

PETITORIO



REPÚBLICA DE COLOMBIA

Ministerio de Industria y Comercio

Superintendencia de Industria y Comercio

Formulario Único de Solicitud de Patente PCT

Entrada en Fase Nacional

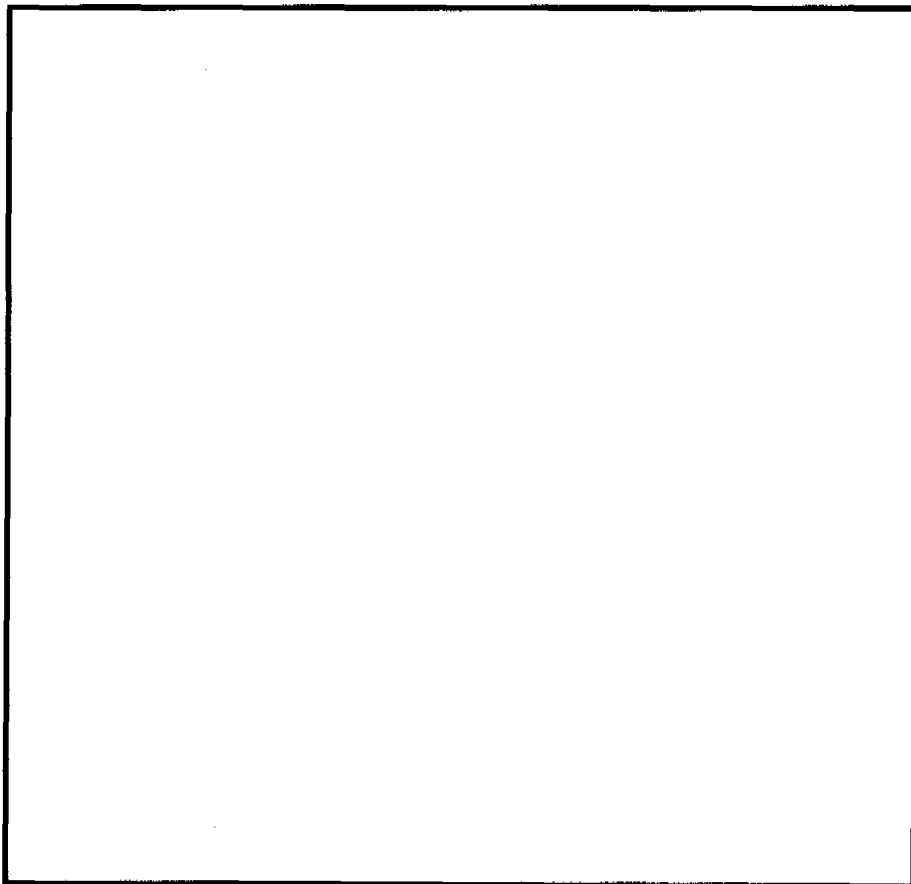
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1		SOLICITUD DE:	
☒ Patente de Invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I		☒ Capítulo II	
2	Nombre: CORIXA CORPORATION		IDENTIFICACIÓN
SOLICITANTE (71)	Dirección: 1124 Columbia Street		C.C. ☐ NIT ☐
	Nacionalidad o domicilio: Seattle, Estado de Washington, E.U.A.		C.E. ☐ Otro ☐
	Lugar de Constitución:		Cual Número
3	Nombre: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE		IDENTIFICACIÓN
REPRESENTANTE O APODERADO	Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12		C.C. ☒ NIT ☐
	Teléfono: 285 7460 Fax: 28 9267		C.E. ☐ OTRO ☐
	E-mail info@castillograu.com		Cual Número 79.397.879 TP 68.995 del de Bogotá C.S.J.
4	Nombre: Jory R. BALDRIDGE - David A. JOHNSON - Greg SOWELL - Christopher W. CLUFF		
INVENTOR(ES) (72)	Dirección 1862 Mountain Meadow Lane - 121 Woodland Way - 20520 Bothell/Everett Highway - 516 South 6th Street		
	Nacionalidad o Domicilio: Victor, MT. -Hamilton, MT. - Bothell, WA. - Hamilton, MT. (E.U.A.)		
5 PCT (86)			
Solicitud Internacional No.		PCT/US02/03580	Fecha : 04/02/02
Publicación Internacional No.		WO 03/065806 A1	Fecha: 14/08/03
6 Título (54) NUEVOS COMPUESTOS INMUNOEFFECTORES (Folio 52)			
7 Clasificación Internacional (51) A01N 43/04 // A61K 31/704 2.			
8	Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha
Si ☐ No ☒			(31) Número de Solicitud
9 Comprobante de pago N°: 68959 Fecha:			

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso No. 19.663
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del inventor al solicitante o a su acusante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de patente.

NOMBRE: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONFIRMA: C.C. 70'307.879
de BogotáT.P. No. 68.995
del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

Handwritten mark resembling a stylized 'B' or '3'.

SUPERINTENDENCIA DE ECONOMIA
RECIBO No. 249475689-2
Fecha: 01/09/2004
Cuenta: 050-00110-6
Depositar: CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS

NIT : 300174099-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 68,959
FECHA : SEPTIEMBRE 1 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	29075689	01/09/2004	422,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

NUEVOS COMPUESTOS INMUNOEFFECTORES

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere en general a compuestos inmunoefectores, su uso en composiciones farmacéuticas y métodos para su producción y su uso en vacunación profiláctica y/o terapéutica. Más en particular, la presente invención se refiere a compuestos novedosos que comprenden 2-deoxi-2-amino- β -D-glucopiranos (glucosalina) enlazados glicosídicamente a un grupo aminoalquil cíclico (aglicon), y su uso en sistemas adyuvantes farmacéuticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inmunidad humoral y la inmunidad mediada por células son las dos principales ramas de la respuesta mamífera inmune. La inmunidad humoral incluye la generación de anticuerpos a antígenos extraños. Los anticuerpos son producidos por β -linfocitos. La inmunidad mediada por células incluye la activación de T-linfocitos que actúan en células infectadas que portan antígenos extraños o estimulan a otras células para que actúen en células infectadas. Ambas ramas del sistema mamífero inmune son importantes para combatir la enfermedad. La inmunidad humoral es la principal línea de defensa contra patógenos bacterianos. En el caso de una enfermedad viral, la inducción de T linfocitos citotóxicos (CTL) parece ser crucial para inmunidad protectora. Por ello, una vacuna efectiva estimula preferiblemente ambas ramas del sistema inmune para protección contra la enfermedad.

Las vacunas presentan antígenos extraños de agentes causantes de enfermedades a un anfitrión, de modo que el anfitrión pueda montar una respuesta protectora inmune. A menudo, los antígenos de la vacuna son formas muertas o atenuadas de los microbios que causan la enfermedad. La presencia de componentes no esenciales y antígenos en estas vacunas muertas o atenuadas ha motivado bastante esfuerzo para refinar componentes de vacuna, incluido el desarrollo de antígenos sintéticos bien definidos utilizando técnicas químicas y recombinantes. Sin embargo, la refinación y la simplificación de vacunas, ha llevado a una pérdida concomitante en potencia. Antígenos sintéticos de peso molecular bajo, aunque desprovistos de contaminantes potencialmente dañinos, con frecuencia no son suficientemente inmunogénicos por sí mismos. Estas observaciones han llevado a los investigadores a agregar a las composiciones de vacuna estimulantes del sistema inmune conocidos como adyuvantes, con el fin de potenciar la actividad de los componentes de vacuna.

Los adyuvantes inmunes son compuestos que, cuando son administrados a un sujeto o son probados *in vitro*, aumentan la respuesta inmune a un antígeno en un sujeto al que se administra el antígeno, o realza ciertas actividades de células del sistema inmune. Se ha preparado y probado un número de compuestos que exhiben varios grados de actividad adyuvante (ver por ejemplo, Shimizu y colaboradores, 1985, Bulusu y colaboradores, 1992, Ikeda y colaboradores, 1993, Shimizu y colaboradores, 1994, Shimizu y colaboradores, 1995, Miyajima y colaboradores, 1996). Sin embargo, éstos y otros sistemas adyuvantes anteriores presentan con frecuencia propiedades tóxicas, son inestables y/o tienen efectos inmunoestimulantes inaceptablemente bajos.

Actualmente, el único adyuvante con licencia para uso humano en los Estados Unidos es alumbre, un grupo de sales de aluminio (por ej: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) en los cuales se formulan los antígenos de vacunas. Vehículos particulados como alumbre, se reporta que estimulan la ingestión, el procesamiento y la presentación de antígenos solubles por macrófagos. Sin embargo, alumbre no está libre de efectos secundarios y desafortunadamente está limitado únicamente a inmunidad humoral (anticuerpo)

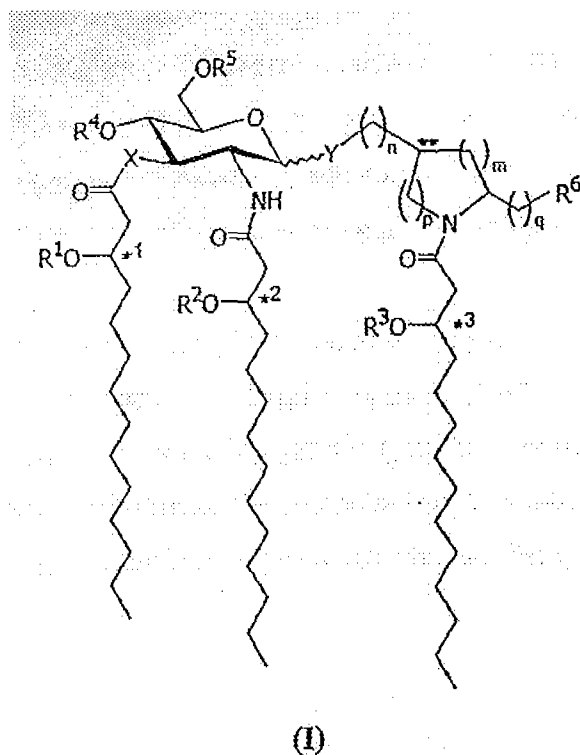
El descubrimiento y el desarrollo de sistemas adyuvantes efectivos es esencial para mejorar la eficacia y seguridad de vacunas actuales y futuras. Por ello, existe una necesidad continua de sistemas adyuvantes nuevos y mejorados, en particular aquellos que conducen ambas ramas efectoras del sistema inmune, con el fin de facilitar el desarrollo de una siguiente generación de vacunas sintéticas. La presente invención llena éstas y otras necesidades.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los compuestos de la presente invención son moléculas inmunoefectoras que realzan las respuestas inmunes humorales y mediadas por células a los antígenos de vacunas. Generalmente, los compuestos se pueden describir como que pertenecen a la clase de compuestos AGP cíclicos, donde AGP significa fosfatos de aminoalquil glucosaminida (*aminoalkyl glucosaminida phosphates*). La expresión "AGP cíclico" significa un azacicloalquilo o (azacicloalquilo)fosfato de alquil glucosaminida, en donde un 2-deoxi-2-amino-β-D-glucopiranos (glucosamina) se enlaza glicosídicamente a un grupo azacicloalquilo o (azacicloalquil)alquil(aglicon).

Los compuestos de esta invención comprenden un 2-deoxi-2-amino-β-D-glucopiranos (glucosalina) enlazados glicosídicamente a un grupo aminoalquil cíclico (aglicon). Los compuestos son fosforilados en la posición 4 ó 6 del anillo de glucosalina y acilados con los residuos de alcanoiloxitetradecanoil en el nitrógeno de aglicon y en las

posiciones 2 y 3 del anillo de glucosalina. Los compuestos de la presente invención se describen generalmente por la fórmula (I):

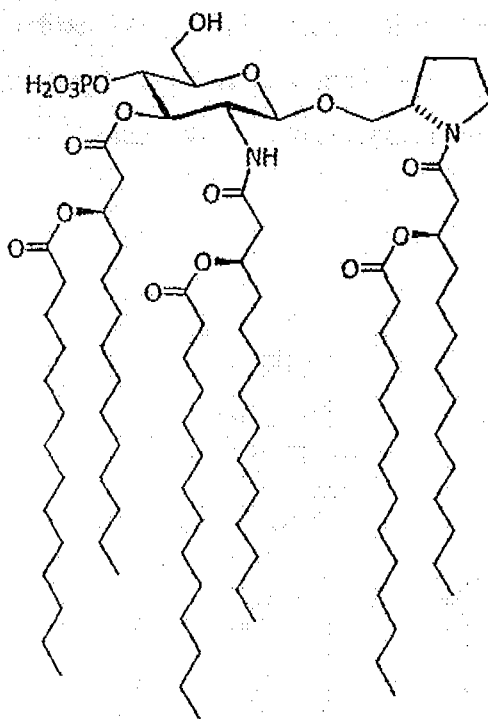


y sales farmacéuticamente aceptables de lo mismo, en donde X es -O- o -NH- y Y es -O- o -S-; cada uno de R^1 , R^2 y R^3 son independientemente un grupo acilo (C_9 - C_{14}), incluidos grupos de acilo, saturados, no saturados y ramificados; R^4 es -H o $-PO_3R^7R^8$, en donde cada uno de R^7 y R^8 son independientemente H o grupos alifáticos(C_1 - C_4); R^5 es -H, $-CH_3$ o $-PO_3R^9R^{10}$, en donde cada uno de R^9 y R^{10} son seleccionados independientemente de -H y grupos alifáticos(C_1 - C_4); R^6 es seleccionado independientemente de H, OH, grupos oxialifáticos(C_1 - C_4), $-PO_3R^{11}R^{12}$, $-OPO_3R^{11}R^{12}$, $-SO_3R^{11}$, $-OSO_3R^{11}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-SR^{11}$, $-CN$, $-NO_2$, $-CHO_2$, $-CO_2R^{11}$ y $CONR^{11}R^{12}$, en donde cada uno de R^{11} y R^{12} son seleccionados independientemente de H y grupos alifáticos(C_1 - C_4); siempre y cuando que R^4 y R^5 sea un grupo que contenga fósforo y que cuando R^4 es $-PO_3R^7R^8$, R^5 sea diferente de $-PO_3R^9R^{10}$, en donde “*1-3” y “**” representan centros quirales;

en donde n , m , p y q , son cada uno independientemente un entero de 0 a 6, con la condición de que la suma de p y m sea entre 0 y 6.

