



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-11980

21 **EXPEDIENTE No.**

54 **TÍTULO**

CIERTOS COMPUESTOS DE FOSFATO DE AMINOALQUILO GLUCOSAMINIDIA Y
SU USO

51 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

C 07 H 15/04

71 **SOLICITANTE**

CORIXA CORPORATION

DOMICILIO

Seattle, Estado de Washington, E.U.A.

74 **APODERADO**

LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON

22 **BOGOTÁ, D. C.,**

07 FEB 2007

FN 09-02 2007

CORIXA

(FORMA P 10)

SS
151

PETITORIO



Rad: 07-011880-00000-0000
 Dep. 2000 NUEVEACRONES
 Eje: 370 FASE NACIONAL
 ACT11 PRESENTACION Fotos: 73

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1
☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

2

**SOLICITANTE
 (71)**

Nombre: CORIXA CORPORATION

Dirección: Legal Department
 1900 9th Avenue

Nacionalidad o domicilio: Seattle, Estado de
 Washington, E.U.A.

Lugar de Constitución:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
 O APODERADO**

Nombre: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 74 60 Fax: 285 82 67

E-mail: info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

Cual _____

Número 79.397.879 de TP 68.995 del
 Bogotá C.S.J.

4

**INVENTOR(ES)
 (72)**

Nombre: David A. JOHNSON - David H. PERSING

Dirección: 121 Woodland Way - 22401 NE 25th Way

Nacionalidad o Domicilio: Hamilton, MT. - Sammamish, WA. (E.U.A.)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/022522 Fecha: 24/08/2005

Publicación Internacional No. WO 2006/016997 A2 Fecha: 16/02/2006

6 Título (54) **CIERTOS COMPUESTOS DE FOSFATO DE AMINOALQUILO GLUCOSAMINIDIA Y SU USO**

7 Clasificación Internacional (51)

C07H 15/04

8 Prioridad

Si ☒ No ☐

(33) País de origen
 E.U.A.

(32) Fecha
 08.07.2004

(31) Número de Solicitud
 10/888,683

9 Comprobante de pago N°:

07-11,307

Fecha: _____

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

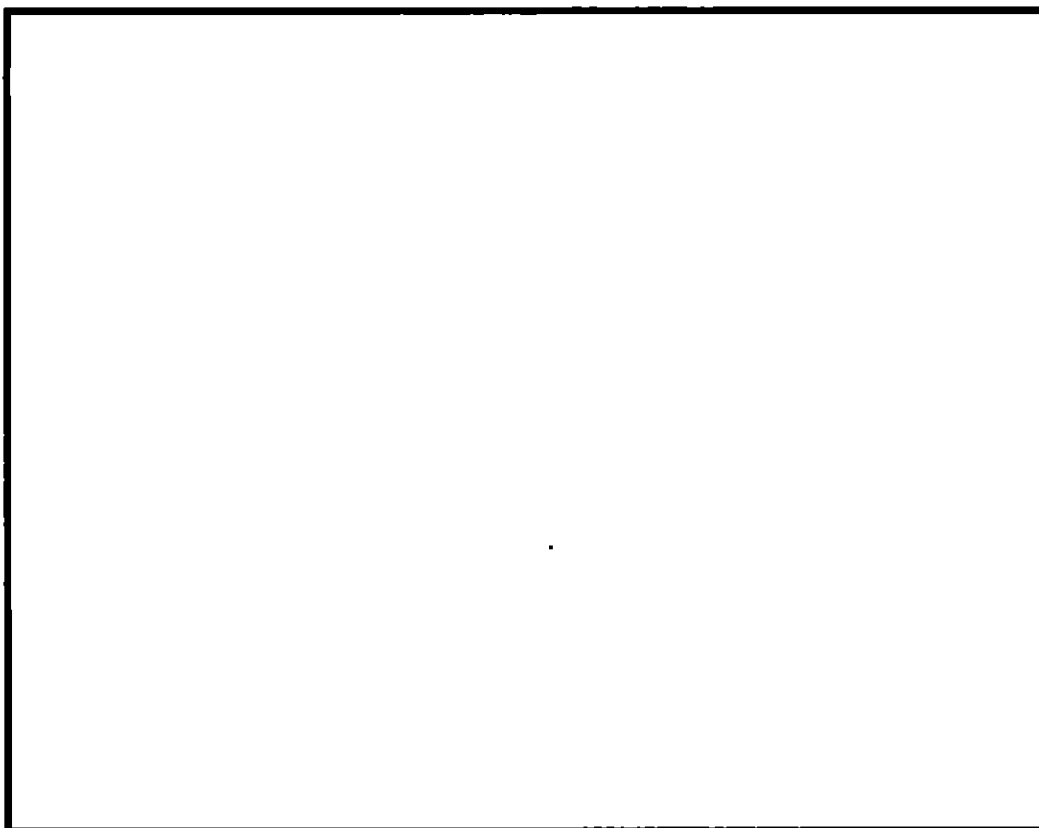
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite 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. 79'397.879
de BogotáT.P. 68.995
del C.S.J.

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

~~CONFIDENTIAL~~ ~~CONFIDENTIAL~~ ~~CONFIDENTIAL~~ ~~CONFIDENTIAL~~ ~~CONFIDENTIAL~~

REF: ZUWU 14411 15-04-41 Imp. ZUWU NUCLEONICONES
 14411 PRESENIALALI
 14411 PRESENIALALI

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 11,307
FECHA : FEBRERO 7 DE 2007

