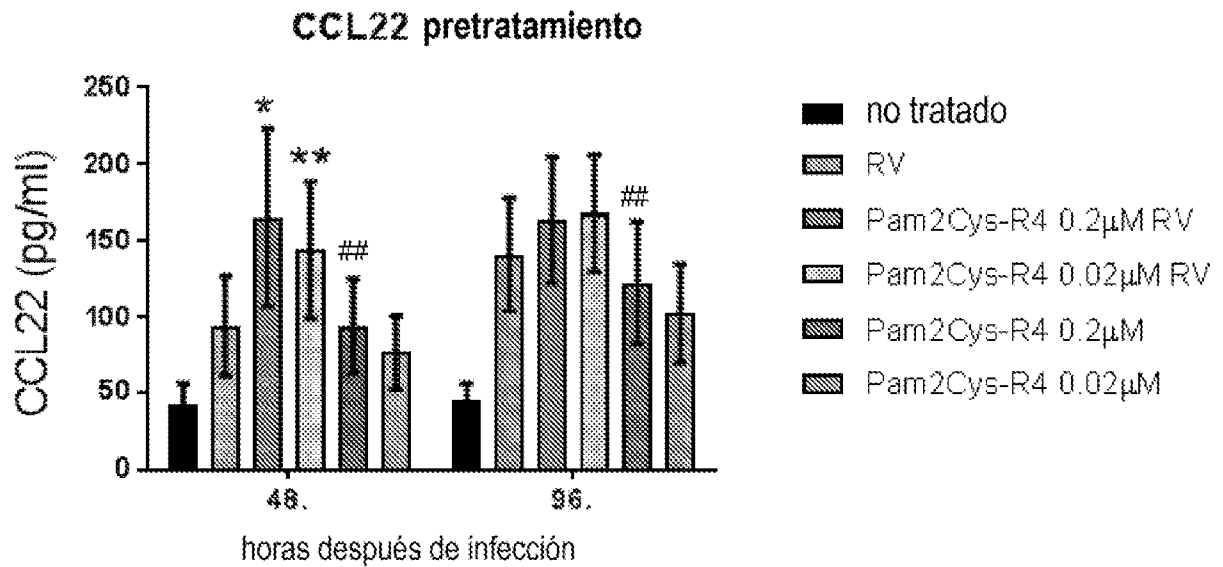


Figura 14 continuación

(g)



(h)