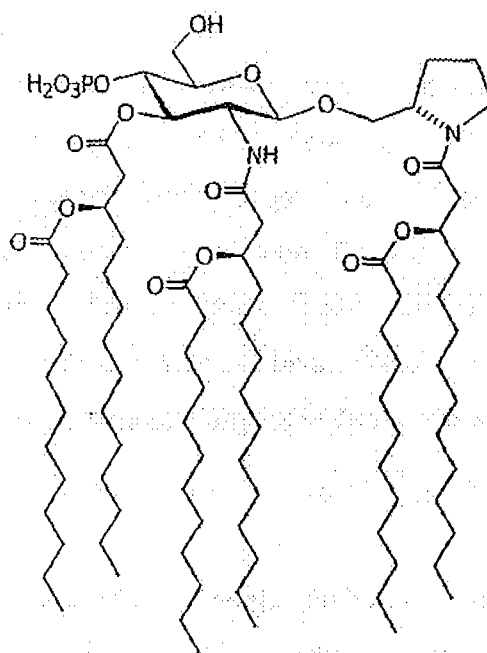
En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención cada uno de X y Y son oxígeno, R^4 es $PO_3R^7R^8$, R^5 y R^6 son H, y n , m , p y q son enteros de 0 a 3. En una realización más preferida, R^7 y R^8 son -H. Aún en una realización más preferida, n es 1, m es 2, y los subíndices p y q son 0. Aún en una realización más preferida, R_1 , R_2 y R_3 son grupos acilo C_9 - C_{13} , más preferiblemente, grupos acilo C_{10} - C_{12} . Todavía en una realización más preferida, *1-3 están en la configuración *R*, Y está en posición ecuatorial, y ** está en la configuración *S*. Preferidos particularmente están *N*-[*(R)*-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-[*(S)*-2-pirrolidinilmetil 2 deoxi-4-O-fosfono-2-[*(R)*-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-3-

O-[*(R)*-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- β-D-glucopiranosida y sales farmacéuticamente aceptables de lo mismo; Fórmula II,



(II)

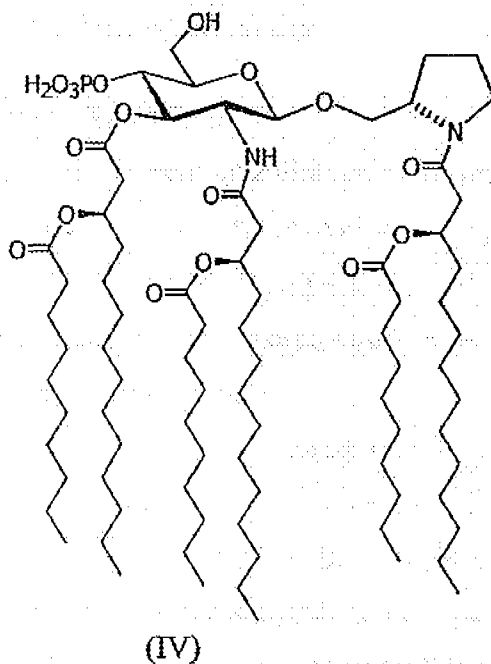
N-[*(R)*-3-dodecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-fosfono-2- [*(R)*-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[*(R)*-3-dodecanoiloxitetradecanoil] β-D-glucopirasonida y sales farmacéuticamente aceptables de lo mismo; Fórmula III,



(III)

926

y *N*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2 deoxi-4-*O*- fosfono-2- [(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]-β-*D*-glucopiranosida y sales farmacéuticamente aceptables de lo mismo; Fórmula IV.



y sus sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también provee composiciones farmacéuticas que contengan compuestos de las anteriores fórmulas generales y específicas. Las composiciones farmacéuticas pueden combinarse con una variedad de antígenos y en una variedad de formulaciones conocidas para las personas versadas en la técnica.

Los compuestos de la presente invención son también útiles en métodos para inducir una respuesta inmune en un sujeto. El método implica administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la presente invención, preferiblemente en una composición farmacéutica que también contenga un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también abarca métodos para el tratamiento de un mamífero que sufra o que sea susceptible a una infección patogénica, cáncer o trastorno autoinmune. El método consiste en administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los compuestos de la presente invención, preferiblemente en una composición farmacéutica que también contenga un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente invención también incluye un método para el tratamiento de enfermedades o condiciones aliviadas por la producción de óxido nítrico en un sujeto. El método consiste en poner al sujeto en contacto con una cantidad efectiva de un compuesto o compuestos de la presente invención, o con una cantidad efectiva de una composición que contenga uno o más compuestos de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente

aceptable. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden administrarse 48 horas antes de, hasta y durante isquemia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

La expresión “acilo” se refiere a los grupos derivados de un ácido orgánico mediante la remoción de la porción hidroxil del ácido. Por lo tanto, acilo incluye, por ejemplo, acetilo, propionilo, butirilo, decanoilo y pivaloilo. Por ejemplo, “acilo(C₉-C₁₄)” se refiere a un grupo acilo que tiene de 9 a 14 átomos.

La expresión “alifático” por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, salvo indicación al contrario, un medio de hidrocarburo, de cadena recta o ramificada, o cíclico, que incluye un medio que contiene elementos tanto cíclicos como de cadena, los cuales pueden ser completamente saturados o mono o poli-insaturados, con el número de átomos de carbono designado (por ej: C₁-C₄ significa uno a cuatro carbonos). Ejemplos de radicales de hidrocarburos saturados incluyen grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclopropilo, ciclopropilmetil, metileno, etileno y n-butileno. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles y/o enlaces triples. Ejemplos de grupos alifáticos insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, -2-(butadienilo), 1-propinil y 3-propinil.

La expresión “oxialifático” se refiere a los grupos que tienen un grupo alifático fijo al resto de la molécula mediante un átomo de oxígeno.

Cada una de las anteriores expresiones (por ej: “alquilo”, “acilo”) incluye formas sustituidas e insustituidas del medio indicado.

Los sustituyentes de los grupos alifáticos pueden ser una variedad de grupos seleccionados de: -OR', =O, =S, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR'C(O)₂R', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN y -NO₂ en un número que varía entre cero y (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. Cada uno de R'R'' se refieren a hidrógeno y grupos alifáticos (C₁-C₄). De la anterior discusión de sustituyentes, una persona versada en la técnica entenderá que el término “alquilo” incluye grupos tales como haloalquilo (por ej: -CF₃ y -CH₂CF₃) y similares.

Las expresiones “halo” o “halógeno” por sí mismas o como parte de otro sustituyente, significan, salvo indicación al contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. En compuestos con múltiples sustituyentes halógenos, los halógenos pueden ser los mismos o diferentes.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" incluye sales de los compuestos activos que son preparados con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes en particular que se encuentren en los compuestos que se describen en este contexto. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente acídicas, las sales de adición de base se pueden obtener por la adición de la base deseada, bien sea neta o en un solvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, las sales de adición de ácido se pueden obtener mediante la adición del ácido deseado, bien sea neto o en un solvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas que se derivan de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenfosfórico, dihidrogenfosfórico, sulfúrico, monohidrogensulfúrico, hidriódico o fosfórico y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos, como ácido acético, propínico isobutírico, oxálico, maléico, masónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencensulfónico, p-tolisulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de amino ácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácido glucurónico o galactunórico y similares (ver, por ejemplo, Berge, S.M y colaboradores, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, 66, 1-19). Algunos compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como acídicas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de base o de ácido.

Las formas neutras de los compuestos pueden regenerarse poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto precursor en la forma tradicional. La forma precursora del compuesto se difiere de las varias formas de sales en algunas propiedades físicas, tal como la solubilidad en solventes polares, pero de otra forma, para los propósitos de la presente invención, las sales son equivalentes a la forma precursora del compuesto.

Además de las formas de sales, la presente invención provee compuestos que están en forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos que se describen aquí son los compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos bajo condiciones fisiológicas para proveer los compuestos de la presente invención. Adicionalmente, los profármacos pueden convertirse en los compuestos de la presente invención por medio de métodos químicos o bioquímicos en un ambiente *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos pueden convertirse lentamente en los compuestos de la presente invención cuando se colocan en un reservorio de parche transdérmico con una enzima o reactivo químico adecuado.

Algunos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas, incluidas formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretende que estén abarcadas dentro del alcance de la presente invención. Algunos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos que contempla la presente invención y su intención es que estén dentro del alcance de la misma.

Algunos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; los racematos, los diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales se pretende que estén abarcados dentro del alcance de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiorrotulados con isótopos radioactivos, tales como por ejemplo, tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, bien sea radioactivos o no, se pretende que estén abarcados dentro del alcance de la presente invención.

Introducción

En un esfuerzo por mejorar la seguridad de las vacunas, los fabricantes están evitando vacunas con todas las células muertas y están produciendo vacunas recombinantes o de subunidad. En la preparación de estas vacunas más seguras se eliminan componentes bacteriales o virales extraños, conservando al mismo tiempo las estructuras mínimas o epítopos necesarios para inmunidad protectora. La seguridad de estas vacunas se mejora debido a la eliminación de componentes bacteriales o virales extraños que a menudo son tóxicos y pirogénicos. Sin embargo, los mismos componentes que resultan en toxicidad, proveen inmunoestimulación no específica que hace que las vacunas de célula completa sean tan efectivas. Sin la inmunoestimulación adicional, las estructuras mínimas y los epítopos que comprenden las vacunas recombinantes y de subunidad, son a menudo deficientemente inmunogénicos.

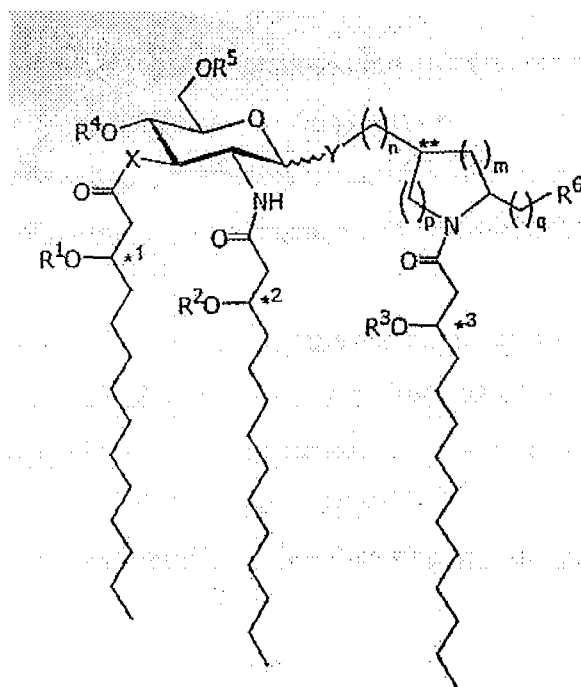
Una molécula disacárido derivada del LPS de *Salmonella minnesota* R595, inmunoestimulante MPL® (Corixa Corp.), tiene propiedades inmunoestimulantes. El inmunoestimulante MPL®, lípido A monofosforilo, es derivado estructural del lípido A (o LPS) y tiene un índice terapéutico mejorado con respecto al lípido A (ver Patente US 4,987,237 estructura del lípido A monofosforilo; Patentes US Nos. 4,436,727 y 4,436,728, descripción de la preparación del lípido A monofosforilo). Otros inmunoestimulantes útiles incluyen 3-de-O-lípido A monofosforilo acilado (3D-MPL), el cual se describe en la

Patente U.S. No. 4,912,094. El compuesto puede administrarse de manera segura a seres humanos como dosis hasta al menos de 20µg/kg, aunque en algunos pacientes se pueden presentar aumentos en temperatura, síntomas parecidos a la gripe, aumento del ritmo cardiaco y reducciones modestas en la presión sanguínea a niveles de dosis de $\geq 10\mu\text{g/kg}$. Las evaluaciones de cultivos de células y de animales confirman que el inmunoestimulante MPL® todavía conserva alguna de la actividad inmunoestimulante del LPS precursor en esa pirogenicidad, y la capacidad de inducir citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF e IL-8 permanecen, aunque a niveles de dosis más altas. Es por ello que se reconoce la necesidad de adyuvantes de vacuna efectivos. Idealmente, estos adyuvantes estimularán la respuesta inmune protectora sin inducir toxicidad y pirogenicidad indeseadas.

En un esfuerzo por obtener un inmunoestimulante que tenga baja pirogenicidad, se han preparado moléculas sintéticas que compartan similitudes estructurales con el inmunoestimulante MPL®. Estas moléculas novedosas se denominan colectivamente, fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGP), consisten de un medio de glucosa acilada enlazada a un grupo aminoalquil acilado (Johnson y colaboradores (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2273-2278; PCT/WO98/50399 y sus referencias). Cada molécula posee 6 colas de ácido graso que se cree que sea el número óptimo para actividad de adyuvante pico. La sustitución de los diferentes medios químicos dentro de las estructuras de aminoalquilo fue diseñada en los AGP como anticipo a las propiedades de optimización de estabilidad y solubilidad. De este modo, los AGP pueden separarse generalmente en varias familias basados en la estructura de sus grupos aminoalquilo. Luego de una evaluación biológica inicial, fue aparente que los motivos aminoalquilo podían afectar, en forma dramática, las propiedades pirogénicas de los AGP (ver Solicitud de Patente U.S Serie No. 09/074,720, radicada el 7 de mayo de 1998 y las Patentes U.S. Nos. 6,113,918 y 6,303,347). Como parte del proceso inicial de selección de los compuestos adyuvantes sintéticos se determinaron los datos de pirogenicidad en conejos. Se observó que varios de los compuestos no provocaban una respuesta de fiebre cuando se administraban por vía intravenosa a dosis de 10µg/kg. En general, estos mismos compuestos no indujeron niveles detectables de citoquinas inflamatorias TNF- α o IL-1 β en un ensayo de inducción de citoquina *ex vivo* en células mononucleares sanguíneas periféricas humanas. Aquí reportamos sobre estudios de las propiedades adyuvantes de una clase de AGP que induce actividad mínima, tanto en la prueba de pirógenos en conejos como en el ensayo de citoquina *ex vivo*.

Compuestos y Composiciones

La presente invención provee compuestos descritos generalmente por la fórmula (I):



(I)

y sales farmacéuticamente aceptables de lo mismo, en donde X es -O- o -NH- y Y es -O- o -S-; cada uno de R^1 , R^2 y R^3 son independientemente un grupo acilo (C_9-C_{14}), incluidos grupos de acilo, saturados, no saturados y ramificados; R^4 es -H o $-PO_3R^7R^8$, en donde cada uno de R^7 y R^8 son independientemente H o grupos alifáticos(C_1-C_4); R^5 es -H, $-CH_3$ o $-PO_3R^9R^{10}$, en donde cada uno de R^9 y R^{10} son seleccionados independientemente de -H y grupos alifáticos(C_1-C_4); R^6 es seleccionado independientemente de H, OH, grupos oxialifáticos(C_1-C_4), $-PO_3R^{11}R^{12}$, $-OPO_3R^{11}R^{12}$, $-SO_3R^{11}$, $-OSO_3R^{11}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-SR^{11}$, $-CN$, $-NO_2$, $-CHO_2$, $-CO_2R^{11}$ y $CONR^{11}R^{12}$, en donde cada uno de R^{11} y R^{12} son seleccionados independientemente de H y grupos alifáticos(C_1-C_4); siempre y cuando que R^4 y R^5 sea un grupo que contenga fósforo y que cuando R^4 es $-PO_3R^7R^8$, R^5 sea diferente de $-PO_3R^9R^{10}$, en donde “*1-3” y “***” representan centros quirales;

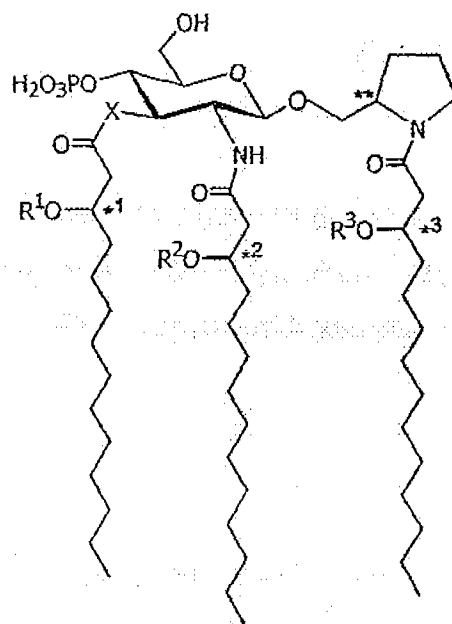
en donde n , m , p y q , son cada uno independientemente un entero de 0 a 6, con la condición de que la suma de p y m sea entre 0 y 6.