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

X

4

CIERTOS COMPUESTOS DE FOSFATO DE AMINOALQUILO GLUCOSAMINIDA Y SU USO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud es la continuación en parte de la Solicitud 10/752,660 presentada el 6 de enero de 2004, la cual reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense 60/438,585 presentada el 6 de enero de 2003. El contenido de las dos solicitudes mencionadas se incorpora a la presente en su integridad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los receptores de tipo "peaje" (TLR por sus siglas en inglés), han sido vinculados a la poderosa respuesta inmunitaria innata y reconocen distintos componentes estructurales que son únicos de los patógenos; esta interacción lleva al sistema inmunológico hacia un estado activado, lo cual acarrea consecuencias de corto y largo plazo. Existe gran interés por el desarrollo de agonistas y antagonistas de los TLR ya que la manipulación farmacológica de las respuestas inmunitarias innatas puede llevar a la obtención de vacunas más eficaces y a novedosos abordajes terapéuticos a las enfermedades autoinmunes, atópicas, malignas e infecciosas. El primer producto microbiano del que se descubrió que era un agonista de un receptor de tipo "peaje" fue el LPS, un componente de la membrana bacteriana específico de los microorganismos gram negativos, que activa al receptor de tipo "peaje" 4 (TLR-4). Aunque el LPS es un poderoso agente inmunomodulador, su uso medicinal es limitado debido su extrema toxicidad, que incluye la inducción del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. La molécula subestructural endotóxica biológicamente activa del LPS es el lípido-A, un disacárido de glucosamina fosforilado, acilado con múltiples ácidos grasos que sirve para anclar toda la estructura de la membrana externa de bacterias Gram-negativas. Los efectos tóxicos del lípido A se pueden aminorar mediante la modificación química selectiva del lípido A para producir compuestos de lípido A monofosforilados (MPL™ inmunoestimulante; Corixa Corporation; Seattle, WA). Se han descrito los métodos para hacer y usar MPL™ inmunoestimulante y compuestos estructuralmente semejantes en adyuvantes para vacunas y otras aplicaciones (véanse por ejemplo, Patentes estadounidenses Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094; 4,987,237; Johnson et al., *J Med Chem* 42:4640-4649 (1999); Ulrich y Myers, en *Vaccine Design: The*

5

Subunit and Adjuvant Approach; Powell y Newman, Eds.; Plenum: New York, 495-524, 1995). En particular, estas y otras referencias demostraron que el MPL™ inmunoestimulante y compuestos relacionados tenían significativas actividades adyuvantes cuando se usaron en formulaciones para vacuna con antígenos proteínicos y carbohidratos para reforzar la inmunidad humoral o la mediada por células a los antígenos e interactuar con los receptores de tipo "peaje".

[0003] A partir de la experiencia con el MPL™ inmunoestimulante y otros componentes de la pared celular bacteriana, se desarrolló una familia de novedosos compuestos sintéticos, los fosfatos de aminoalquilo glucosaminida (AGP). Los compuestos AGP también interactúan con el TLR-4, como agonistas y antagonistas. Los AGP incluyen compuestos tanto acíclicos como cíclicos (Patentes estadounidenses Nos. 6,113,918, y 6,303,347, WO 98/50399 publicadas el 12 de octubre de 1998, WO 01/34617, publicada el 17 de mayo de 2001, WO 01/90129, publicada el 29 de noviembre de 2001, y WO 02/12258, publicada el 14 de febrero de 2002). A semejanza del MPL™ inmunoestimulante, se ha demostrado que estos compuestos conservan características adyuvantes significativas cuando se formulan con antígenos en composiciones de vacuna and, además, tienen perfiles de toxicidad similares o mejorados cuando se comparan con el MPL™ inmunoestimulante. Los AGP también muestran actividad adyuvante en la mucosa y son eficaces en ausencia antígeno, lo cual los convierte en compuestos atractivos para uso profiláctico o terapéutico use.

[0004] Otra ventaja importante que ofrecen los AGP sobre el MPL™ inmunoestimulante y sus similares es que los AGP son fáciles de producir a escala comercial por medios sintéticos. Ya que se producen sintéticamente, los AGP están desprovistos de las trazas de contaminantes biológicos que se encuentran en el MPL. Dichos AGP tendrían una ventaja sobre el MPL como adyuvantes de vacuna en ciertos escenarios, como los protocolos de inmunización en pediatría en los cuales se tiene que minimizar la pirogenicidad de los adyuvantes. No obstante, puesto que los AGP son producto de síntesis química, una estabilidad menos que óptima del compuesto podría conllevar la acumulación de productos de degradación que podrían dar lugar a variaciones en la actividad biológica y la estabilidad de un lote a otro. Desde el punto de vista del desarrollo de procesos de BPM para la manufactura de materiales para estudios clínicos en seres humanos, la estabilidad de los lotes y la variabilidad lote a lote son aspectos de gran importancia. Por tanto, los compuestos que tienen mayor actividad biológica que el MPL™ inmunoestimulante y similares, que interactúan con receptores

6

de tipo "peaje" o son optimizados para la síntesis con BPL a gran escala son deseables. La presente invención pretende satisfacer dichas necesidades y otras al proporcionar compuestos modificados para que tengan una mejor actividad biológica, estabilidad con aumento de la resistencia a la degradación enzimática y química, y mejores perfiles de seguridad.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0005] En un aspecto, la presente invención comprende ciertos novedosos compuestos de fosfato de aminoalquilo glucosaminida, como se definen aquí, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. La invención además comprende composiciones que contienen los compuestos o sus sales, y métodos de uso de los compuestos como adyuvantes y como compuestos farmacéuticamente eficaces por derecho propio.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

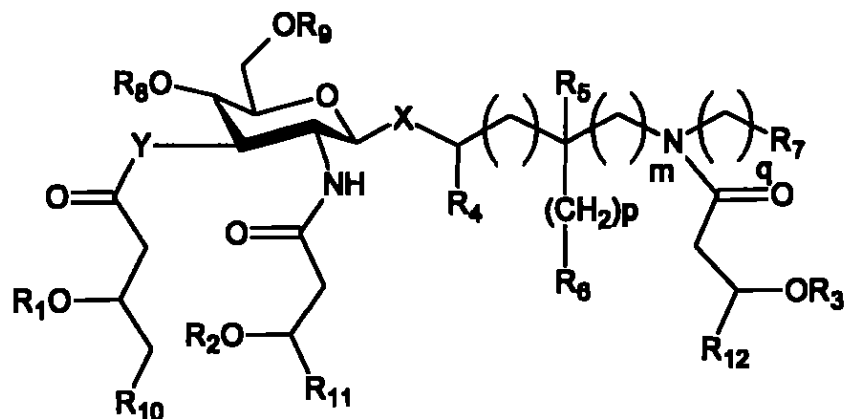
[0006] Los compuestos de la presente invención son elementos de la familia del aminoalquilo glucosaminida 4-fosfato (AGP). Como se describe más adelante, los compuestos de la invención poseen en grado variable modificaciones de las longitudes de las cadenas de seis acilos (primarias y secundarias), modificaciones estructurales del brazo alquilo que incluyen una molécula de fosfato, modificación estructural para incluir un éter lipídico primario en la posición del azúcar C-3 así como para tres éteres lipídicos secundarios, o un grupo bloqueador 6-hidroxilo.