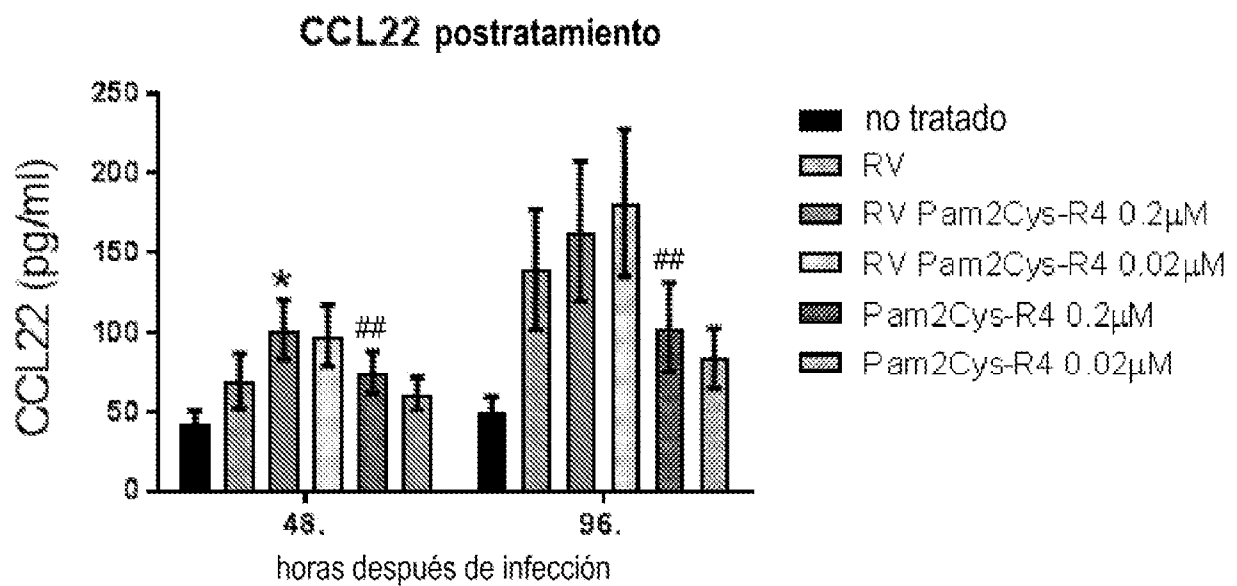


Figura 15

(a-b)