Aunque el hexopiranosido en la Fórmula I se muestra en la configuración gluco, otros glicósidos se encuentran dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, glicopiranosidos, incluidos otros hexopiranosidos (por ej: alo, altro mano, gulo, ido, galacto, talo), se encuentran dentro del alcance de la invención.

En la fórmula general anterior, la configuración de los centros 3'-estereogénicos a los que se fijan los residuos normales de acilo graso, identificados como “*1”, “*2” y “*3”, es R o S , pero preferiblemente R . La estereoquímica absoluta de los átomos de carbono de la unidad de aglicón cíclico a la que se enlazan R^6 y la unidad de glucosalina, directa o indirectamente (denotados como “***”) puede ser R o S . En la fórmula general anterior, Y

puede estar en la posición ecuatorial o axial, pero preferiblemente ecuatorial. Todos los estereoisómeros, enantiómeros, diastereómeros y mezclas de lo mismo, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

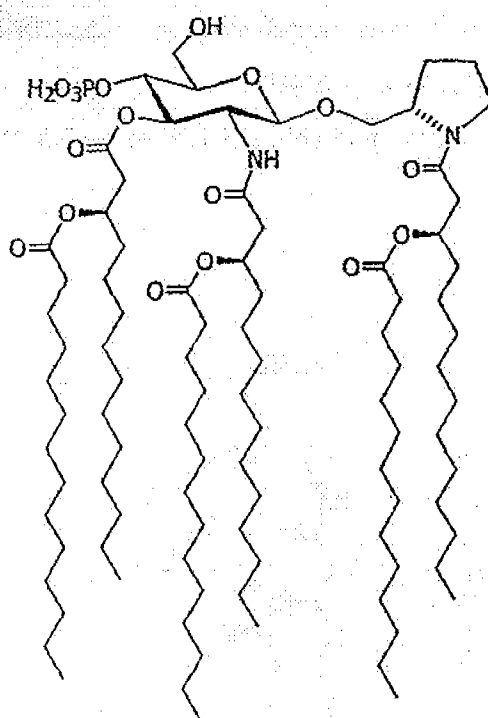
En realizaciones preferidas de la presente invención, X y Y son -O-, R⁴ es fosfono, R⁵ y R⁶ son H, y n, m, p, y q son enteros de 0 a 3, y más preferiblemente, de 0 a 2. Más preferiblemente, el entero n es 1, el entero m es 2, y los enteros p y q son 0. En esta realización, los compuestos de esta invención son 2-pirrolidinilmetil β-D-glucosaminida 4-fosfatos, que tienen la fórmula general (V):



(V)

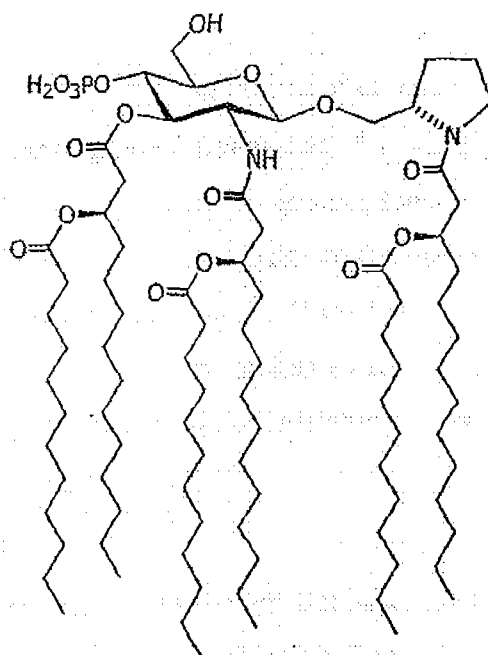
En una realización preferida de la presente invención, la configuración de los centros 3'-estereogénicos ("*1-3*") a la que están enlazados es R, Y está en la posición ecuatorial, y la stereoquímica absoluta del centro estereogénico de pirrolidina ("**") es S.

Realizaciones especialmente preferidas son N-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- (S)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-O-fosfono-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]- 3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- β-D-glucopirasonido, y sus sales farmacéuticamente aceptables, fórmula (II):



(II)

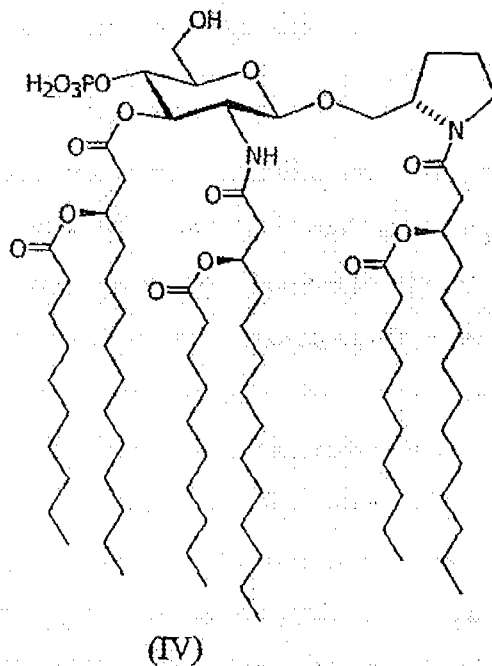
N-[(*R*)-3-dodecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-fosfono-2-[(*R*)-3-dedecanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[(*R*)-3-dodecanoiloxitetradecanoil]- β-D-glucopirasonido, y sus sales farmacéuticamente aceptables, Fórmula III:



(III)

16
16

y *N*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-fosfono-2-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]- β-*D*-glucopirasonido, y sus sales farmacéuticamente aceptables; Fórmula IV:



Preparación de los Compuestos

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse utilizando los métodos descritos en Jonson y colaboradores, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2273-2278 (1999) y PCT/WO98/5039 y sus referencias. En general, los métodos sintéticos descritos en las anteriores referencias son aplicables normalmente a la preparación de compuestos que tengan diferentes grupos acilo y sustituciones. Una persona versada en la técnica podrá apreciar que los métodos convergentes que se describen allí pueden modificarse utilizando agentes de acilación alternos, o se pueden iniciar con materiales comerciales que tengan enlazados grupos acilo adecuados.

Evaluación de los Compuestos

Los compuestos que se describen en este contexto pueden ser evaluados en una variedad de formatos de ensayo para seleccionar un compuesto que tenga un perfil farmacofórico adecuado. Por ejemplo, la Patente U.S. No. 6,013,640 describe modelos de animales adecuados para evaluar efectos cardioprotectores de los compuestos que se describen aquí. Los siguientes ejemplos también proveen ensayos para evaluar la

pirogenicidad de los compuestos objeto, y otros ensayos para evaluar los efectos proinflamatorios de los compuestos.

La presente invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos que se describen aquí en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados dependerán de la condición que se vaya a tratar junto con la vía de administración. Por lo tanto, a continuación presentamos una descripción de los vehículos junto con los métodos de uso.

Composiciones farmacéuticas y sus usos

En una realización, la presente invención provee composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El compuesto está presente en una cantidad terapéuticamente efectiva, cuya cantidad se requiere para alcanzar el efecto deseado en términos del tratamiento de una enfermedad, condición o lograr una manifestación biológica. Las composiciones farmacéuticas pueden actuar como adyuvantes cuando se co-administran con el antígeno.

Las composiciones de esta invención incluyen tanto composiciones que son formuladas para administración directa, sin dilución, de los compuestos activos a pacientes, bien sea junto con una vacuna u otro agente activo, o solos, y como composiciones más concentradas de los compuestos que pueden ser formulados para dilución posterior, de modo que se evite el despacho y/o almacenamiento de grandes cantidades de diluyente (como agua, salina o materiales acuosos). En general, las composiciones farmacéuticas de la presente invención cuya intención es que sean para administración directa o inmediata a un sujeto (es decir, sin dilución), contendrán uno o más de los compuestos, en una cantidad terapéuticamente efectiva. Esta cantidad variará tanto con base en el compuesto o compuestos terapéuticos en particular como en el efecto terapéutico deseado. Composiciones más concentradas contendrán cantidades del compuesto o compuestos de la invención según sea apropiado para dichas composiciones.

Para la preparación de composiciones farmacéuticas, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Preparaciones en forma sólida incluyen polvos, tabletas, píldoras, cápsulas, sobres, supositorios y gránulos dispersibles. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias y que también pueden actuar como diluyentes, agentes saborizantes, enlazantes, preservativos, agentes desintegrantes de tabletas, o un material encapsulante.

En polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido mezclado con un componente activo finamente dividido. En tabletas, el componente activo se mezcla con el

vehículo que tenga las propiedades enlazantes necesarias en proporciones adecuadas y compactadas en la forma y tamaño deseados.

También se pueden preparar formas sólidas de las composiciones secando por rocío las formulaciones acuosas de los adyuvantes activos (por ej: en forma de una sal) o liofilizándolas y moliéndolas con excipientes.

Vehículos adecuados para las composiciones sólidas de la invención incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de baja fundición, mantequilla de cocoa y similares. El término "preparación" incluye la formulación del compuesto activo con material encapsulante como vehículo proporcionando una cápsula en la cual el componente activo, con o sin otros vehículos, está rodeado por un vehículo, que de este modo está en asociación con el componente. Igualmente, se incluyen sobres y pastillas. Tabletas, polvos, cápsulas, píldoras, sobres y pastillas pueden utilizarse como formas de dosis sólida adecuada para administración oral.

Para la preparación de supositorios, una cera de fundición baja, tal como una mezcla de glicéridos de ácido graso o mantequilla de cocoa, se derrite primero y el componente activo es dispersado en forma homogénea, como agitando. La mezcla homogénea derretida es luego vaciada en moldes de tamaño adecuado, se deja enfriar y solidificar.

Preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo soluciones en agua o agua/propilenglicol. Para inyección parenteral, las preparaciones líquidas se pueden formar en solución en una solución de polietilenglicol acuosa. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son formuladas en una formulación de emulsión estable (por ej: emulsión agua-en-aceite o aceite-en-agua) o una formulación acuosa que preferiblemente comprenda uno o más surfactantes. En la técnica se conocen surfactantes adecuados que pueden usarse en este tipo de emulsiones. En una realización, la composición es en forma de una dispersión micelar que comprende al menos un surfactante adecuado. Los surfactantes útiles en dichas dispersiones micelares incluyen fosfolípidos. Ejemplos de fosfolípidos incluyen: diacil fosfatidil glicerol, tales como dimiristoil fosfatidil glicerol (DPMG), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) y distearoil fosfatidil glicerol (DSPG), diacil fosfatidil colinas, tales como dimiristoil fosfatidicolina (DPMC), dipalmitoil fosfatidicolina (DPPC), y distearoil fosfatidilcolina (DSPC); ácidos diacil fosfatídicos, tales como ácido dimiristoil fosfatídico (DPMA), ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPA) y ácido distearoil fosfatídico (DSPA); y diacil fosfatidil etanolaminas tales como dimiristoil fosfatidil etanolamina (DPME), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE) y distearoil fosfatidil etanolamina (DSPE). Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a derivados de etanolamina (tal como fosfatidil etanolamina como ya se dijo, o

cefalina) serina (tal como fosfatidil serina) y 3'-O-lisil glicerol (tal como 3'-O-lisil-fosfatidilglicerol).

Soluciones acuosas adecuadas para uso oral pueden prepararse disolviendo el componente activo en agua y agregando colorantes, sabores, estabilizadores y agentes espesantes adecuados, según se desee.

También se incluyen preparaciones en forma sólida cuyo propósito es que sean convertidas, poco tiempo antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para administración oral. Este tipo de formas líquidas incluye soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, agentes colorantes, saborizantes, estabilizadores, tamponadores, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, solubilizantes y similares.

Preferiblemente, la composición farmacéutica es en forma de dosis unitaria. En esta forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosis unitaria puede ser una preparación empaquetada y el empaque contener cantidades separadas de preparación, tales como tabletas, cápsulas y polvos en frascos o ampollas. También, la forma de dosis unitaria puede ser una cápsula, tableta, sobre o pastilla en sí, o puede ser el número apropiado de cualquiera de éstas en forma empacada.

Es por ello que los sistemas adyuvantes de la invención son especialmente ventajosos para hacer y utilizar la vacuna y otras composiciones inmunoestimulantes para tratar o prevenir enfermedades, al como para inducir inmunidad activa hacia antígenos en mamíferos, preferiblemente en seres humanos. La preparación de vacuna es una técnica bien desarrollada y la guía general para la preparación y formulación de las vacunas se consigue fácilmente de una variedad de fuentes. Uno de estos ejemplos es *New Trends and Development in Vaccines*, editado por Voller y colaboradores, University Park Press, Baltimore, MD, U.S.A. 1978.

En una realización ilustrativa, el antígeno en una composición de vacuna de la invención es un péptido, polipéptido o porción inmunogénica de lo mismo. Una "porción inmunogénica" tal como se expresa aquí, es una porción de una proteína que es reconocida (es decir, enlazada específicamente) por un receptor de antígeno de superficie de célula B y/o célula T. Por lo general, estas porciones inmunogénicas comprenden al menos 5 residuos de amino ácidos, más preferiblemente al menos 10, y aún más preferiblemente, al menos 20 residuos de amino ácidos de una proteína antigénica o una variante de la misma.

Por lo general, porciones inmunogénicas de polipéptidos de antígenos pueden identificarse utilizando técnicas conocidas, tales como las que se resumen en Paul,

20

Fundamental Immunology, 3 ed. 243-247 (Raven Press, 1993) y las referencias que allí se citan. Dichas técnicas incluyen seleccionar polipéptidos para la capacidad de reaccionar con anticuerpos, antisueros y/o líneas o clones de células T específicos de antígenos. Tal como se utiliza en este contexto, antisueros y anticuerpos son “específicos de antígenos” si específicamente se enlazan a un antígeno (es decir, si reaccionan con la proteína en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo, y no reaccionan de manera detectable con proteínas no asociadas). Este tipo de antisueros y anticuerpos puede prepararse como se describe aquí y utilizando técnicas conocidas. Una porción inmunogénica de una proteína es una porción que reacciona con dichos anticuerpos y/o células T a un nivel que no sea sustancialmente menor que la reactividad del polipéptido de longitud completa (por ej: en un ensayo ELISA y/o ensayo de reactividad de célula T). Este tipo de porciones inmunogénicas puede reaccionar dentro de dichos ensayos a un nivel que sea similar o mayor que la reactividad del polipéptido de longitud completa. Estas selecciones pueden hacerse utilizando métodos conocidos por las personas versadas en la técnica, tales como las descritas en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Por ejemplo, un polipéptido puede inmovilizarse en un soporte sólido y contactarse con los sueros del paciente para permitir el enlace de anticuerpos dentro de los sueros al polipéptido inmovilizado. Los sueros no enlazados pueden retirarse luego y detectar los anticuerpos enlazados, utilizando por ejemplo Proteína A rotulada I¹²⁵.