[0007] Conocidos químicamente como ω -aminoalquilo 2-amino-2-desoxi -4-fosfono- β -D-glucopiranosidos, los AGP constituyen una clase de miméticos sintéticos del lípido A que guardan relación estructural con el principal componente biológicamente activo del componente del lípido A monofosforilado. En los AGP el azúcar reductor ha sido reemplazado por una unidad aglicón de N-[(R)-3-*n*-alcanoiloxitetradecanoil]aminoalquilo. A semejanza de otros derivados del lípido A disacárido, los AGP comprenden seis ácidos grasos para que su actividad biológica sea máxima, pero a diferencia de los derivados disacáridos, los AGP contienen una unidad aglicón conformacionalmente flexible ligada a β que permite el empaque apretado energéticamente favorecido de las seis cadenas de ácido graso. Se cree que el empaque apretado de seis ácidos grasos en una configuración hexagonal desempeña un papel fundamental en la bioactividad de las moléculas similares al lípido A (Seydel et al., *Immunobiol*; 187(3-5):191-211,1993).

7

[0008] Los compuestos de la presente invención se consideran como elementos de la familia de los AGP. Estos compuestos incluyen modificaciones de las longitudes de las cadenas de seis acilos (primarias y secundarias).

[0009] En uno de los aspectos más amplios, una característica de la invención es un compuesto AGP que tiene la fórmula (I):



(I)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R_1 , R_2 y R_3 son iguales o distintos y son residuos de acilo graso que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R_1 , R_2 o R_3 es opcionalmente hidrógeno; R_4 y R_5 son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R_6 y R_7 son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxilo, fosfona, fosfonooxilo, sulfona, sulfooxilo, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxilo, y ésteres y amidas de los mismos; R_8 y R_9 son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfona y H, y por lo menos uno de R_8 y R_9 es fosfona; R_{10} , R_{11} y R_{12} se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 10 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

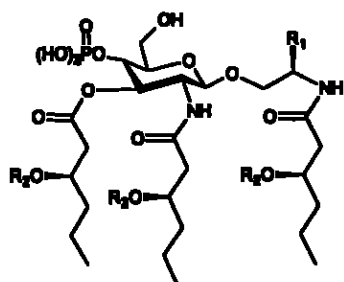
[0010] En versiones preferidas de este aspecto de la invención,

- X y Y son ambos de preferencia átomos de oxígeno;
- R_1 , R_2 y R_3 son de preferencia grupos acilo normales, que pueden ser iguales o distintos, y más de preferencia se seleccionan independientemente de grupos acilo de cadena recta C_6 - C_{14} (más de preferencia grupos acilo saturados);
- R_{10} , R_{11} y R_{12} son de preferencia grupos alifáticos no sustituidos (es decir, alquilo) que tienen de 1 a 10, de preferencia de 3 a 9, más de preferencia de 3 a 7, átomos de carbono, y más de preferencia son grupos alifáticos no sustituidos idénticos que tienen

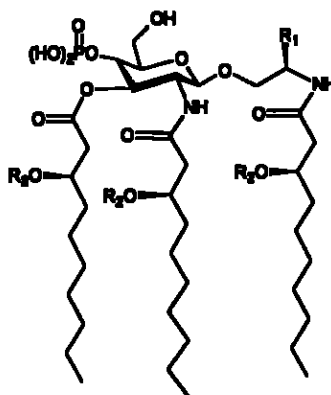
8

de 3 a 7 átomos de carbono.

[0011] Los compuestos **1a-c** y **2a-c**, y sus sales farmacéuticamente aceptables, son elementos ejemplares de este tipo de compuesto (I).



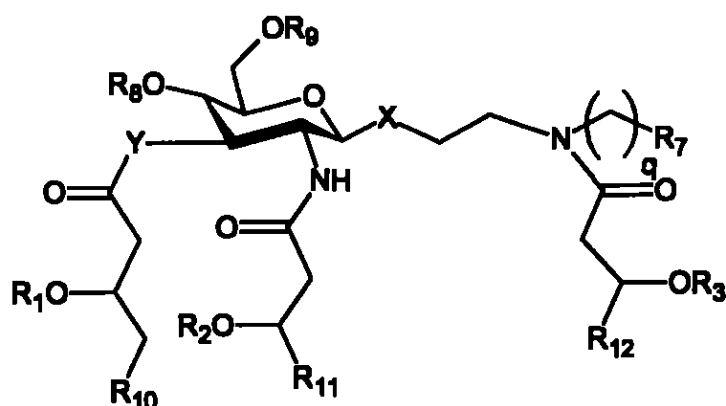
1a-c $R_1 = \text{CO}_2\text{H} \text{ ó } \text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$
 $R_2 = \text{C}_6, \text{C}_{10}, \text{C}_{14} \text{ acilo}$



2a-c $R_1 = \text{CO}_2\text{H} \text{ ó } \text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$
 $R_2 = \text{C}_6, \text{C}_{10}, \text{C}_{14} \text{ acilo}$

[0012] Los compuestos (I) de la presente invención por tanto se parecen a algunos AGP conocidos, salvo que poseen cadenas primarias de ácidos grasos más cortas (en los compuestos AGP que se conocían antes, las cadenas primarias de ácidos grasos tienen 14 átomos de carbono, es decir, R_{10} , R_{11} y R_{12} son grupos alquilo de cadena recta C_{11}). Se encontró que la alteración de la longitud de la cadena secundaria de ácidos grasos tiene efecto en la capacidad de estimular al sistema inmunitario de las AGP y para los homólogos secundarios de ácidos grasos de 3-D-MPL (Johnson et al, *J Med Chem*; 42:4640-4649, 1999). La baja endotoxicidad de ciertas variantes naturales del lípido A como el lípido A del *R. sphaeroides* ha sido atribuida en parte a la presencia de ácidos grasos primarios más cortos (C_{10}) en estas moléculas (Qureshi et al., *J Biol Chem*; 266(10):6532-6538, 1991). De manera parecida, la baja toxicidad de ciertos LPS de helicobacter y pseudomonas se puede deber a la presencia de componentes hexaacilo que contienen ácidos grasos primarios que difieren en longitud de los que se encuentran en el lípido A tóxico de la salmonella (Moran et al., *J Bacteriol*; 179(20):6453-6463, 1997; Kulshin et al., *Eur J Biochem*; 198(3):697-704, 1991). Si bien la relación entre la longitud de la cadena acilo primaria ha sido poco investigada con los análogos sintéticos del lípido A que contienen hasta tres ácidos grasos (Hasegawa et al., *Biosci Biotech Biochem*; 59(9):1790-1792, 1995 y Ogawa et al., *Carbohydr Res*; 220:155-164, 1991) y análogos tetraacilo disacárido del lípido IVa, (Fukase et al., *Tetrahedron*; 54:4033-4050, 1998) hasta donde sabemos jamás se ha hecho un estudio ya sea con el farmacóforo hexaacilado básico del lípido A o con un mimético del lípido A.