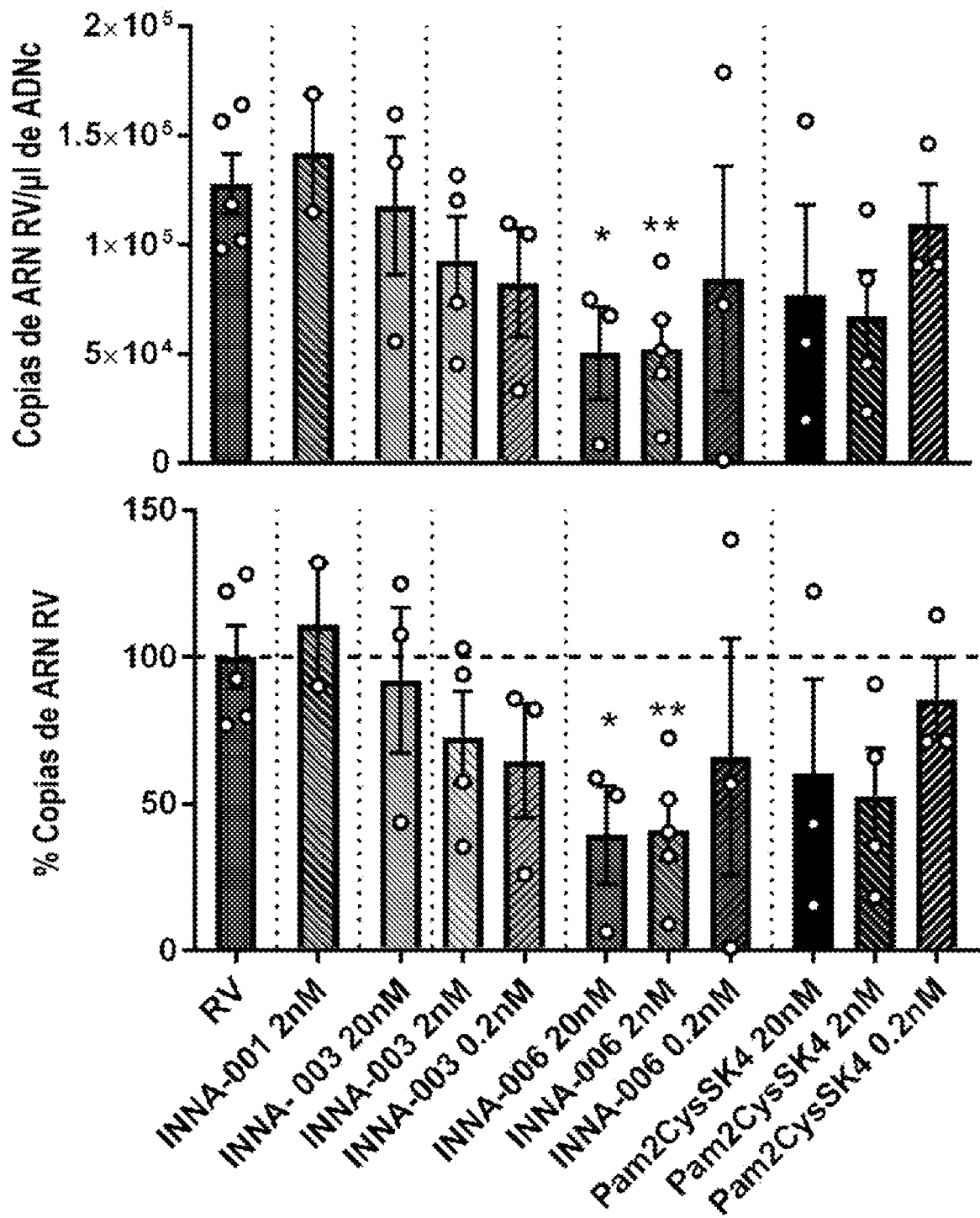


Figura 16

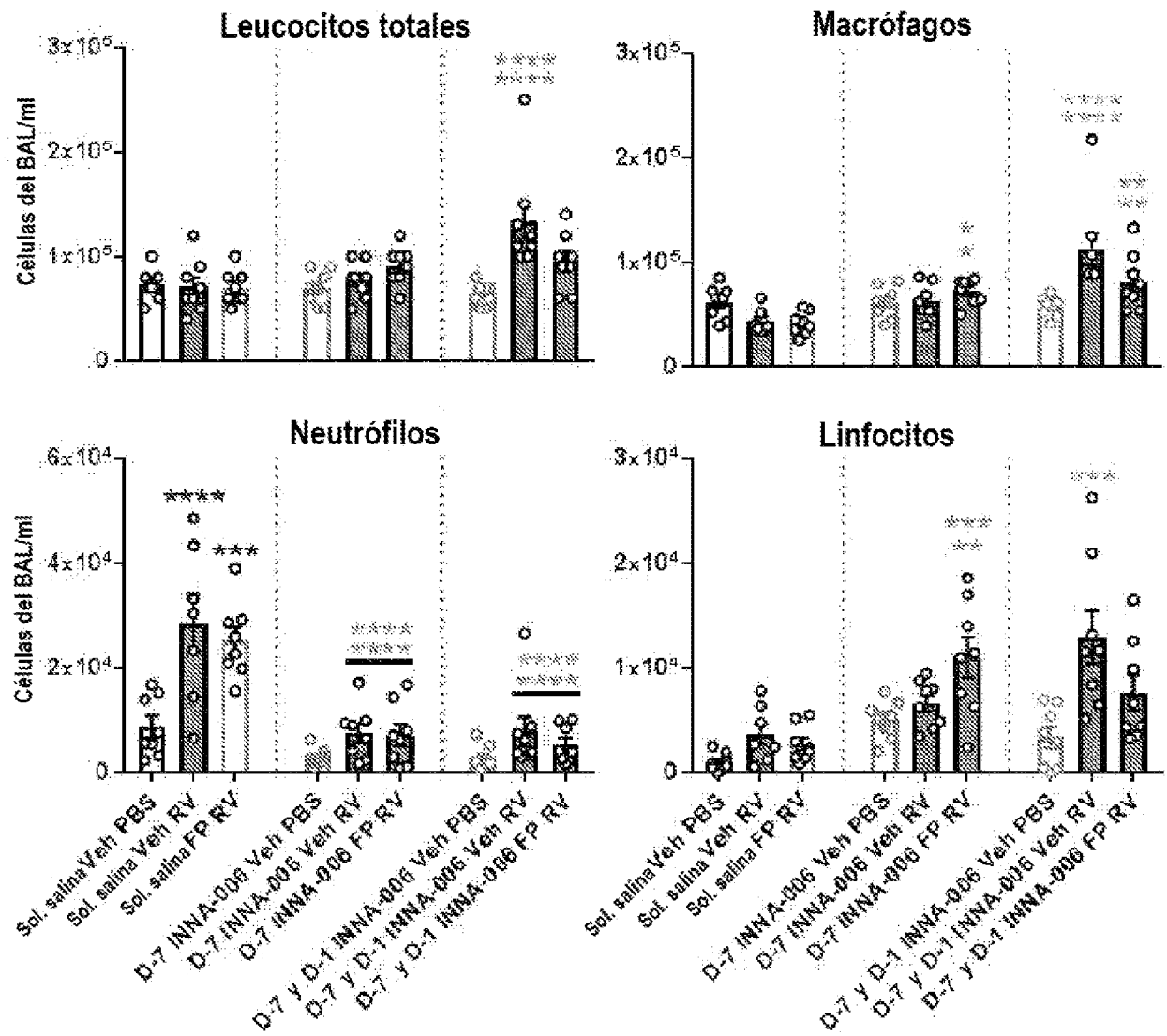


Figura 17

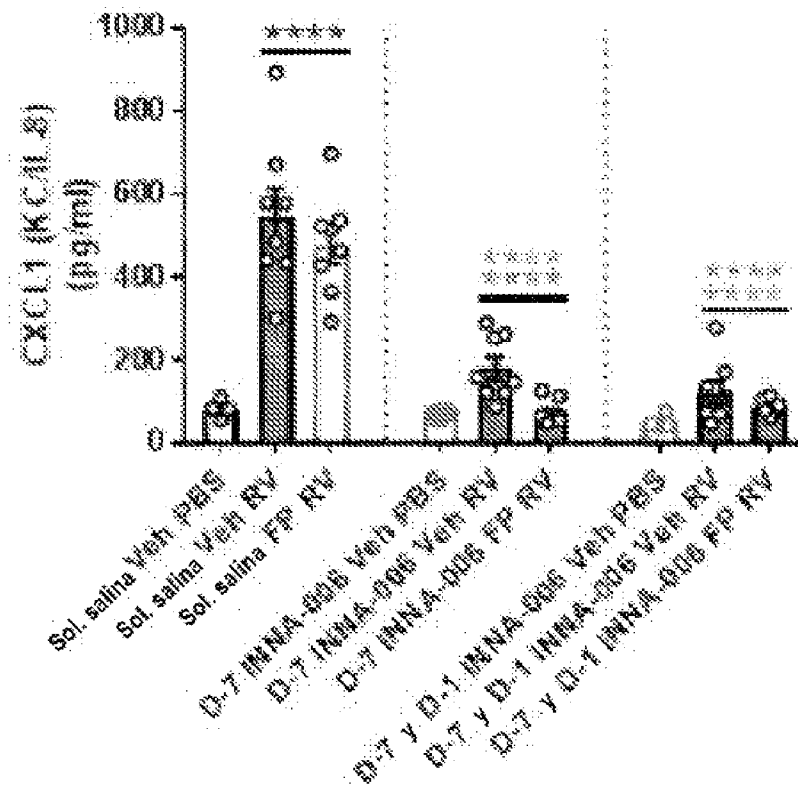