Los antígenos de péptidos y polipéptidos se preparan utilizando cualquier variedad de técnicas conocidas. Los polipéptidos recombinantes codificados por secuencias ADN pueden prepararse fácilmente de secuencias ADN aisladas utilizando cualquiera de una variedad de vectores de expresión conocidos por las personas versadas en la técnica. La expresión puede lograrse en cualquier célula anfitriona adecuada que haya sido transformada o transfectada con un vector de expresión que contenga una molécula ADN que codifique un polipéptido recombinante. Células anfitrionas adecuadas incluyen células procarióticas, levadura y células eucarióticas superiores, tales como células mamíferas y células vegetales. Preferiblemente, las células anfitrionas empleadas son *E. coli*, levadura o una línea celular mamífera tal como COS o CHO.

Porciones y otras variantes de un antígeno de proteína que tenga menos de aproximadamente 100 amino ácidos, y generalmente menos de aproximadamente 50 amino ácidos, también puede ser generado por medios sintéticos utilizando técnicas conocidas por las personas versadas en la técnica, Por ejemplo, este tipo de polipéptidos puede sintetizarse utilizando cualquier técnica comercial de fase sólida, tal como el método de síntesis de fase sólida de Merrifield, donde los amino ácidos son agregados secuencialmente a una cadena creciente de amino ácidos. Ver Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2146, 1963. El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos se consigue en el comercio de

proveedores tales como Perkin Elmer/Applied Bio Systems Division (Foster City, CA), y pueden operarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dentro de ciertas realizaciones específicas, un antígeno polipéptido utilizado en las composiciones de vacuna de la invención puede ser una proteína de fusión que comprenda dos o más polipéptidos distintos. Un socio de fusión puede, por ejemplo, ayudar a proveer epítopos T auxiliares (un socio de fusión inmunológica), preferiblemente epítopos T auxiliares reconocidos por humanos, o puede ayudar a expresar la proteína (un reforzador de expresión) en rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Algunos socios de fusión preferidos son socios de fusión inmunológica y reforzadores de expresión. Otros socios de fusión pueden seleccionarse de modo que aumenten la solubilidad de la proteína o permitan que la proteína se dirija a los compartimentos intracelulares deseados. Aún, otros socios de fusión incluyen identificadores de afinidad, los cuales facilitan la purificación de la proteína.

Las proteínas de fusión pueden prepararse generalmente utilizando técnicas estándar, incluida conjugación química. Preferiblemente, una proteína de fusión se expresa como una proteína recombinante, permitiendo la producción de niveles aumentados, con respecto a una proteína no fusionada, en un sistema de expresión. En resumen, las secuencias ADN que codifican los componentes polipéptidos pueden ensamblarse por separado, y ligarse en un vector de expresión adecuado. La terminal 3' de la secuencia ADN que codifica un componente polipéptido, se liga, con o sin un enlazador péptido, a la terminal 5' de una secuencia ADN que codifique el segundo componente polipéptido de modo que los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Esto permite el traslado a una sola proteína de fusión que conserva la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes. Se puede emplear una secuencia enlazadora de péptido para separar el primero y el segundo componentes polipéptidos por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se doble en sus estructuras secundarias y terciarias. Esta secuencia enlazadora de péptidos es incorporada en la proteína de fusión utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica. Secuencias enlazadoras de péptidos adecuadas se pueden escoger con base en los siguientes factores: (1) su capacidad de adoptar una conformación flexible extendida; (2) su incapacidad de adoptar una segunda estructura que pueda interactuar con epítopos funcionales en el primero y segundo polipéptidos; y (3) la falta de residuos hidrofóbicos o cargados que puedan reaccionar con los epítopos funcionales polipéptidos. Secuencias preferidas de enlazadores de péptidos contienen residuos Gly, Asn y Ser. Otros amino ácidos casi neutros, tales como Thr y Ala también se pueden utilizar en la secuencia enlazadora. Secuencias de amino ácidos que se pueden usar como enlazadoras incluyen las descritas en Baratea y colaboradores, *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262, 1986; Patente U.S. No. 4,935,233 y Patente U.S. No.

4,751,180. Generalmente, la secuencia enlazadora puede tener una longitud de entre 1 y 50 amino ácidos. Las secuencias enlazadoras no se requieren cuando el primero y segundo polipéptidos tienen regiones amino ácidas no esenciales de terminal N que se pueden usar para separar los dominios funcionales y prevenir interferencia estérica.

Dentro de las realizaciones preferidas, un socio de fusión inmunológica se deriva de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gram negativa de influenza *Haemophilus B* (WO 91/18926). Preferiblemente, un derivado de proteína D comprende aproximadamente la primera tercera parte de la proteína (por ej: el primer terminal N de 100-110 amino ácidos), y un derivado de la proteína D puede estar lipidado. Dentro de ciertas realizaciones preferidas, los primeros 109 residuos del socio de fusión de la Lipoproteína D se incluyen en el terminal N para proveer el polipéptido con epítomos exógenos de células T adicionales y para aumentar el nivel de expresión en *E. coli* (funcionando de este modo como un reforzador de expresión). La cola lipida garantiza una presentación óptima del antígeno a células que presentan antígenos. Otros socios de fusión incluyen proteína no estructural del virus de influenza, NS1 (hemaglutinina). Típicamente se utilizan 81 amino ácidos de terminal N, aunque también se pueden utilizar diferentes fragmentos que incluyan epítomos T auxiliares.

En otra realización, el socio de fusión inmunológica es la proteína conocida como LYTA, o una porción de la misma (preferiblemente una porción de terminal C). LYTA se deriva de *Streptococcus pneumoniae*, la cual sintetiza una amidasa N-acetil-L-alanina conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; *Gene 43*:265-292, 1986). LYTA es una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en el peptidoglicano primario. El dominio de terminal C de la proteína LYTA es responsable por la afinidad a colina o a algunos análogos de colina tal como DEAE. Esta propiedad ha sido explotada para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA de *E. Coli* útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en el terminal amino (ver *Biotechnology 10*:795-798, 1992). Dentro de una realización preferida, se puede incorporar una porción repetida de LYTA en una proteína de fusión. Una porción repetida se encuentra en la región de terminal C comenzando en el residuo 178. Una porción repetida especialmente preferida incluye residuos 188-305.

En otra realización de la invención, el sistema adyuvante que se describe aquí, se usa en la preparación de composiciones de vacuna basadas en ADN. Vacunas ilustrativas de este tipo contienen ADN que codifica uno o más antígenos polipéptidos, de modo que el antígeno sea generado *in situ*. El ADN puede estar presente dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de entrega conocidos por las personas versadas en la técnica, incluidos

23

sistemas de expresión de ácido nucléico, sistemas de expresión bacterianos o virales. En la técnica se conocen varias técnicas de entrega de genes, tales como las que describe Rolland en *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15:143-198, 1998 y las referencias que se citan allí. Sistemas apropiados de expresión de ácido nucléico contienen las secuencias ADN necesarias para expresión en el paciente (tal como un promotor adecuado y una señal de terminación). Sistemas de entrega bacteriana incluyen la administración de una bacteria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que expresa una porción inmunogénica del polipéptido en su superficie celular o secreta dicho epítipo. En una realización preferida, el ADN se introduce utilizando un sistema de expresión viral (por ej. vaccinia u otros virus de viruela, retrovirus o adenovirus), lo cual puede implicar el uso de un virus competente de replicación no patogénico (defectuoso). Sistemas adecuados se divulgan, por ejemplo, en Fisher-Hoch y colaboradores, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:317-31, 1989; Flexner y colaboradores, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86-103, 1989; Flexner y colaboradores, *Vaccine* 8:17-21, 1990; Patentes US Nos. 4,603, 112, 4,769,330 y 5,017,487; WO 89/01973; Patente US No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Rosenfeld y colaboradores, *Science* 252:431-434, 1991; Kolls y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994; Kass-Eisler y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:11498-11502, 1993; Guzman y colaboradores, *Circulation* 88:2838-2848, 1993; y Guzman y colaboradores, *Cir. Res.* 73:1202-1207, 1993. Las técnicas para incorporar ADN en este tipo de sistemas de expresión son bien conocidas para las personas versadas en la técnica.

El ADN también puede estar "desnudo", tal como se describe por ejemplo, en Ulmer y colaboradores, *Science* 259:1745-1749, 1993 y revisión por Cohen, *Science* 259:1691-1692, 1993. La ingestión del ADN desnudo puede aumentarse recubriendo el ADN en perlas biodegradables, las cuales son transportadas eficientemente a las células. Será aparente que una composición farmacéutica de la invención pueda comprender un polinucleótido y un componente de proteína si se desea.

También será aparente que una vacuna pueda contener sales farmacéuticamente aceptables de los antígenos del polinucleótido, polipéptido y/o carbohidrato deseado. Por ejemplo, este tipo de sales se pueden preparar de bases no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, incluidas bases orgánicas (por ej: sales de aminas primarias, secundarias y terciarias y amino ácidos básicos) y bases inorgánicas (por ej: sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio).

El sistema adyuvante de la presente invención exhibe fuertes efectos adyuvantes cuando se administra en un amplio rango de dosis y en un amplio rango de proporciones.

Generalmente, la cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna es seleccionada como una cantidad que induzca una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios

considerablemente adversos en las vacunas típicas. Esta cantidad podrá variar dependiendo del inmunógeno específico que se emplee y la forma como se presente. Por lo general, se espera que cada dosis comprenda entre 1-1000 μg de proteína, más típicamente, aproximadamente entre 2 y 100 μg , preferiblemente entre 5 y 50 μg . Naturalmente, la dosis administrada puede depender de la edad, peso, clase de tratamiento concurrente, si lo hubiere, y la naturaleza del antígeno administrado.

La actividad inmunogénica de una cantidad dada de una composición de vacuna de la presente invención puede determinarse fácilmente, por ejemplo, monitoreando el aumento de título del anticuerpo contra el antígeno utilizado en la composición de vacuna (Dalsgard, K. *Acta Veterinaria Scandinavica* 69:1-40 (1978)). Otro método común implica inyectar a ratones CD-1 por vía intradérmica, varias cantidades de una composición de vacuna, luego cultivar el suero de los ratones y probar la presencia de anticuerpos anti-inmunogénicos, por ej. por ELISA. Estos y otros enfoques similares serán aparentes para la persona versada en la técnica.

El antígeno puede derivarse y/o aislarse esencialmente de cualquier fuente deseada dependiendo de la enfermedad infecciosa, la enfermedad autoinmune, la condición, cáncer, patógeno, o una enfermedad que vaya a ser tratada con una determinada composición de vacuna. A modo de ilustración, los antígenos pueden derivarse de fuentes virales, tales como virus de influenza, virus de leucemia felina, virus de inmunodeficiencia felina, VIH-1 VIH-2 Humano, virus de Herpes Simplex tipo 2, citomegalovirus Humano, Hepatitis A, B, C o E, virus Sincitial Respiratorio, virus de papiloma humano, rabia, sarampión, o virus de la enfermedad de cascos y boca. Antígenos ilustrativos también pueden derivarse de fuentes bacterianas, tales como ántrax, difteria, enfermedad de Lyme, malaria, tuberculosis, Leishmaniasis, *T. cruzi*, *Ehrlichia*, *Candida*, etc. o de protozoarios tales como *Babesiosis Bovis* o *Plasmodium*. Típicamente, los antígenos comprenden amino ácidos naturales o sintéticos, por ej. en la forma de péptidos, polipéptidos o proteínas, pueden comprender polisacáridos, o pueden ser mezclas de lo mismo. Los antígenos ilustrativos pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse por medio de síntesis de fase sólida, o se pueden obtener por medio de técnicas ADN recombinantes.

En otra realización, los antígenos tumorales se usan en las composiciones de vacuna de la presente invención para la profilaxis y/o terapia de cáncer. Frecuentemente, las células cancerígenas tienen antígenos distintivos en sus superficies, tales como factor de crecimiento epidérmico truncado, proteína de enlace de folato, mucinas epiteliales, melanoferrina, antígeno carciembriónico, antígeno de membrana específica de próstata, HER2-neu, los cuales son candidatos para uso en vacunas de cáncer terapéuticas. Debido a que los antígenos tumorales son normales o relacionados con componentes normales del cuerpo, con frecuencia, el sistema inmune no monta una respuesta inmune efectiva contra

esos antígenos para destruir las células tumorales. Para obtener este tipo de respuesta, se pueden utilizar los sistemas adyuvantes que se describen aquí. Como resultado, las proteínas exógenas pueden ingresar al trayecto para procesar antígenos endógenos, llevando a la producción de células T citolíticas o citotóxicas (CTL). Este efecto adyuvante facilita la producción de CTL específicos de antígenos que buscan y destruyen esas células tumorales llevando en su superficie el(los) antígeno(s) tumoral(es) para inmunización. Tipos de cáncer ilustrativos para los que se pueda usar este enfoque incluyen cáncer de próstata, colon, seno, ovario, páncreas, cerebro, cabeza y cuello, melanoma, leucemia, linfoma, etc.

En otra realización de la invención, el sistema adyuvante de la presente invención puede administrarse solo, es decir, sin un antígeno co-administrado, para potenciar el sistema inmune para el tratamiento de enfermedades infecciosas crónicas, especialmente en pacientes inmuno-comprometidos. Ejemplos ilustrativos de enfermedades infecciosas para las cuales se puede emplear este enfoque para tratamiento terapéutico o profiláctico pueden encontrarse en la Patente U.S. No. 5,508,310. La potenciación del sistema inmune de este modo, también puede ser útil como una medida preventiva para limitar los riesgos de infecciones nosocómicas y/o posteriores a cirugía.