[0013] Entre las características de presente invención también se incluyen ciertos compuesto glicilo y fosfonooxietilo (PE) compuestos. Estos son compuestos de la anterior fórmula (I) los cuales R_4 , R_5 y R_6 son hidrógeno, n , m y p son 0, y en los cuales q es 1 y R_7 es COOH o en los cuales q es 2 y R_7 es OPO_3H_2 . Por tanto, tienen la fórmula general (II):



(II)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; R_1 , R_2 y R_3 son iguales o distintos y son residuos de acilo graso que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R_1 , R_2 o R_3 es opcionalmente hidrógeno; R_4 se selecciona de entre el grupo compuesto por H y metilo; q es 1 y R_7 es COOH , o bien, q es 2 y R_7 es OPO_3H_2 ; R_8 y R_9 son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfona y H, y por lo menos uno de R_8 y R_9 es fosfona; y R_{10} , R_{11} y R_{12} se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

en el entendido de que R_7 sea COOH , entonces por lo menos uno de R_{10} , R_{11} y R_{12} es un grupo alifático no sustituido de cadena recta que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0014] En versiones preferidas de compuestos (II) de la invención,

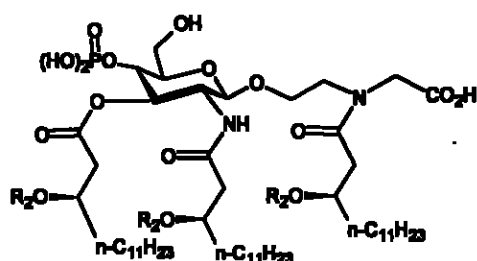
- X y Y son ambos de preferencia átomos de oxígeno;
- R_1 , R_2 y R_3 son de preferencia grupos acilo normales, que pueden ser iguales o distintos, y de preferencia se seleccionan independientemente de grupos acilo de cadena recta C_6 - C_{14} , o de grupos acilo de cadena recta C_6 - C_{10} ;
- si R_7 es COOH , entonces los grupos R_{10} , R_{11} y R_{12} son de preferencia grupos alifáticos no sustituidos (es decir, alquilo) que tienen de 1 a 10

10

átomos de carbono.

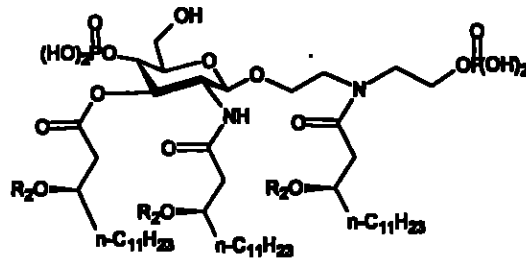
[0015] R_{10} , R_{11} y R_{12} de los compuestos (II) pueden ser grupos alifáticos saturados iguales o distintos, pero más de preferencia son grupos alifáticos no sustituidos idénticos.

[0016] Los compuestos 11a,b y 12a,b son elementos ejemplares de este tipo de compuesto (II).



11a $R_2 = C_6$ acilo

11b $R_2 = C_{10}$ acilo



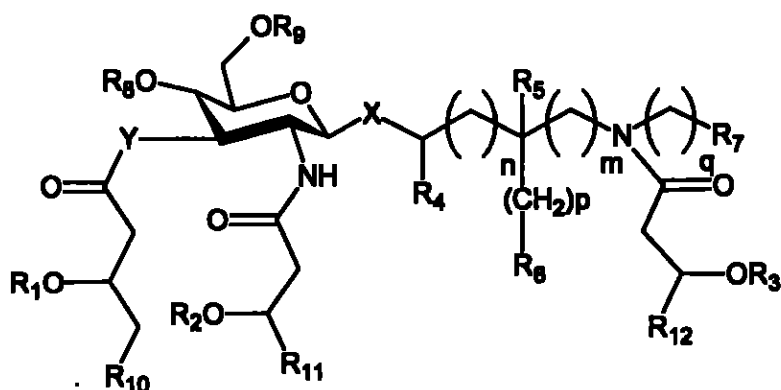
12a $R_2 = C_6$ acilo

12b $R_2 = C_{10}$ acilo

[0017] Los compuestos 12a, 12b contienen modificaciones estructurales del brazo alquilo que incluyen una molécula de fosfato. Dichos compuestos se consideran potencialmente más estables que los otros elementos de la familia. Estos compuestos tienen la ventaja sobre las clases de seril/serinol fosfato de AGP de que les falta un centro estereogénico en la unidad aglicón, una característica que complica la síntesis y comporta impurezas enantioméricas y diastereoméricas difíciles de separar. Los compuestos 12a, 12b son representativos de una novedosa clase de compuestos, es decir, los de Fórmula (II) en los cuales R_7 es un grupo fosfono, y q es 2.

[0018] Otro tipo de compuestos de la invención son los derivados acilo (R)-3-alquiloxitetradecanoicos. Estos tienen la misma fórmula general (I) de arriba, salvo que R_1 , R_2 y R_3 no son grupos acilo sino grupos alquilo de cadena recta, lo cual hace que los grupos R_1O- , R_2O- y R_3O- sean éteres en vez de derivados del ácido carboxílico. En este tipo de compuesto, R_1 , R_2 y R_3 son de preferencia grupos C_8-C_{11} alquilo. Pueden ser grupos iguales o distintos, pero más de preferencia son idénticos.