Figura 18

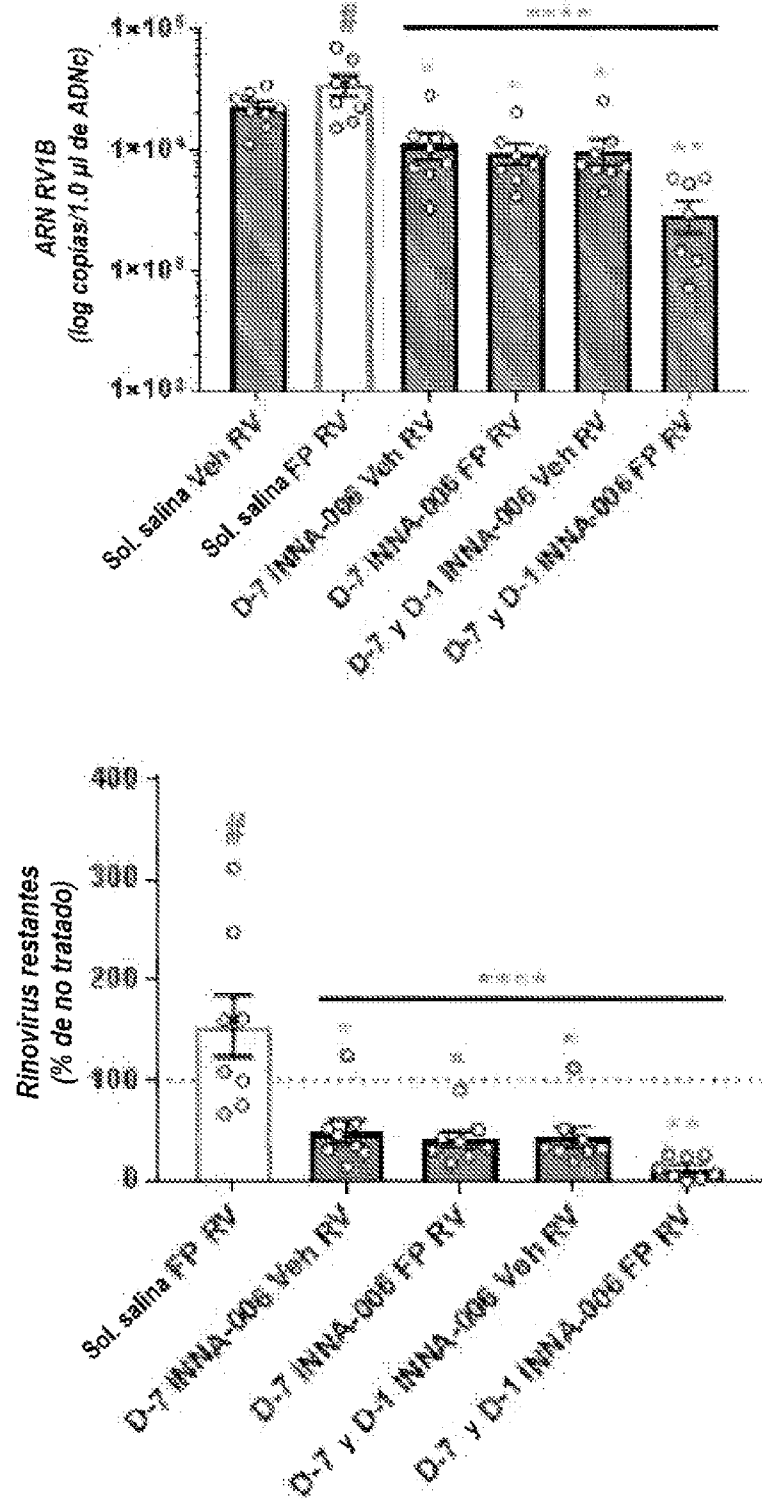


Figura 19

Ensayo de gen indicador de NFkB en la estimulación de TLR2