En otra realización, el antígeno presente en las composiciones de vacuna no es un antígeno extraño, sino un auto-antígeno, por ejemplo, la composición de la vacuna está dirigida a una enfermedad autoinmune tal como diabetes tipo 1, enfermedades convencionales autoinmunes específicas de órganos, enfermedades neurológicas, enfermedades reumáticas, soriasis, enfermedades de tejidos conectores, citopenias autoinmunes y otras enfermedades autoinmunes. Dicha autoinmunidad convencional específica de órganos puede incluir tiroiditis (Graves+Hashimoto), gastritis, adrenalitis (Addison) ovaritis, cirrosis biliar primaria, *myasthenia gravis*, falla gonadal, hipoparatiroidismo, alopecia, síndrome de mala absorción, anemia perniciosa, hepatitis, enfermedades de anticuerpos antirreceptores y vitiligo. Este tipo de enfermedades neurológicas puede incluir esquizofrenia, mal de Alzheimer, depresión, hipopituitarismo, *diabetes insipidus*, síndrome de sicca y esclerosis múltiple. Este tipo de enfermedades reumáticas/de tejidos conectores puede incluir artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE) o Lupus, escleroderma, polimiositis, enfermedad del intestino inflamado, dermatomiositis, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, vasculitis, artritis soriática, dermatitis soriática exfoliativa, *pemphigus vulgaris*, síndrome de Sjogren. Otras enfermedades autoinmunes asociadas pueden incluir uveítis autoinmune, glomerulonefritis, síndrome de cardiomiopatía post-infarto del miocardio, hem siderosis pulmonar, amiloidosis, sarcoidosis, estomatitis aftosa, y otras enfermedades inmunes relacionadas, tales como se presentan aquí y se conocen en la técnica.

28
16

Si bien en las composiciones de vacuna de esta invención se puede emplear cualquier vehículo adecuado conocido para la persona versada en la técnica, típicamente, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración deseado. Las composiciones de la presente invención pueden formularse por cualquier modo de administración adecuado, incluida por ejemplo, administración tópica, oral, nasal intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo comprenderá a menudo, agua, salina, alcohol, una grasa, una cera o un tamponador. Para administración oral, se usan a menudo los anteriores vehículos, o también se puede emplear un vehículo sólido tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sucrosa y carbonato de magnesio. Como vehículos para las composiciones de esta invención, también se pueden emplear microesferas biodegradables (por ej: polilactato poliglicolato). Microesferas biodegradables adecuadas se divulgan, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,344 y 5,942,252, cuyo contenido se incorpora por referencia en este texto en su totalidad. También son adecuados sistemas portadores de proteína núcleo de hepatitis B modificados, tales como los que se describen en WO/99 40934 y sus referencias, todas incorporadas en este contexto por referencia. También se puede emplear un vehículo que comprenda complejos de proteína en partículas, tales como los que se describen en la Patente U.S. No. 5,928,647, la cual se incorpora en este contexto en su totalidad, que pueden inducir respuestas citotóxicas de linfocito T restringidas de clase I en un anfitrión.

En una realización ilustrativa, las formulaciones de vacuna son administradas a la mucosa, en particular a la cavidad oral, y preferiblemente a un sitio sublingual, para provocar una respuesta inmune. La administración por la cavidad oral puede preferirse en muchos casos a la entrega parenteral tradicional, debido a la facilidad y conveniencia ofrecidas por las técnicas de administración no invasivas. Además, este enfoque provee también un medio para provocar inmunidad mucosa, que en ocasiones puede ser difícil de lograr con la entrega parenteral tradicional, y puede proveer protección contra patógenos y/o alérgenos en el aire. Una ventaja adicional de la administración por la cavidad oral es que el cumplimiento del paciente se puede mejorar con entrega de vacuna sublingual, especialmente para aplicaciones pediátricas o para aplicaciones que tradicionalmente requieran numerosas inyecciones durante un periodo prolongado, tales como con terapias de desensibilización de alergia.

Las composiciones de vacuna también pueden comprender tamponadores (por ej: salina tamponada neutra, salina tamponada de fosfato o tamponadores de fosfato sin salina), carbohidratos (por ej: glucosa, manosa, sucrosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o amino ácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostatos, agentes de quelación tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (por ej: hidróxido de aluminio),

solos que hacen la formulación isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un recipiente, agentes de suspensión, agentes espesadores y/o preservativos. Alternativamente, las composiciones de la presente invención pueden formularse como un liofilizado. Las composiciones también pueden ser encapsuladas con liposomas utilizando tecnología reconocida.

Por lo tanto, en una realización, las composiciones de vacuna son formulaciones acuosas que comprenden una cantidad efectiva de uno o más surfactantes. Por ejemplo, la composición puede ser en forma de una dispersión micelar que comprende al menos un surfactante adecuado, por ej: un surfactante fosfolípido. Ejemplos ilustrativos de fosfolípidos incluyen diacil fosfatidil glicerol, tales como dimiristoil fosfatidil glicerol (DPMG), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) y distearoil fosfatidil glicerol (DSPG), diacil fosfatidil colinas, tales como dimiristoil fosfatidicolina (DPMC), dipalmitoil fosfatidicolina (DPPC), y distearoil fosfatidicolina (DSPC); ácidos diacil fosfatídicos, tales como ácido dimiristoil fosfatídico (DPMA), ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPA) y ácido distearoil fosfatídico (DSPA); y diacil fosfatidil etanolaminas tales como dimiristoil fosfatidil etanolamina (DPME), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE) y distearoil fosfatidil etanolamina (DSPE).

Típicamente, una razón molar surfactante:adyuvantes en una formulación acuosa será entre 10:1 y 1:10, más típicamente entre 5:1 y 1:5; sin embargo, cualquier cantidad efectiva de surfactante se puede utilizar en una formulación acuosa que mejor se adapte a los objetivos de interés específicos.

En otra realización, la composición es una emulsión, tal como una emulsión agua-en-aceite o aceite-en-agua. Las personas versadas en la técnica conocen generalmente este tipo de emulsiones.

El sistema adyuvante de la presente invención puede emplearse como el único sistema adyuvante, o alternativamente, puede administrarse junto con otros adyuvantes o inmunoefectores. A modo de ilustración, estos adyuvantes pueden incluir adyuvantes basados en aceite, (por ejemplo, los Completos e Incompletos de Freund), liposomas, sales minerales (por ej: $\text{AlK}((\text{SO}_4)_2)$, $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$, sílice, alumbre, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, caolín y carbono), polinucleótidos (por ejemplo, poli ácidos IC y AU), polímeros (por ej: polímeros de bloque no iónicos, polifosfacenos, cianoacrilatos, polimerasa (DL-lacturo-co-glicósido), entre otros, y ciertas sustancias naturales (por ej: lípido A y sus derivados, cera D de tuberculosis *Mycobacterium*, así como sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertusis*, y miembros del gen *Brucilla*), albúmina de suero bovino, difterotoxina, toxoide tetánico, edestina, hemocianina de lapa de un ojo, Toxina A pseudomonal, coleragenoide, toxina de cólera, toxina de pertusis, proteínas virales y proteínas eucarióticas tales como interferones, interleuquinas o factor

28 28

de necrosis tumoral. Estas proteínas se pueden obtener de fuentes naturales o recombinantes de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Cuando estas proteínas se obtienen de fuentes recombinantes, el adyuvante puede comprender un fragmento de proteína que comprende al menos la porción inmonoestimuladora de la molécula. Otras macromoléculas inmunoestimuladoras conocidas que se pueden usar en la práctica de la invención incluyen, más no se limitan a polisacáridos, tARN, polímeros sintéticos no metabolizables tales como polivinilamina, ácido polimetacrílico, polivinilpirrolidona, policondensados combinados (con peso molecular relativamente alto) de 4',4'-diaminodifenilmetano-3,3'-ácido dicarboxílico y 4-nitro-2-ácido aminobenzóico (Ver Sela, M., *Science* 166:1365-1374 (1969)) o glicolípidos, lípidos o carbohidratos.

En una realización, el sistema adyuvante se diseña preferiblemente para inducir una respuesta inmune, predominantemente del tipo Th1. Altos niveles de citoquinas tipo Th1 (por ej: IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno administrado. Por el contrario, altos niveles de citoquinas tipo Th2 (por ej: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer respuestas humorales inmunes. Luego de la aplicación de la vacuna tal como se presenta aquí, un paciente soportará una respuesta inmune que incluya respuestas tipo Th1 y Th2. Dentro de una realización preferida en la cual la respuesta sea predominantemente del tipo Th1, el nivel de citoquinas tipo Th1 aumentará considerablemente más que el nivel de citoquinas tipo Th2. Los niveles de estas citoquinas pueden evaluarse fácilmente mediante ensayos estándar. Para un análisis de las familias de citoquinas, ver Mosmann y Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Por ejemplo, adyuvantes adicionales para provocar una respuesta predominantemente del tipo Th-1 incluyen por ejemplo, una combinación de lípido A monofosforilo, tal como lípido A monofosforilo 3-de-O-acilado (3D-MPL), junto con una sal de aluminio. Los adyuvantes MPL se consiguen de Corixa Corporation (Seattle, WA; ver Patentes U.S. Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los cuales el dinucleótido CpG no es metilado) también inducen una respuesta predominantemente Th1. Este tipo de oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en WO 96/02555, WO 99/33488 y en las Patentes U.S. Nos. 6,008,200 y 5,856,462. Secuencias ADN inmunoestimuladoras también se describen, por ejemplo por Sato y colaboradores, *Science* 273:352, 1996. Otros adyuvantes ilustrativos que se pueden incluir en las composiciones de vacuna incluyen Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, EUA), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), adyuvante DetoxTM (Corixa, Hamilton, MT).

Las composiciones que se describen aquí pueden ser administradas como parte de una formulación de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula,

20/7/9

esponja o gel (compuesta de polisacáridos, por ejemplo) que efectúe una liberación lenta del compuesto luego de la administración) Generalmente, estas formulaciones pueden prepararse mediante el uso de tecnología conocida (*ver por ej.*: Coombes y colaboradores, *Vaccine* 14:1429-1438, 1996) y administradas por ejemplo, por implantación oral, rectal o subcutánea, o por implantación en el sitio objetivo deseado. Las formulaciones de liberación sostenida pueden contener un polipéptido, un polinucleótido o un anticuerpo disperso en una matriz portadora y/o estar contenidas dentro de un reservorio rodeados por una membrana controladora de tasa. Los portadores o vehículos para uso dentro de dichas formulaciones son biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferiblemente, la formulación provee un nivel relativamente constante de liberación del componente activo. Estos vehículos incluyen micropartículas de poli(lacturo-co-glicolido), poliacrilato, látex, almidón, celulosa, dextrana y similares. Otros vehículos de liberación demorada incluyen biovectores supramoleculares, los cuales comprenden un núcleo hidrofílico no líquido (por ej: un polisacárido de enlace cruzado u oligosacárido), y opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifílico, tal como un fosfolípido (*ver por ej.*: Patente U.S. No, 5,121,254 y solicitudes PCT WO 94/20078, WO 94/23701 y WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenido en una formulación de liberación demorada variará según el lugar de implantación, la tasa y la duración esperada de la liberación y la naturaleza de la condición que se vaya a tratar o prevenir.

En las composiciones farmacéuticas y vacunas se puede emplear cualquier variedad de vehículos de entrega conocidos con el fin de facilitar la producción de una respuesta inmune específica de antígenos que identifique las células. Los vehículos de entrega incluyen células que presentan antígenos (ACP), tales como células dendríticas, macrófagos, células B, monocitos y otras células que pueden diseñarse para que sean APC eficientes. Estas células pueden, pero no requieren, ser modificadas genéticamente para aumentar la capacidad de presentación del antígeno, mejorar la activación y/o mantenimiento de la respuesta de célula T, tener efectos anti-objetivo *per se* y/o ser inmunológicamente compatibles con el receptor (es decir, un haplotipo HLA apareado). Generalmente, los APC pueden estar aislados de cualquiera de una variedad de fluidos y órganos biológicos, incluidos tejidos tumorales y peritumorales, y pueden ser células autólogas, alogénicas, singénicas o xenogénicas.

Algunas realizaciones preferidas de la presente invención utilizan células dendríticas o progenitores de las mismas como células que presentan antígenos. Las células dendríticas son APC altamente potentes (Banchereau y Steinman, *Nature* 392:245-251, 1998) y deben demostrarse ser efectivas como un adyuvante fisiológico para provocar una inmunidad antitumoral profiláctica o terapéutica (*ver* Timmerman y Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529, 1999) En general, las células dendríticas pueden identificarse con base en su forma típica (esteladas *in situ*, marcadas con procesos citoplásmicos (dendritas) visibles *in vitro*), su

capacidad de ocupación, procesar y presentar antígenos con alta eficiencia y su capacidad para activar respuestas de célula T crédulas. Obviamente, las células dendríticas pueden diseñarse para expresar receptores o ligandos específicos de superficie celular que comúnmente no se encuentran en células dendríticas *in vivo* o *ex vivo*, y esta invención contempla este tipo de células dendríticas. Como alternativa a las células dendríticas, en una vacuna se pueden utilizar células dendríticas de vesículos secretados cargados con antígeno (llamadas exosomas) (ver Zitvogel y colaboradores, *Nature Med* 4:594-600, 1998).

Las células dendríticas y sus progenitores se pueden obtener de sangre periférica, medula ósea, células de infiltración tumoral, células de infiltración de tejidos peritumorales, nodos linfáticos, bazo, piel, sangre del cordón umbilical o cualquier otro tejido o fluido apropiado. Por ejemplo, las células dendríticas pueden diferenciarse *ex vivo* agregando una combinación de citoquinas tales como GM-CSF, IL-4, IL-13 y/o TNF α a cultivos de monolitos cultivados de sangre periférica. Alternativamente, las células positivas CD34 cultivadas de sangre periférica, cordón umbilical o medula ósea se pueden diferenciar en células dendríticas agregando al cultivo combinaciones medias de GM-CSF, IL-3, TNF α , ligando CD40, PS, ligando flt3 y/u otros compuestos que induzcan diferenciación, maduración y proliferación de células dendríticas.

Las células dendríticas se categorizar convenientemente como células "inmaduras" y "maduras", lo cual permite una forma simple de discriminar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no debe interpretarse como que excluye todas las etapas intermedias posibles de diferenciación. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan como APC con alta capacidad de ingestión y procesamiento de antígenos, lo cual se correlaciona con la alta expresión de Fc γ y receptor de manosa. El fenotipo maduro se caracteriza típicamente por una expresión más baja de estos marcadores, pero una alta expresión de moléculas de superficie celular responsables por la activación de células T, tales como moléculas de adhesión, MHC de clase I y clase II (por ej: CD54 y CD11) y moléculas costimulatorias (por ej: CD40, CD80, CD86 y 4-1BB).

Generalmente, los APC pueden transfectarse con un polinucleótido que codifique un polipéptido de antígeno (o porción o variante del mismo) de modo que el polipéptido de antígeno o una porción inmunogénica del mismo, se exprese en la superficie celular. Dicha transfección puede tener lugar *ex vivo*, y una composición o vacuna que comprenda dichas células transfectadas y los adyuvantes que se describen aquí, pueden usarse luego para propósitos terapéuticos. Alternativamente, un vehículo de entrega de genes que identifiquen una célula dendrítica u otra célula que presente antígenos, puede administrarse a un paciente, resultando en transfección que se haga *in vivo*. La transfección *in vivo* y *ex vivo* de células dendríticas, por ejemplo, puede hacerse generalmente utilizando cualquier

método conocido en la técnica, tales como los que se describen en WO 97/24447 o el enfoque de pistola de genes descrito por Mahvi y colaboradores, *Immunology and Cell Biology* 75:456-460, 1997. El cargue de antígenos de las células dendríticas puede lograrse incubando células dendríticas o células progenitoras con el polipéptido del antígeno, ADN (desnudo o dentro de un vector plásmido) o ARN; o con bacterias o virus recombinantes que expresen antígenos (por ej: vaccini, pustulación avícola, vectores de adenovirus o lentivirus). Antes de cargar, el polipéptido puede conjugarse a un socio inmunológico que provea ayuda de célula T (por ej: una molécula portadora). Alternativamente, una célula dendrítica puede pulsarse con un socio inmunológico no conjugado, separadamente o en presencia del polipéptido.