[0019] Dichos compuestos tienen la fórmula general (III):



(III)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son grupos alifáticos saturados de cadena recta (es decir, grupos alquilo de cadena recta) que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ y R₅ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R₆ y R₇ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxi, fosfono, fosfonooxi, sulfo, sulfooxi, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxi, y ésteres y amidas de los mismos; R₈ y R₉ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfono y H, y por lo menos uno de R₈ y R₉ es fosfono; R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

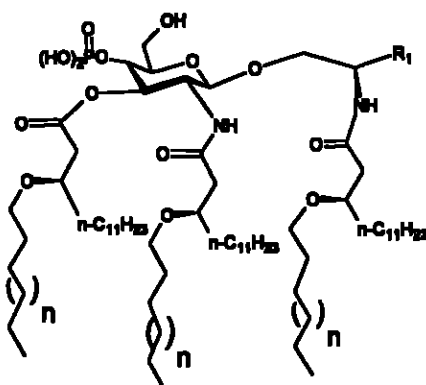
or una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0020] En versiones preferidas de compuestos (III) de la invención,

- X y Y son ambos de preferencia átomos de oxígeno; y
- R₁, R₂ y R₃, los cuales pueden ser iguales o distintos, de preferencia se seleccionan independientemente de grupos C₆ – C₁₄ alquilo de cadena recta, o de grupos C₆ – C₁₀ alquilo no sustituidos de cadena recta.

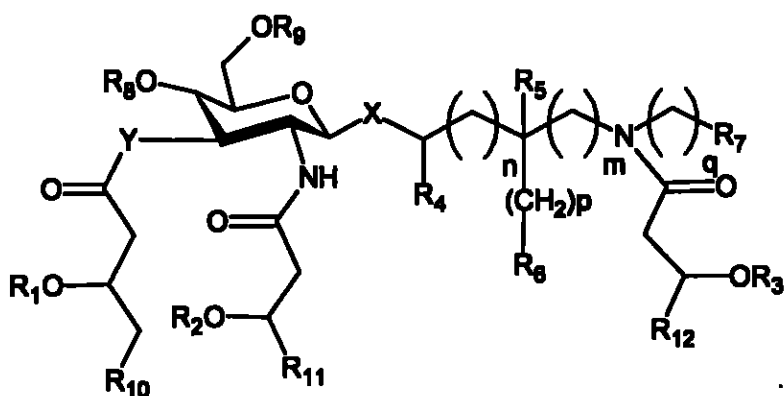
[0021] Los compuestos **18a,b** son elementos ejemplares de este grupo, que contienen tres éteres lipídicos secundarios (R₁-R₃):

2

18a = n = 1 (C₆ alquilo)18b = n = 5 (C₁₀ alquilo)R₁ = CH₂OPO₃H₂ o bien CO₂H

[0022]

Otro tipo de compuesto de la presente invención tiene la fórmula (IV):



(IV)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son grupos alifáticos saturados de cadena recta (es decir, grupos alquilo de cadena recta) que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ y R₅ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R₆ y R₇ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxilo, fosfónico, fosfonooxilo, sulfato, sulfonooxilo, amino, mercapto, ciano, nitrilo, formilo y carboxilo, y ésteres y amidas de los mismos; R₈ y R₉ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfónico y H, y por lo menos uno de R₈ y R₉ es fosfónico; R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

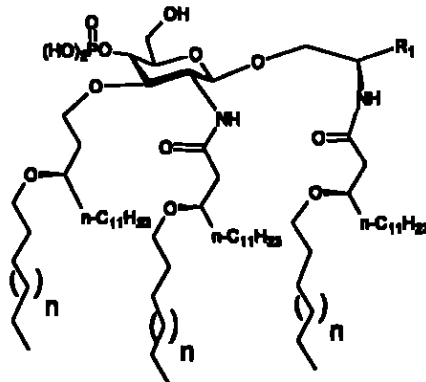
[0023]

En versiones preferidas de compuestos (IV) de la invención,

3

- X es de preferencia oxígeno ; y
- R_1 , R_2 y R_3 pueden ser iguales o distintos y más de preferencia se seleccionan independientemente de grupos C_6 - C_{14} alquilo de cadena recta o de grupos C_6 - C_{10} alquilo de cadena recta.

[0024] Los compuestos **20a,b** son elementos ejemplares de esta clase de compuestos.



20a = $n = 1$ (C_6 alquilo)

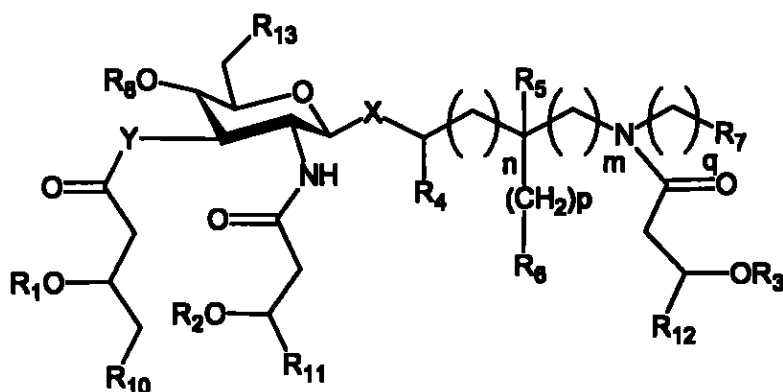
20b = $n = 5$ (C_{10} alquilo)

$R_1 = CH_2OPO_3H_2$ o bien CO_2H

[0025] Estos compuestos tienen atributos que les confieren resistencia a un metabolismo desfavorable o la hidrólisis acuosa. Se ha propuesto que la eliminación selectiva de los ácidos grasos normales de las moléculas estructuralmente diversas de lípido A por acción de la hidrolasa de acilooxiacilo humana (AOAH) para dar el antagonista lípido IVa ha evolucionado como un mecanismo de defensa para reducir la toxicidad del lípido A (Erwin y Munford., *J Biol Chem* 265(27): 16444-16449, 1990). No obstante, la mayor toxicidad del 3-D-MPL derivado naturalmente con respecto a la del principal componente hexaacilo probablemente se deba a la presencia de componentes menos altamente acilados con estructuras diferentes del lípido IVa (Ulrich y Myers, Monofosforil lipid A as an Adjuvant. Past experiences and new directions. En: *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*. Ed. Powell M.F., Newman M.J. Plenum Press, Nueva York, 1995; p. 495-524, Johnson et al., *J Med Chem*; 42:4640-4649, 1999). La variabilidad estructural en 3-D-MPL y otras preparaciones de lípido A surge de forma inherente del LPS análogo así como del fraccionamiento estérico durante los procedimientos semisintéticos y de aislamiento. En efecto, se ha informado que el fraccionamiento hidrolítico fácil de grupos acilo con enlaces estéricos durante la síntesis química de un lípido A putativo de *R. capsulatus*, un potente antagonista de la producción de $TNF-\alpha$ inducida por LPS, produce cantidades menores de subproductos agonistas indeseables (Christ et al., *Science*; 268:80-83, 1995). Así las cosas, la

inestabilidad química o enzimática puede ser el talón de aquiles de un posible fármaco basado en lípido A que contenga enlaces estéricos lábiles. La inestabilidad química y metabólica de los ácidos grasos con enlaces estéricos presente en las moléculas agonistas y antagonistas del lípido A ha sido superada con análogos hidrolíticamente estables portadores de enlaces etéricos en vez de los ácidos grasos primarios y secundarios con enlaces estéricos (Christ et al. supra, Lien et al., *J Biol Chem*; 276(3):1873-1880, 2001).