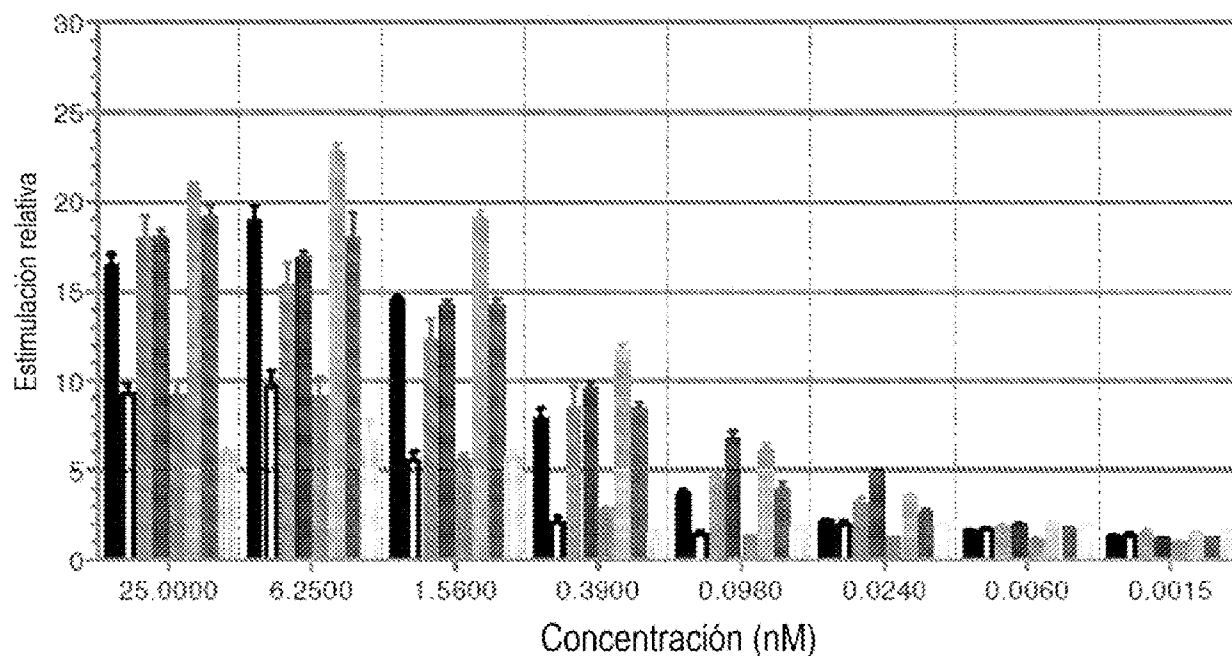


Figura 20

Actividad estimuladora de TLR2 de INNA-006 vs. Pam3Cys-Ser-PEG3000 