Tratamiento de trastornos asociados con óxido nítrico

En un aspecto, la presente invención provee métodos para el tratamiento de enfermedades o condiciones mediadas por óxido nítrico, en particular isquemia o lesión por reperfusión. Los métodos comprenden administrar a un sujeto que requiera dicho tratamiento, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención. Generalmente, se acuerda que los inductores de la transcripción del gen iNOS y síntesis de proteínas son proinflamatorios y por lo tanto, son algo "tóxicos" o son poco tolerados en animales y humanos. La endotoxina (LPS) y citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, TNF- α e IFN- γ son inductores conocidos de iNOS. Todos son inherentemente tóxicos y capaces de inducir una respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de dolor respiratorio en adultos, falla de órganos múltiples y colapso cardiovascular cuando son administrados a animales.

Investigación de la actividad cardioprotectora del inmunoestimulante MPL® demostró que la inducción de sintasas de óxido nítrico (iNOS) es importante en el efecto cardioprotector retardado del compuesto. Adicionalmente, las señales de óxido nítrico (NO) presumiblemente a través de grupos constitutivos de NOS, es importante en el efecto cardioprotector agudo del compuesto. En vista de la actividad residual como endotóxica del inmunoestimulante MPL®, no sorprende que el compuesto pudiera inducir señales de óxido nítrico. Más aún, las señales de óxido nítrico se han sugerido como un posible trayecto mediante el cual el preconditionamiento isquémico provoca cardioprotección. Esta observación, junto con el hecho de que los donantes de óxido nítrico son cardioprotectores, provee también soporte al trayecto NOS/NO como ruta para la cardioprotección del inmunoestimulante MPL®.

Los compuestos de la presente invención son útiles en métodos para el tratamiento de enfermedades o condiciones moduladas o aliviadas por óxido nítrico, en particular isquemia y lesión por repercusión (ver Solicitud de Patente U.S. Serie No. 09/808669,

radicada el 14 de marzo de 2001, descripción de propiedades cardioprotectoras de fosfatos de aminoalquil glucosaminida y métodos para probar propiedades cardioprotectoras).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar, más no para limitar, la invención descrita.

Ejemplo 1 - Preparación de Sal Trietilamonio *N*-[(*R*)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-Deoxi-4-*O*-fosfono-2-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosido; sal trietilamonio del compuesto de la Fórmula (II)

(1a) A una solución de 2-deoxi-4-*O*-difenilfosfono-3-*O*-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-6-*O*-(2,2,2-tricloro 1,1-dimetiletoxicarbonil)-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-β-D-glucopiranosil bromuro (1,05 g, 0,81 mmol) en 1,2-dicloroetano seco (10 mL) se le agregaron cedazos moleculares 4 Å (0,5 g), CaSO₄ anhidro (2,2 g, 16 mmol) y *N*-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinemetanol (0,40 g, 0,75 mmol). La mezcla que resultó se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, se trató con Hg(CN)₂ (1,02 g, 4,05 mmol) y se calentó a reflujo durante 16 horas en la oscuridad. La mezcla de la reacción enfriada se diluyó con CH₂Cl₂ y se filtró. El filtrado se lavó con 1 N aq KI, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La cromatografía instantánea en gel de sílice (elusión gradiente, 15→20% (EtOAc/hexanos) dio 0,605 g (43%) de *N*-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-difenilfosfono-3-*O*-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-6-*O*-(2,2,2-tricloro-1,1-dimetiletoxicarbonilo)-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-β-D-glucopiranosido como un sólido amorfo.

(1b) Una solución del compuesto preparado según (1 a) anterior (0,50 g, 0,29 mmol) en AcOH (10 mL) a 60°C se trató con polvo de cinc (0,98 g, 15 mmol) en tres porciones iguales durante un periodo de 1 hora. La mezcla de la reacción enfriada se sonicó, se filtró a través de un paño de Celita, y se concentró. El residuo resultante se dividió entre CH₂Cl₂ y NaHCO₃ acuoso saturado y se separaron las capas. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. Se obtuvo una solución del alcohol amino crudo y el ácido (*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoico (0,155 g, 0,34 mmol) en CH₂Cl₂ (3,5 mL) se agitó con cedazos moleculares 4 Å (0,25 g) durante 0,5 hora y luego se trató con 2-etoxi-1-etoxicarbonilo-1,2-dihidroquinolina (0,11 g, 0,44 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas, se filtró a través de Celita, y se concentró. Cromatografía instantánea en gel de sílice con EtOAc/hexanos al 50% produjo 0,355 g (68%) de *N*-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-

33

difenilfosfono-2-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosido como un jarabe incoloro.

(1c) Se hidrogenó una solución del compuesto preparado en (1b) anterior (0,300 g, 0,166 mmol) en una mezcla de AcOH (1 mL) y tetrahidrofurano (9mL) en presencia de PtO₂ (0,15 g) a temperatura ambiente y 70 psig durante 18 horas. Se recogió el catalizador y se lavó con 2:1 CHCl₃-MeOH y se concentró el producto filtrado y lavado. Cromatografía instantánea en gel de sílice con CHCl₃-MeOH-H₂O-Et₃N (90:10:0,5:0,5) dio un producto parcialmente purificado el cual se disolvió en hielo-frío 2:1 CHCl₃-MeOH (30 mL) y se lavó con hielo-frío (0,1 N aq HCl (12mL). La fase orgánica se filtró y liofilizó de 2% Et₃N acuoso (3mL, libre de pirógeno) para dar 0,228 g (79%) de sal trietilamonio de *N*-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-fosfono-2-[(*R*)-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[(*R*)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosido como un polvo incoloro: mp 67-70 °C; IR (película) 3306, 2955, 2923, 2853, 1736, 1732, 1644, 1548, 1466, 1378, 1245, 1177, 1110, 1053, 844 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃-CD₃-OD) δ 0,88 (m, 18 H), 1,0-1,2,05 (mH), 2,20-2,70 (m, 12 H), 3,06 (q, 6 H, *J* = 7,2 Hz), 3,3-3,25 (mH), 4,52 (d, 1 H, *J* = 8 Hz), 5,05-5,28 (m, 4 H), 7,44 (d, 1H, *J* = 9 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 173,3, 173,0, 170,3, 169,6, 168,6, 101,8 100,4 75,8, 72,5, 72,4, 72,4, 70,9, 70,8, 70,3, 70,2, 69,9, 69,3, 67,9, 66,6, 56,5, 56,3, 54,5, 47,4, 45,8, 44,6, 41,4, 41,0, 39,7, 39,2, 39,0, 34,5, 34,3, 34,1, 32,0, 29,7, 29,4, 28,1, 27,3 25,7, 25,3, 25,2, 25,1, 24,0, 22,7, 21,6, 14,1, 8,6.

Se calculó anal. para C₁₀₁H₁₉₄N₃O₁₇P · H₂O: C, 68,47; H, 11,15; N, 2,37; P, 1,75.
Se encontró: C, 68,79; H, 11,00; N, 2,24; P, 1,97.

Ejemplo 2: Preparación de Sal Trietilamonio *N*-[(*R*)-3-Dodecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-Deoxi-4-*O*-fosfono-2-[(*R*)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[(*R*)-3-dodecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosido; sal trietilamonio del Compuesto (III)

(2a) A una solución de 2-deoxi-4-*O*-difenilfosfono-3-*O*-[(*R*)-3-dodecanoiloxitetradecanoil]-6-*O*-(2,2,2-tricloro 1,1-dimetiletoxycarbonil)-2-(2,2,2-tricloroetoxycarbonilamino)-α-D-glucopiranosil bromuro (1,60 g, 1,27 mmol) en 1,2-dicloroetano seco (3,2 mL) se le agregaron cedazos moleculares 4 Å (0,6 g), CaSO₄ anhidro (1,0 g, 7,3 mmol) y *N*-[(*R*)-3-dodecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinemetanol (0,58 g, 1,14 mmol). La mezcla que resultó se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, se trató con Hg(CN)₂ (0,58 g 2,3 mmol) y se calentó a reflujo durante 6 horas en la oscuridad. La mezcla de la reacción enfriada se diluyó con CH₂Cl₂ y se filtró a través de un lecho de Celita. El producto filtrado se lavó con 1 N ac KI, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La cromatografía instantánea en gel de sílice (elución gradiente, 25→35%

25

(EtOAc/hexanos) produjo 1,72 g (82%) de *N*-[*(R)*-3-dodecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-difenilfosfono-3-*O*-[*(R)*-3-dodecanoiloxitetradecanoil]-6-*O*-(2,2,2-tricloro-1,1-dimetiletoxicarbonilo)-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- β -D-glucopiranosido como un aceite incoloro.

(2b) Una solución del compuesto preparado según (2a) anterior (1,58 g, 0,806 mmol) en AcOH (10 mL) a 60°C se trató con polvo de cinc (2,6 g, 40 mmol) en tres porciones iguales durante un periodo de 1 hora. La mezcla de la reacción enfriada se sonicó, se filtró a través de un paño de Celita, y se concentró. El residuo resultante se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ acuoso saturado y se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dar 1,3 g de un sólido blanco. Se obtuvo una solución del alcohol amino crudo y el ácido (*R*)-3-dodecanoiloxitetradecanoico (0,45 g, 1,05 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) se trató con 2-etoxi-1-etoxicarbonilo-1,2-dihidroquinolina (0,30 g, 1,21 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró. Cromatografía instantánea en gel de sílice con 40→50% EtOAc/hexanos produjo 0,89 g (56%) de *N*-[*(R)*-3-dodecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-difenilfosfono-2-[*(R)*-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[*(R)*-3-dodecanoiloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosido como una espuma blanca.

(2c) Se hidrogenó una solución del compuesto preparado en (2b) anterior (0,75 g, 0,44 mmol) en una mezcla de AcOH (4,5 mL) y tetrahydrofurano (45 mL) en presencia de PtO₂ (0,45 g) a temperatura ambiente y 70 psig durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó con 2:1 CHCl₃-MeOH (35 mL) y se sonicó brevemente. Se recogió el catalizador y se lavó con 2:1 CHCl₃-MeOH y se concentró el producto combinado filtrado y lavado. Cromatografía instantánea en gel de sílice con CHCl₃-MeOH-H₂O-Et₃N (elusión gradiente 96:4:0,3:0,3→90:10:0,5:0,5) dio un producto parcialmente purificado (0,51 g) el cual se disolvió en hielo-frío 2:1 CHCl₃-MeOH (50 mL) y se lavó con hielo-frío (0,1 N aq HCl (20 mL)). La fase orgánica se filtró y se concentró. La cera blanca resultante se liofilizó en Et₃N ac. Al 2% (70 mL, libre de pirógenos) para dar 0,54 g (78%) de *N*-[*(R)*-3-dodecanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-fosfono-2-[*(R)*-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[*(R)*-3-dodecanoiloxi-tetradecanoil]- β -D-glucopiranosido como un polvo blanco: mp 146-151 °C; IR (película) 3292, 3100, 2958, 2922, 2852, 1739, 1731, 1659, 1651, 1644, 1562, 1555, 1468, 1455, 1433, 1377, 1339, 1310, 1253, 1238, 1183, 1160, 1107, 1080, 1047, 960, 856, 722 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃-CD₃-OD) δ 0,88 (m, 18 H), 1,0-2,10 (mH), 2,20-2,75 (m, 12 H), 3,04 (q, 6 H, *J*=7,2 Hz), 3,3-4,3 (mH), 4,45 (d, 1 H, *J*= 8,5 Hz), 5,0-5,28 (m, 4 H), ¹³C NMR (CDCl₃) δ 173,9, 173,4, 173,2, 170,6, 170,1, 169,2 101,4 75,5, 74,0, 70,8, 70,7, 70,2, 68,5, 60,5,

56,6, 53,6, 47,4, 45,6, 40,9, 39,6, 38,8, 34,5, 34,3, 34,2, 34,1, 31,9, 29,7, 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 27,3, 25,2, 25,0, 23,6, 22,7, 21,6, 14,0, 8,3.

Se calculó MALDI-MS para $[M + Na]^+$ 1590.1900, se encontró 1590.1866; se calculó anal. para $C_{95}H_{182}N_3O_{17}P \cdot 3H_2O$: C, 66,20; H, 10,99; N, 2,44. Se encontró: C, 66,36; H, 10,69; N, 2,15.

Ejemplo 3 - Preparación de Sal Trietilamonio *N*-[(*R*)-3-Decanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-Deoxi-4-*O*-fosfono-2-[(*R*)-3-Decanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[(*R*)-3-Decanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosido: sal trietilamonio del Compuesto (IV)

(3a) A una solución de 2-deoxi-4-*O*-difenilfosfono-3-*O*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]-6-*O*-(2,2,2-tricloro 1,1-dimetiletoxicarbonil)-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosil bromuro (1,70 g, 1,38 mmol) en 1,2-dicloroetano seco (3,5 mL) se le agregaron cedazos moleculares 4 Å (0,6 g), $CaSO_4$ anhidro (1,2 g, 8,8 mmol) y *N*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinemetanol (0,60 g, 1,24 mmol). La mezcla que resultó se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, se trató con $Hg(CN)_2$ (0,63 g 2,5 mmol) y se calentó a reflujo durante 6 horas en la oscuridad. La mezcla de la reacción enfriada se diluyó con CH_2Cl_2 y se filtró a través de un lecho de Celita. El producto filtrado se lavó con 1 N ac KI, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La cromatografía instantánea en gel de sílice (elución gradiente, 25→40% (EtOAc/hexanos) produjo 1,82 g (80%) de *N*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-difenilfosfono-3-*O*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]-6-*O*-(2,2,2-tricloro-1,1-dimetiletoxicarbonilo)-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-β-D-glucopiranosido como un aceite incoloro.

(3b) Una solución del compuesto preparado según (3a) anterior (1,67 g, 1,02 mmol) en AcOH (50 mL) a 60°C se trató con polvo de cinc (3,33 g, 51 mmol) en tres porciones iguales durante un periodo de 1 hora. La mezcla de la reacción enfriada se sonicó, se filtró a través de un paño de Celita, y se concentró. El residuo resultante se dividió entre EtOAc y $NaHCO_3$ acuoso saturado y se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró para dar 1,25 g de un sólido blanco. Se obtuvo una solución del alcohol amino crudo y el ácido (*R*)-3-decanoiloxitetradecanoico (0,53 g, 1,33 mmol) en CH_2Cl_2 (20 mL) se trató con 2-etoxi-1-etoxicarbonilo-1,2-dihidroquinolina (0,38 g, 1,53 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró. Cromatografía instantánea en gel de sílice con 40→50% EtOAc/hexanos produjo 1,23 g (74%) de *N*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]-(*S*)-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-difenilfosfono-2-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[(*R*)-3-decanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosido como una espuma blanca.