[0026] Otros compuestos de la presente invención tienen un grupo bloqueador 6-hidroxilo o un 6-sustituyente como flúor. Estos compuestos tienen la fórmula (V):



(V)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son residuos de acilo graso o grupos alifáticos saturados de cadena recta que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ y R₅ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R₆ y R₇ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxilo, fosfónico, fosfonoxilo, sulfónico, sulfoxilo, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxilo, y ésteres y amidas de los mismos; R₈ es fosfónico; R₁₃ es F ó O-PG; PG representa un grupo protector hidroxilo como se define más adelante, y R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0027] El término "grupo protector" (representado aquí por "PG") se refiere a cualquiera de entre un gran número de grupos empleados para reemplazar al hidrógeno de un grupo hidroxilo, para así bloquear, evitar o reducir la reactividad del grupo. Algunos ejemplos de grupos protectores (y un listado de las abreviaturas de uso frecuente para ellos) se pueden encontrar en T. W. Greene y P. G. Futs, "Protective Groups in Organic

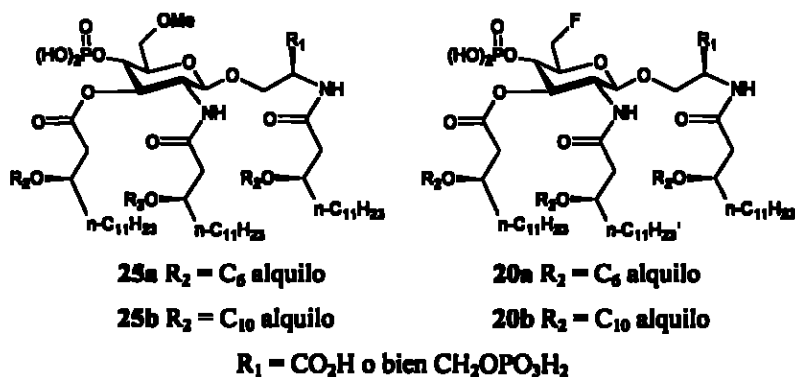
Chemistry" (Wiley), Beaucage y Iyer, *Tetrahedron* 48:2223 (1992) y Harrison et al, *Compendio of Sintético Organic Methods*, vols. 1-8 (Wiley). Los grupos protectores hidroxí representativos incluyen aquellos en los cuales el grupo hidroxí está o bien acilado o alquilado, como por la formación de éteres o ésteres usando, por ejemplo, grupos metilo, acetilo, bencilo, tritilo, alquilo, tetrahidropiraniilo, alilo o sililo trisustituidos.

[0028] La elección de un grupo protector para un compuesto, propósito o conjunto de condiciones dados se encuentra dentro de las destrezas de las personas versadas en la materia técnica correspondiente, y se hace con miras a proteger, de forma general o selectiva, al grupo reactivo en cuestión bajo las condiciones prevaecientes (presencia de otros compuestos reactivos, pH, temperatura, etc.). Los grupos protectores que pueden usar en la presente invención incluyen grupos metilo, ftaloilo, acetilo (Ac), bencilo (Bn), 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc), t-butildimetilsililo (TBS), t-butildifenilsililo (TBDPS), y 2,2,2-tricloro-1,1-dimetiletil cloroformilo (TCBOC). Como es conocido del estado de la técnica, un grupo protector o tipo de grupo dado puede ser más adecuado que otros para usar con compuesto en particular o en una situación dada, y se saca provecho de estas características apropiadas para desarrollar procesos que involucren compuestos con grupos reactivos como hidroxí.

[0029] En versiones preferidas de estos compuestos (V) de la invención,

- X y Y son de preferencia átomos de oxígeno; y
- R_1 , R_2 y R_3 son de preferencia grupos acilo o alquilo normales, y más de preferencia se seleccionan independientemente de grupos C_6 - C_{10} acilo de cadena recta.

[0030] Algunos elementos ejemplares de este grupo incluyen compuestos **25a,b** que tienen un éter metílico o compuestos **26a,b** que tienen un grupo flúor usado en conjunto con AGP serilo o serinol fosfato.



16

[0031] Un grupo C-6 azúcar hidroxilo no protegido grupo puede conllevar cantidades menores de contaminants durante la síntesis de derivados del lípido A que pueden ser difíciles de eliminar (Christ, supra). Estos subproductos probablemente surgen de la formación inicial de fosfato 4,6-cíclico y su consiguiente reordenamiento (Imoto et al., *Tetrahedron Lett*; 29(28):2227-2230, 1988).

[0032] Como se examina aquí, el término "alifático" ya sea solo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se diga lo contrario, una cadena recta o ramificada, o un radical de hidrocarburo cíclico, o una combinación de los mismos, los cuales pueden ser completamente saturados, mono- o poliinsaturados y pueden incluir radicales bi- y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Algunos ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen grupos como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alifático insaturado es aquel que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Algunos ejemplos de grupos alifáticos insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros más altos. Usualmente, un grupo alifático tendrá de 1 a 24 átomos de carbono. Un grupo "alifático bajo" es un grupo alifático de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono.

[0033] El término "acilo" se refiere a un grupo derivado de un ácido orgánico luego de la eliminación del grupo hidroxilo. Algunos ejemplos de grupos acilo incluyen acetilo, propionilo, dodecanoil, tetradecanoil, isobutirilo, y similares. Según esto, el término "acilo" tal como se usa en este documento significa que incluye un grupo que de otra forma se define como -C(O)-alifático, en donde el grupo alifático de preferencia es un grupo alifático saturado.