por ensayo de gen indicador

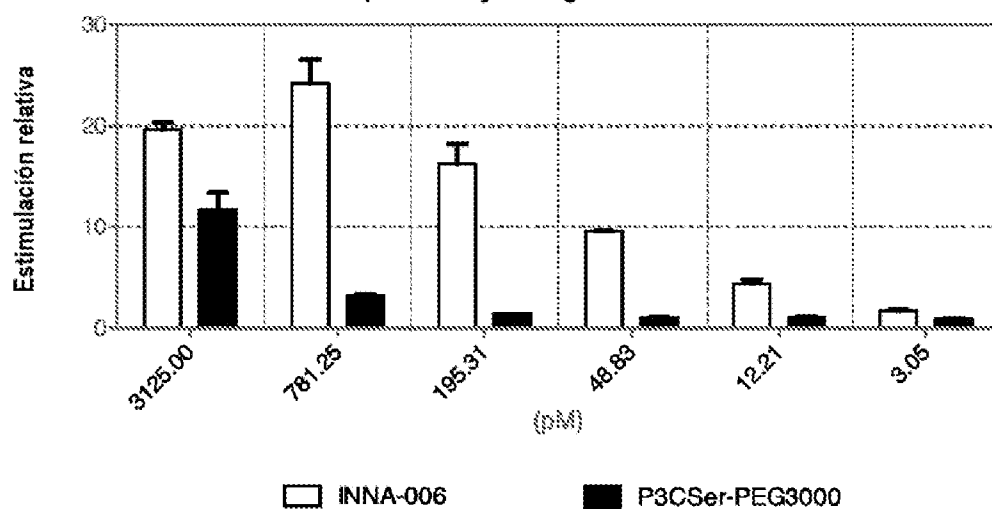


Figura 21

Cribado de agonistas de TLR humano