36

(3c) Se hidrogenó una solución del compuesto preparado en (3b) anterior (1,07 g, 0,654 mmol) en una mezcla de AcOH (6,5 mL) y tetrahidrofurano (65mL) en presencia de PtO₂ (0,66 g) a temperatura ambiente y 70 psig durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó con 2:1 CHCl₃-MeOH (50 mL) y se sonicó brevemente. Se recogió el catalizador y se lavó con 2:1 CHCl₃-MeOH y se concentró el producto combinado filtrado y lavado. El sólido ceroso resultante se liofilizó a partir de trietilamino ac. Al 2% para dar ~ 1 g de sal de trietilamonio como un polvo blanco. Cromatografía instantánea en gel de sílice con CHCl₃-MeOH-H₂O-Et₃N (elusión gradiente 96:4:0,3:0,3→88:12:1:0,6) dio un producto parcialmente purificado (0,84 g) el cual se disolvió en hielo-frío 2:1 CHCl₃-MeOH (168 mL) y se lavó con hielo-frío (0,1 N aq HCl (67mL). La fase orgánica se filtró y se concentró. La cera blanca que se obtuvo (~0,7 g) se liofilizó a partir de ET₃N ac al 2% (70mL), libre de pirógenos) para dar 0,79 g (79%) de *N*-[*(R)*-3-decanoiloxitetradecanoil]-*(S)*-2-pirrolidinilmetil 2-deoxi-4-*O*-fosfono-2-[*(R)*-decanoiloxitetradecanoilamino]-3-*O*-[*(R)*-3-decanoiloxi-tetradecanoil]- β-D-glucopiranosido como un polvo blanco: mp 121-122 °C; IR (película) 3287, 3093, 2961, 2913, 2850, 1745, 1738, 1732, 1716, 1666, 1660, 1661, 1644, 1635, 1565, 1556, 1538, 1470, 1455, 1434, 1416, 1378, 1337, 1311, 1248, 1184, 1104, 1081, 1021, 964, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃-CD₃-OD) δ 0,88 (m, 18 H), 1,0-2,05 (mH), 2,20-2,75 (m, 12 H), 3,04 (q, 6 H, *J*=7,2 Hz), 3,3-4,3 (mH), 4,45 (d, 1 H, *J*= 8,5 Hz), 5,0-5,28 (m, 4 H), ¹³C NMR (CDCl₃) δ 173,7, 173,4, 173,2, 170,5, 170,1, 169,1 101,4 75,6, 74,0, 70,8, 70,2, 68,7, 60,4, 56,6, 53,8, 47,4, 45,6, 41,0, 39,6, 38,9, 34,5, 34,3, 34,2, 34,1, 31,9, 29,7, 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 27,3, 25,3, 25,0, 23,7, 22,7, 21,6, 14,1, 8,4.

Se calculó MALDI-MS para [M + Na]⁺ 1506.0961, se encontró 1506.1008; se calculó anal. para C₈₉H₁₇₀N₃O₁₇P: c, 67,43; H, 10,81; N, 2,65. Se encontró: C, 67,26; H, 10,85; N, 2,47.

EJEMPLOS 4-8

El principal objetivo de los Ejemplos 4 a 8 era determinar si el compuesto de la fórmula (II), preparado en el Ejemplo 1 (como la sal de trietilamino) ("en adelante, "Compuesto II") era promover la pirogenicidad mínima y mediar actividad adyuvante cuando se formulara con antígenos de vacuna.

Ejemplo 4 – Actividad adyuvante hacia HBsAg (Antígeno superficial de Hepatitis B)

Grupos de ratones BALV/c (Jackson Laboratorios Bar Harbor, Maine) de 6 a 8 semanas fueron inyectados subcutáneamente con 2 µg de HBsAg (Laboratorio Pablo Cassara) ± 20 µg de adyuvante (inmunoestimulante MPL® o Compuesto II) en el día 0 y en el día 21. Las vacunas se prepararon mezclando formulaciones de TEoA

(triethanolamina) que contenían el adyuvante, con HBsAg recombinante. Los títulos de HBsAg se determinaron por medio de ELISA de suero recogido (5 ratones por grupo) 21 días luego de la vacuna post-secundaria (Tabla 1). No se vacunaron los controles no inmunes.

Los títulos de suero de ratones que recibieron el Compuesto II tuvieron respuestas HBsAg considerablemente mayores que los sueros de control que recibieron solo el antígeno (Tabla 1). Especialmente notorio fue el aumento en los títulos de los isotipos IgG2a e IgG2b. Estos títulos fueron equivalentes a los expresados por los grupos de control que recibieron el inmunoestimulante MPL®

Tabla 1. Comparación de adyuvantes de pirógeno bajo con HBsAg

<i>Grupos</i>	<i>Pirogenicidad^a</i>	<i>IgG</i>	<i>Títulos de suero</i>		
			<i>IgG1</i>	<i>IgG2a</i>	<i>IgG2b</i>
No inmune	---	<100	<100	<100	<100
Vehículo TEoA	N.T.	51,200	102,400	25,600	1600
MPL®-TEoA	2-3	309,600	204,800	204,800	51,200
Comp. II-TEoA	0,3	409,600	204,800	409,600	51,200

a. Los datos de pirogenicidad representan el aumento total en °C de 3 conejos luego de administración intravenosa de una dosis de 10µg/Kg. En la prueba de pirógeno, los compuestos se solubilizaron en EtOH/WFI al 10% (USP Agua por Inyección) a 100 ug/ml y luego se diluyeron con dextrosa al 5% en agua. N.T significa que el compuesto no se probó.

Ejemplo 5 – Actividad adyuvante hacia proteína de hemaglutinina en vacuna de influenza FluZone

Grupos de ratones BALB/c (Jackson Laboratorios Bar Harbor, Maine) de 6 a 8 semanas fueron inyectados subcutáneamente con 0,2 µg de proteína de hemaglutinina en vacuna de influenza FluZone (Connaught Laboratorios, Swiftwater, PA) ± 20 µg de adyuvante (inmunoestimulante MPL® o Compuesto II) en el día 0 y en el día 14. Los títulos a FluZone se determinaron por medio de FluZone ELISA de sueros recogidos de 5 ratones 14 días post-secundarios (Tabla 2). No se vacunaron los controles inmunes. Las diluciones iniciales utilizadas en sueros de los grupos de prueba fue 1:1600.

Los resultados fueron similares a los del Ejemplo anterior. Nuevamente, el Compuesto II tuvo títulos considerablemente más altos que los de os sueros de control que recibieron solo antígeno (Tabla 2). El aumento en títulos también se reflejó en las respuestas mejoradas IgG2a e IgG2b. Estos títulos fueron equivalentes a los expresados por los grupos de control que recibieron el inmunoestimulante MPL®

36

Tabla 2. Comparación de adyuvantes de pirógeno bajo con una Vacuna de Influenza

Grupos	Pirogenicidad ^a	Títulos de suero			
		IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b
No inmune	---	<100	<100	<100	<100
Vehículo TEoA	N.T.	12,800	51,200	1600	<1600
MPL®-TEoA	2-3	102,400	102,400	25,600	12,800
Comp. II-TEoA	0,3	51,200	102,400	25,600	6400

a. Los datos de pirogenicidad representan el aumento total en °C de 3 conejos luego de administración intravenosa de una dosis de 10µg/Kg. En la prueba de pirógeno, los compuestos se solubilizaron en EtOH/WFI al 10% (USP Agua por Inyección) a 100 ug/ml y luego se diluyeron con dextrosa al 5% en agua. N.T significa que el compuesto no se probó.

Ejemplo 6 – Actividad Adyuvante hacia HBsAg

Grupos de ratones BALB/c fueron inyectados con 2,0 µg HBsAg (Rhein Americana, & Rhein Biotech) ± 25 µg adyuvante (inmunoestimulante o Compuesto II) en el día 0 y en el día 21. Los títulos del isotipo IgG1 e IgG2 a HBsAg se determinaron por medio de ELISA de sueros recogidos 21 días post-secundarios (Tabla 3). No se vacunaron los controles inmunes. En este experimento, el Compuesto II mediado aumentó los títulos en comparación con el grupo de control, que recibió antígeno en PBS. Los títulos estimulados RC-553 fueron equivalentes a los controles positivos del inmunoestimulante MPL® (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de adyuvantes de pirógeno bajo HBsAg

Grupos	Pirogenicidad ^a	Títulos de suero	
		IgG1	IgG2a
No inmune	---	<100	<100
Control PBS	N.T.	64,000	4000
MPL®-TEoA	2-3	128,000	1,024,000
Comp. II-TEoA	0,3	32,000	2,048,000

a. Los datos de pirogenicidad representan el aumento total en °C de 3 conejos luego de administración intravenosa de una dosis de 10µg/Kg. En la prueba de pirógeno, los compuestos se solubilizaron en EtOH/WFI al 10% (USP Agua por Inyección) a 100 ug/ml y luego se diluyeron con dextrosa al 5% en agua. N.T significa que el compuesto no se probó.

Ejemplo 7 – La actividad CTL aumenta con el Compuesto II hacia ratones inmunizados con HBsAg

Algunos ratones de cada grupo del Ejemplo 4 también se utilizaron como donantes de células de bazo con el fin de evaluar actividad CTL. Lisis específica dirigida de HBsAg se evaluó en una prueba estándar de liberación ⁵¹Cr de cuatro horas (Moore y colaboradores, (1988) *Cell* 55:777-785). Las suspensiones de una célula se prepararon de los bazos de los ratones 9 días siguientes a la vacunación. La células de bazo fueron

tratadas con NH₄Cl tris-tamponado para remover eritrocitos y se resuspendió a una concentración de 7,5 x 10⁶/ml en RPMI/FCS al 10% suplementado con 5 mM HEPES, 4 mN L-glutamina, 0,05 mM 2-mercaptoetanol y antibióticos. Un péptido sintético que representaba un epítipo CTL restringido por L^d, MHC de clase I (IPQSLDSWWTSL)MHC conocido de clase I, se agregó a las células a una concentración final de 75 nM. Luego de una incubación de 4 días, las células fueron recuperadas y se les evaluó la actividad CTL. Se midió la muerte específica contra células P815S transfectadas rotuladas ⁵¹Cr que expresaban el epítipo restringido por L^d. Las células objetivo fueron una línea celular P815 transfectada (P185S) que expresa el epítipo CTL restringido por L^d. La lisis no específica fue de <10% a un E:T de 50:1 contra el objetivo P815 (Tabla 4). Al contrario de la respuesta anticuerpo, RC-553 estimuló considerablemente niveles elevados de actividad CTL en comparación con los controles de solo antígeno (Tabla 4)

Tabla 4. Comparación de adyuvantes de pirógeno bajo con HBsAg

Grupos	Pirogenicidad ^a	Porcentaje de muerte específica (Efector: Razón Objetivo)			
		50:1	25:1	12,5:1	6,25:1
No inmune	---	6	3	1	0
PBS	N.T.	29	20	11	7
MPL®-TEoA	2-3	80	71	47	32
Comp. II-TEoA	0,3	85	77	53	37

a. Los datos de pirogenicidad representan el aumento total en °C de 3 conejos luego de administración intravenosa de una dosis de 10µg/Kg. En la prueba de pirógeno, los compuestos se solubilizaron en EtOH/WFI al 10% (USP Agua por Inyección) a 100 ug/ml y luego se diluyeron con dextrosa al 5% en agua. N.T significa que el compuesto no se probó.

Ejemplo 8 – Inducción de Citoquina *ex vivo* por el Compuesto II

Los efectos del Compuesto II en la elaboración de TNFα e IL-1β se midieron bajo condiciones *ex vivo* en células humanas mononucleares sanguíneas periféricas. El inmunoestimulante MPL® y el Compuesto II se formularon en soluciones acuosas de TEoA/WFI al 2%

La sangre humana se utilizó para evaluar la capacidad de glicolípidos (AGP) en inducir citoquinas proinflamatorias. La sangre entera humana es recogida en tubos heparinizados y 0,45 de la sangre entera se mezcla con 0,05 ml de salina tamponada de fosfato (PBS, pH 7,4) que contiene el glicolípido (es decir, los compuestos de prueba). Los tubos se incuban durante 4 horas a 37°C en un aparato agitador. Las muestras se diluyen luego con 1,5 ml de PBS estéril y se centrifugan. Se retiran los sobrenadantes y se les analiza TNF-α e IL-1β asociados con células mediante ELISA sandwich utilizando kits de inmunoensayo Quantikine de R&D Systems para TNF--α e IL-1β.

A 1, 5 y 10 µg/ml en el ensayo, el Compuesto II no produjo niveles de TNF--α que se pudieran detectar bajo la condición del ensayo. Por el contrario, el LPS de control

positivo fue un estimulador efectivo de secreción de TNF- α de las células a 1 ng/mL. El inmunoestimulante MPL® fue efectivo para inducir TNF- α en el rango de concentración de 100 a 10,000 ng/ml.

Igualmente, el Compuesto II (a 1, 5 y 10 μ g/ml) no produjo niveles detectables de IL-1 β . Para comparar los efectos de este compuesto, el nivel de IL-1 β inducido con inmunoestimulante MPL® se le asignó un valor de 1 y la inducción relativa de citoquinas para el Compuesto II fue $\leq 0,05$.

Análisis de los Ejemplos 4 a 8

Los datos de estos estudios indican que el Compuesto II puede intensificar la inmunidad a antígenos de vacuna. Este suero intensificado de compuesto titula a dos antígenos de vacuna distintos: antígenos superficiales de influenza y antígenos superficiales de hepatitis. Al igual que el inmunoestimulante MPL®, media un cambio en el perfil del anticuerpo de una respuesta dominada por el isotipo IgG1 a una respuesta con altos niveles de anticuerpos IgG2. Además de intensificar la respuesta de anticuerpos, este compuesto es un buen adyuvante para inducir actividad CTL.

Una característica singular de los resultados en este estudio es que el Compuesto II aparece como que influencia la respuesta sin inducir niveles detectables de las citoquinas inflamatorias TNF- α o IL-1 β . Estas citoquinas son producidas por células del sistema inmune innato en respuesta a los productos bacterianos de pared celular, incluido el lípido A. Debido a que el compuesto comparte similitudes estructurales con el lípido A, es razonable suponer que también estimularía TNF- α o IL-1 β y de hecho, muchas moléculas AGP o hacen. Como las citoquinas inflamatorias TNF- α e IL-1 β , estimulan la liberación de cascadas de otros mediadores de citoquina responsables por activar células fagocíticas y para movilizar inmunidad específica. IL-1 fue denominado inicialmente un pirógeno endógeno debido a que induce una respuesta febril. Por ello, la falta de IL-1 detectable luego de la administración del Compuesto II coincide con la falta aparente de fiebre en la prueba de pirógenos con conejos.