[0034] El término "sales farmacéuticamente aceptables" se usa para incluir sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos aquí descritos. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, las sales de adición de base se pueden obtener poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un solvente inerte adecuado. Algunos ejemplos de sales de

12

adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino o magnesio, o similares. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, las sales de adición de ácido se pueden obtener poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un solvente inerte adecuado. Algunos ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, carbónico monohidrogenado, fosfórico, fosfórico monohidrogenado, fosfórico dihidrogenado, sulfúrico, sulfúrico monohidrogenado, yodhídrico, o ácidos fosforosos y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, o láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al, "Pharmaceutical salts," *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19, 1977). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan ya sea en sales de adición de base o de ácido.

[0035] Las formas neutras de los compuestos se pueden regenerar poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto primario de la forma convencional. La forma primaria del compuesto difiere de las varias sales en ciertas propiedades físicas, como la solubilidad en solventes polares, pero de lo contrario las sales son equivalentes a la forma primaria del compuesto para propósitos de la presente invención.

[0036] Además de las sales, la presente invención proporciona compuestos que se encuentran en forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos aquí descritos son aquellos compuestos que fácilmente sufren cambios químicos en condiciones fisiológicas para dar los compuestos de la presente invención. Además, los profármacos se pueden convertir en los compuestos de la presente invención mediante métodos químicos o bioquímicos en un ambiente *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos se pueden convertir lentamente en los compuestos de la presente invención cuando se ponen en un reservorio de un parche transdérmico que tiene un reactivo enzimático o químico adecuado.

[0037] Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no

18
X

solvatadas así como en formas solvatadas, incluidas las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretende que queden comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretende que caigan dentro del alcance de la presente invención.

[0038] Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; se pretende que todos los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales caigan dentro del alcance de la presente invención.

[0039] Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que conforman dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radioactivos, como, por ejemplo, tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sean radioactivas o no, caigan dentro del alcance de la presente invención.

[0040] Los compuestos de la presente invención se pueden preparar por cualquier medio adecuado; véanse los Ejemplos en la siguiente sección, muchos de los cuales han sido descritos. Por ejemplo, los procesos para preparar ciertos compuestos útiles en la presente invención se describen en la Patente estadounidense No. 6,113,918; Patente estadounidense No. 6,303,347; y PCT/US98/09385 (WO 98/50300, 12 de octubre de 1998). Otros compuestos se pueden preparar usando métodos consignados en Johnson, et al., *J. Med. Chem.* 42:4640-4649 (1999), Johnson, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2273-2278 (1999), y PCT/US98/50399 (WO 98/50399, 12 de noviembre de 1998). En general, los métodos sintéticos descritos en las referencias arriba anotadas y otros métodos sintéticos de otra parte familiares para el estado de la técnica encuentran amplia aplicación en la preparación de estos compuestos. Por ejemplo, para hacer compuestos que tienen diferentes grupos acilo y sustituciones, la persona versada en la materia técnica correspondiente apreciará que los métodos convergentes allí descritos se pueden modificar para usar agentes acilantes alternativos, o se pueden iniciar con materiales comercialmente disponibles que tienen grupos acilo adecuados enlazados.

[0041] En composiciones para suscitar o reforzar una respuesta inmunitaria, los compuestos de la invención se administran a un animal de sangre caliente, incluida la especie humana, con un antígeno como un antígeno proteínico o polipeptídico o un

19

polinucleótido que expresa un antígeno proteínico o polipeptídico. La persona versada en la técnica puede determinar con facilidad la cantidad de antígeno que se debe administrar para suscitar una respuesta deseada y variará según el tipo de antígeno administrado, la vía de administración y el esquema de vacunación.

[0042] Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar sin un antígeno exógeno, para suscitar la protección inmediata a través de un efecto de resistencia inespecífico, como se describe más adelante; véase Persing et al., Publicación de la WIPO WO 01/90129 del 29 de noviembre de 2001. Los compuestos que tienen la capacidad de estimular la resistencia inespecífica o de suscitar un efecto adyuvante se pueden usar en la formulación de vacunas rápidas. La administración de compuestos de la presente invención con antígeno conduce a una respuesta inmunitaria mucosa adquirida dentro de las siguientes tres a cuatro semanas. La administración semanal de dichos compuestos, por vía intranasal, por ejemplo, en un periodo de cuatro semanas ofrecería una protección rápida y duradera al combinar la protección conferida por la respuesta inmunitaria innata inicial, seguida de la respuesta inmunitaria adquirida al antígeno de interés.

[0043] Los compuestos de la presente invención se pueden evaluar con diversas formas de examen de laboratorio y seleccionar aquellos que tengan las características que mejor se adapten a una aplicación dada de la invención. Por ejemplo, se pueden usar modelos animales para identificar y evaluar perfiles de liberación de citocinas a la circulación sistémica luego de la administración de un compuesto de la presente invención. Además, existen varios modelos *in vitro* y *in vivo* para examinar cambios en uno o más aspectos de una respuesta inmunitaria a diferentes componentes antigénicos con el fin de identificar compuestos mejor adaptados para suscitar una respuesta inmunitaria específica de interés. Por ejemplo, se puede poner en contacto un compuesto con células diana, como macrófagos, células dendríticas o células de Langerhans *in vitro*, y se pueden medir las citocinas elaboradas. Además, se pueden usar configuraciones de expresión de genes para identificar vías específicas activadas o inhibidas por un compuesto de interés en particular.

[0044] La inducción/producción de citocinas se puede determinar tratando sangre o células humanas con compuestos de la presente invención y midiendo la inducción con ELISA (R & D Systems). Estos métodos también se pueden usar para determinar si la inducción es dependiente del receptor de tipo "peaje". La respuesta citotóxica de los linfocito T luego de la administración de los compuestos de la presente invención se

20

determina mediante un examen de citotoxicidad basado en ^{51}Cr . Si se desea, el desempeño del compuesto de la invención a este respecto se puede comparar con otros compuestos de los que se sabe que son funcionales en este sentido, como lípido A, MPL, AGP o similares. Además, los compuestos de la invención se pueden evaluar en combinación con uno o más agentes adyuvantes o inmunomodulador para identificar efectos sinérgicos (véase, por ejemplo, las Patentes estadounidenses Nos: 6,303,347 y 6,113,918, y WO 01/90129, publicada el 29 de noviembre de 2001).