Sigue siendo posible que en estos estudios este compuesto estimule realmente la secreción de TNF- α e IL-1 β a niveles lo suficientemente altos para mediar la activación de inmunidad específica, pero demasiado bajos como para ser detectados en un ensayo de citoquina *ex vivo*. Otra opción sería que este compuesto estimule mediadores de citoquina diferentes de TNF- α e IL-1 β que conduzcan a una respuesta inmune específica a antígenos de vacuna co-administrados. Parece probable que se produzca IFN γ . Se cree que esta citoquina es responsable por inducir el cambio de isotipo a anticuerpos de la subclase de

41
41

IgG2a, y de estimular las respuestas CTL impulsadas por CTL. Por ello, los títulos de IgG2a aumentados y las poblaciones activas de CTL reflejan la producción de IFN γ .

Ejemplo 9 – Estimulación de Sintasa de Oxido Nítrico (iNOS) por el Compuesto II

Este ejemplo ilustra los efectos de varios glicolípidos en inducción de iNOS en macrófagos murinos J774. La línea celular de macrófagos murinos J774 puede ser promovida por IFN- γ *in vitro* y es muy positiva para posterior estimulación LPS de una mayor regulación de iNOS según medición en un procedimiento estándar de ensayo ELISA del reactivo Greiss. El ensayo utiliza células J774 germinadas en 1×10^6 mL con 30 mL/frasco y con IFN- γ agregado a 100 unidades/mL durante 16 a 24 horas. Las células son luego cultivadas y lavadas y resuspendidas a 2×10^5 /pozo en una bandeja de 96 pozos y se dejó adherir. Los compuestos glicolípidos se diluyen serialmente en pozos para un grupo de prueba y los cultivos resultantes se incuban durante otras 36-40 horas antes de que los sobrenadantes del cultivo se recojan del análisis del reactivo Greiss de liberación de nitrito. (Green y colaboradores (1982) *Anal. Biochem.* 126:131-138). El contenido de nitrito se semeja paralelamente a la función iNOS.

La potencia se determinó como la concentración (ng/mL) de glicolípido en cultivo capaz de inducir una media inducción máxima de nitrito (ED₅₀). Entre más bajo sea el número ED₅₀, mayor será la potencia para inducción de iNOS. El ED₅₀ se calculó de acuerdo con lo métodos establecidos por Jonson y colaboradores, (1999) *J. Med. Chem.* 42: 4640-4649.

Se encontró que el inmunoestimulante MPL® tenía un ED₅₀ de aproximadamente 2 ng/mL, resultando en altos niveles de elaboración de nitrito, mientras que el Compuesto II exhibió un valor nominal ED₅₀ de aproximadamente ≥ 3000 (ng/ml).

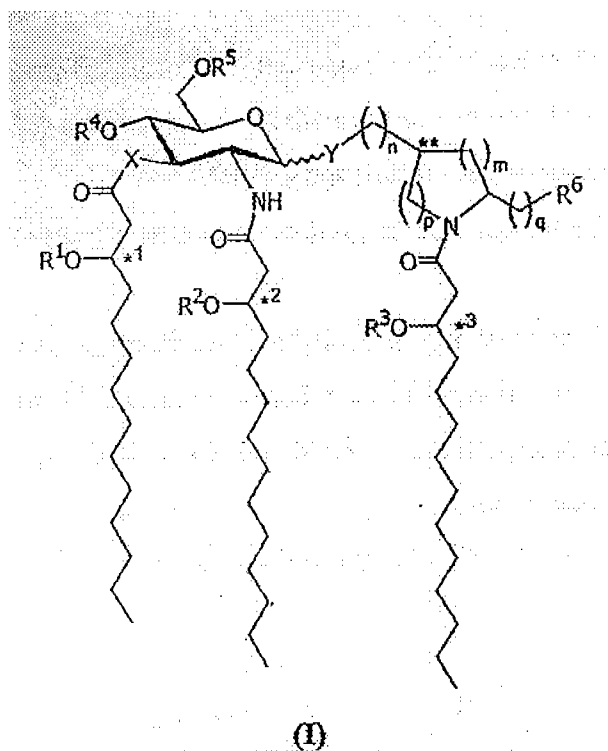
La máxima actividad más baja de iNOS que se observó con este compuesto sugiere que es esencialmente inactivo en este sistema para inducción de iNOS.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones que se describen aquí son únicamente para fines ilustrativos que a la luz de los mismos, se sugerirá a las personas versadas en la técnica que se puedan hacer varias modificaciones y cambios y que los mismos se incluyan dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente que se citan en este contexto quedan incorporadas por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

4242

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tenga la fórmula:

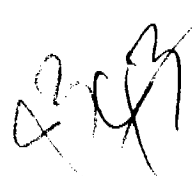


y sales farmacéuticamente aceptables de lo mismo, en donde X es -O- o -NH- y Y es -O- o -S-; cada uno de R¹, R² y R³ son independientemente un grupo acilo (C₉-C₁₄), incluidos grupos de acilo, saturados, no saturados y ramificados; R⁴ es -H o -PO₃R⁷R⁸, en donde cada uno de R⁷ y R⁸ son independientemente H o grupos alifáticos(C₁-C₄); R⁵ es -H, -CH₃ o -PO₃R⁹R¹⁰, en donde cada uno de R⁹ y R¹⁰ son seleccionados independientemente de -H y grupos alifáticos(C₁-C₄); R⁶ es seleccionado independientemente de H, OH, grupos oxialifáticos(C₁-C₄), -PO₃R¹¹R¹², -OPO₃R¹¹R¹², -SO₃R¹¹, -OSO₃R¹¹, -NR¹¹R¹², -SR¹¹, -CN, -NO₂, -CHO₂, -CO₂R¹¹ y CONR¹¹R¹², en donde cada uno de R¹¹ y R¹² son seleccionados independientemente de H y grupos alifáticos(C₁-C₄); siempre y cuando que R⁴ y R⁵ sea un grupo que contenga fósforo y que cuando R⁴ es -PO₃R⁷R⁸, R⁵ sea diferente de -PO₃R⁹R¹⁰;

en donde “*1”, “*2”, “*3” y “**” representan centros quirales;

en donde *n*, *m*, *p* y *q*, son cada uno independientemente un entero de 0 a 6, con la condición de que la suma de *p* y *m* sea entre 0 y 6.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde X y Y son -O-, R⁴ es PO₃R⁷R⁸, R⁵ y R⁶ son H, y *n*, *m*, *p* y *q* son enteros de 0 a 2.
3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde R⁷ y R⁸ son -H.

- 
4. El compuesto de la reivindicación 3, en donde n es 1, m es 2, y p y q son 0.
 5. El compuesto de la reivindicación en donde cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son acilo C_{10} - C_{12}
 6. El compuesto de la reivindicación 4, en donde cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son residuos de decanoilo.
 7. El compuesto de la reivindicación 4, en donde cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son residuos de dodecanoilo.
 8. El compuesto de la reivindicación 4, en donde $*^1$, $*^2$ y $*^3$ están en la configuración R .
 9. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
 10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
 11. La composición farmacéutica según la reivindicación 9 ó 10, en donde la composición farmacéutica comprende además al menos un antígeno.
 12. La composición farmacéutica según la reivindicación 11, en donde el antígeno se deriva del grupo compuesto de virus de Herpes Simplex tipo 1, virus de Herpes Simplex tipo 2, citomegalovirus Humano, Hepatitis A, B, C o E, virus Sincitial Respiratorio, virus de papiloma humano, virus de Influenza, Tuberculosis, Leishmaniasis, T. cruzi, Ehrlichia, Candida, Salmonella, Neisseria, Borrelia, Chlamydia, Bordetella, Plasmodium y Toxoplasma.
 13. La composición farmacéutica según la reivindicación 11, en donde el antígeno es un antígeno tumoral humano.
 14. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, en donde el antígeno tumoral se deriva de un cáncer de próstata, colon, seno, ovario, páncreas, cerebro, cabeza y cuello, melanoma, leucemia o linfoma.
 15. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, en donde el antígeno es un auto-antígeno.
 16. La composición farmacéutica según la reivindicación 15, en donde el auto-antígeno es un antígeno asociado con una enfermedad autoinmune.

17. La composición farmacéutica según la reivindicación 16, en donde la enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, miastenia gravis, artritis reumatoide o soriasis.

18. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en una formulación acuosa.

19. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, en donde la formulación acuosa comprende uno o más surfactantes.

20. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en una formulación de emulsión.

21. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en una formulación sólida.

22. Un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto; el método consiste en administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 21.

23. Un método para el tratamiento a un mamífero que sufra o que sea susceptible a una infección patogénica, cáncer o trastorno autoinmune, que consiste en administrar al mamífero, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 21.

24. Un método para el tratamiento de enfermedades o condiciones aliviadas por la producción de óxido nítrico en un sujeto, que consiste poner en contacto a dicho sujeto con una cantidad efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 21.

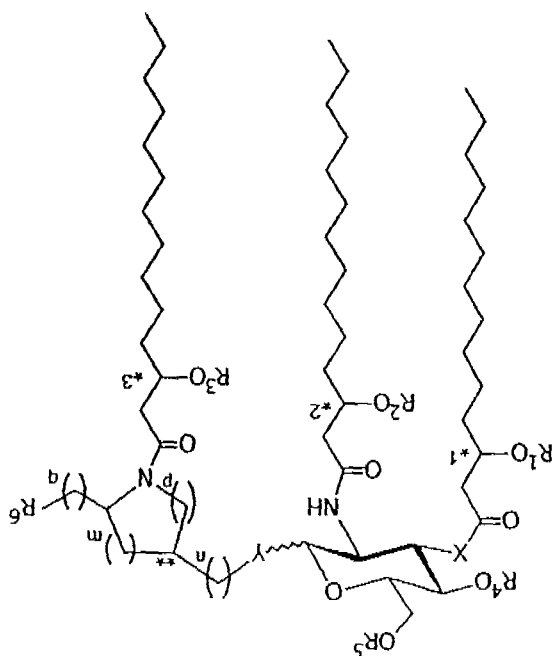


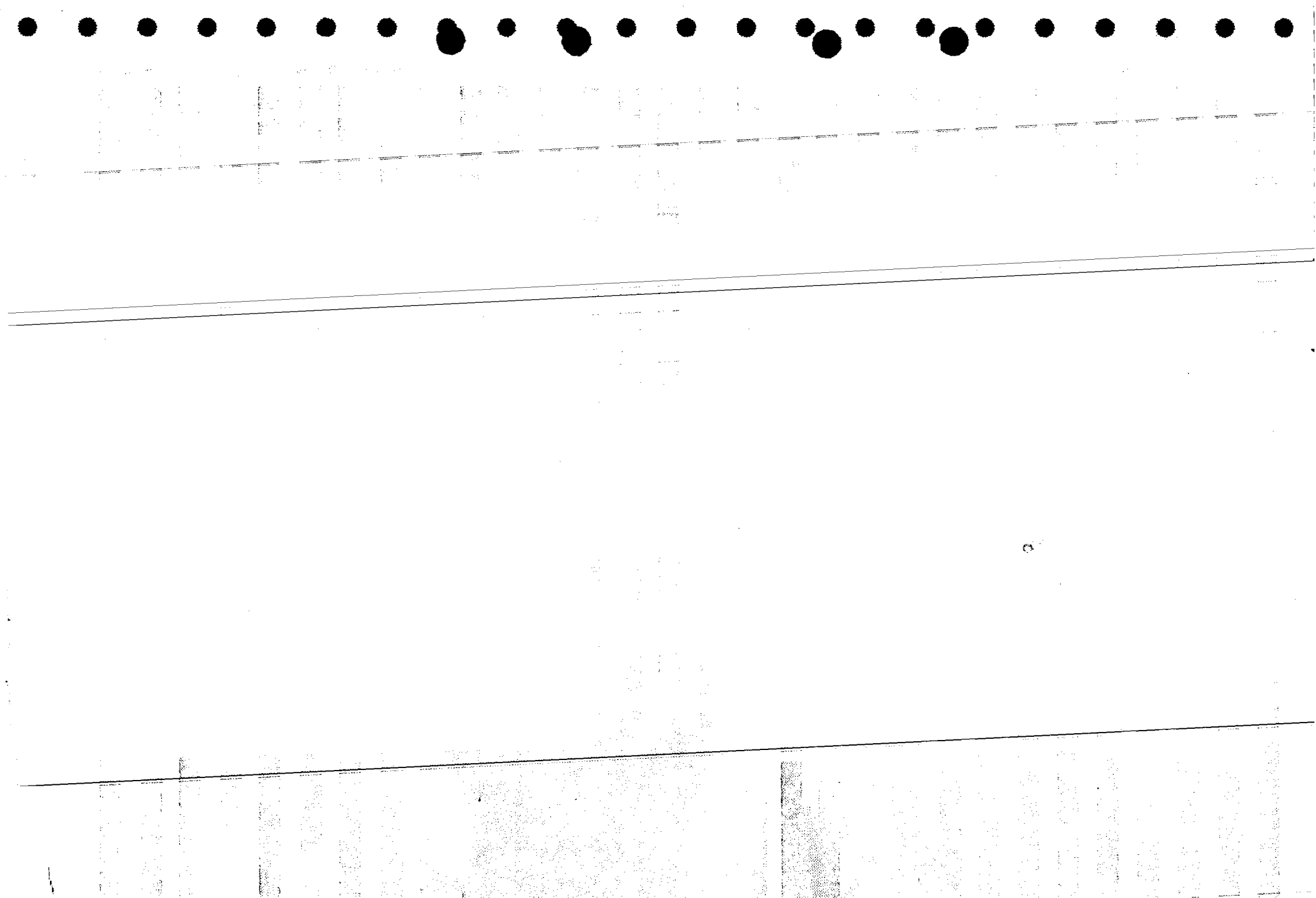
46

(I)



(II)





50 48 17

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes. y	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () COMPLETA ()

Firma Responsable: Claudia M Neix

Fecha:

MANTENIMIENTO DE PROTOCOLOS

Número : 19663

Fecha : 03/09/1999

Conferido: CORIXA CORPORATION

Pais : US ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Ciudad : 59 SEATTLE, WASHINGTON

Represent: S Sustituir: S Desistir: S

No. Radicacion : 99 55667 Clase: 0 Seev: 0 Seac: 0

scncia	Codigo	Ctr	Nombre
1	126	C	CASTILLO GRAU GERMAN
2	4933		CASTILLO GIBSONE ADRIANA
3	5371		CASTILLO GIBSONE LUIS FELIPE

50 X

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON
Apoderado
CORIXA CORPORATION

Oficio N° 00001

ASUNTO:

Radicación N°	04-85791
Solicitud internacional	PCT/US02/03580
Fecha inicio fase nacional	01/04/2007
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	002

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene la copia y traducción del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante ó en su defecto la declaración bajo la regla PCT 4.17 junto con su traducción. (Art. 26-k) Decisión 486).
- El solicitante debe presentar un nuevo título, que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4.3 PCT, Art. 27, 27 Decisión 486, Circular Única 5.2.9).
- El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al Capítulo I ó II del PCT, porque la indicación en el petitorio no corresponde a los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos que corresponden.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Exp 04- 85791

81 69



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

202044