[0045] Modelos animales como el modelo murino de estimulación con influenza y el modelo murino de estimulación con *Listeria monocytogenes* son útiles para valorar la actividad adyuvante e inmunomoduladora. En pocas palabras, el compuesto se administra seguido de una estimulación con influenza o *L. monocytogenes*. El índice de enfermedad (pelaje erizado, postura encorvada y dificultad respiratoria), la pérdida de peso y la mortalidad, en el caso de la influenza, o el número de unidades formadoras de colonias en los bazo de los ratones tratados / no tratados, en el caso de la *L. monocytogenes* se vigilan como índices de protección conferida por la administración del compuesto de la invención (véase, por ejemplo, WO 01/90129 publicada el 29 de noviembre de 2001).

[0046] Tal como se usa en este contexto, el término "polipéptido" tiene su significado convencional, es decir, el de una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no están limitados a una longitud específica del producto; por ello, péptidos, oligopéptidos y proteínas caben dentro de la definición de polipéptido, y estos términos se pueden usar de forma intercambiable en el documento a menos que se diga específicamente lo contrario. Este término tampoco se usa para excluir modificaciones del polipéptido posteriores a la expresión como, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como para otras modificaciones conocida del estado de la técnica, tanto naturales como no naturales. Un polipéptido puede ser una proteína completa, o una secuencia secundaria de los mismos. Algunos polipéptidos de interés en el contexto de la presente invención son subsecuencias de aminoácidos que comprenden epítopes, es decir, determinantes antigénicos sustancialmente responsable de las propiedades inmunogénicas de un polipéptido y capaces de evocar una respuesta inmunitaria.

[0047] En ocasiones se hace referencia a los polipéptidos útiles de la presente invención como proteínas tumorales o polipéptidos tumorales, para indicar que su identificación se ha basada por lo menos en parte en sus niveles elevados de expresión

en muestras de tumor. De esta suerte, un "polipéptido tumoral" o una "proteína tumoral" se refieren generalmente a la secuencia polipeptídica de la presente invención, o una secuencia de polinucleótidos que codifican a dicho polipéptido, que se expresa en una proporción de muestras tumorales, por ejemplo, de preferencia más de cerca de 20%, más de preferencia más de cerca de 30%, y más de preferencia más de cerca de 50% o más de las muestras tumorales examinadas, en un nivel que es por lo menos dos veces, y de preferencia por lo menos cinco veces, mayor que el nivel de expresión en tejidos normales, que se determina usando un examen representativo aquí provisto.

{0048] En ciertas versiones preferidas, los polipéptidos de la invención son inmunogénicos, es decir, reaccionan en grado detectable dentro de un inmunoanálisis (como un análisis ELISA o de estimulación de células T) con antisueros o células T de un paciente con cáncer. La pesquisa de la actividad inmunogénica se puede llevar a cabo usando técnicas bien conocidas para el perito en la técnica. Por ejemplo, dichas pesquisas se pueden realizar usando métodos como los descritos en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En un ejemplo ilustrativo, un polipéptido se puede inmovilizar sobre un soporte sólido y se pone en contacto con suero del paciente para permitir la unión de los anticuerpos presentes en los sueros con el polipéptido inmovilizado. Los sueros no ligados entonces se eliminan y los anticuerpos ligados se detectan usando, por ejemplo, Proteína A marcada con ¹²⁵I.

{0049] Como será reconocido por la persona versada en la técnica, las porciones inmunogénicas de los polipéptidos aquí revelados también están abarcados por la presente invención. Una "porción inmunogénica" como se usa en este documento, es un fragmento de un polipéptido inmunogénico de la invención que en sí mismo es inmunológicamente reactivo (es decir, que se une específicamente) con las células B o con receptores del antígeno de superficie de la célula T que reconocen al polipéptido. Las porciones inmunogénicas en general se puede identificar usando técnicas bien conocidas, como las resumidas en Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª Ed., 243-247 (Raven Press, 1993) y las referencias aquí citadas. Dichas técnicas incluyen investigar en los polipéptidos la capacidad de reaccionar con anticuerpos, antisueros o líneas o clones de células T específicos del antígeno. Como se usa en este contexto, los antisueros y anticuerpos son "específicos del antígeno" cuando específicamente se unen a un antígeno (es decir, reaccionan con la proteína en un examen de ELISA o en otro inmunoanálisis, y no lo hacen de forma detectable con proteínas no emparentadas). Dichos antisueros y anticuerpos se pueden preparar como se describe aquí, y usando

22 

técnicas bien conocidas.

[0050] En una versión preferida, una porción inmunogénica de un polipéptido de la presente invención es una porción que reacciona con antisueros o células T en un nivel que no es sustancialmente menor que la reactividad del polipéptido de longitud completa (p.ej., en un examen de ELISA o de reactividad de células T). De preferencia, el nivel de actividad inmunogénica de la porción inmunogénica es por lo menos cercano a 50%, de preferencia por lo menos cercano a 70% y más de preferencia más de cerca de 90% de la inmunogenicidad del polipéptido de longitud completa. En algunos casos, se identificarán porciones inmunogénicas preferidas que tienen un nivel de actividad inmunogénica mayor que el del correspondiente polipéptido de longitud completa, p.ej., tienen más de cerca de 100% o 150% o más de actividad inmunogénica.

[0051] En ciertas otras versiones, las porciones inmunogénicas ilustrativas pueden incluir péptidos en los cuales se ha borrado una secuencia líder N-terminal o un dominio de transmembrana. Otras porciones inmunogénicas ilustrativas contendrán una pequeña delección N- o C-terminal (p.ej., 1-30 aminoácidos, de preferencia 5-15 aminoácidos), con respecto a la proteína madura.

[0052] En otra versión, una composición de polipéptido de la invención puede también comprender uno o más polipéptidos que son inmunológicamente reactivos con células T o con anticuerpos generados contra un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos revelada aquí, o con un fragmento inmunogénico o variante de los mismos.

[0053] En otra versión de la invención, se proporcionan polipéptidos que comprenden uno o más polipéptidos capaces de suscitar células T o anticuerpos que son inmunológicamente reactivos con uno o más polipéptidos de los aquí descritos, o uno o más polipéptidos codificados por secuencias contiguas de ácidos nucleicos contenidas en los polinucleótidos aquí revelados, o fragmento inmunogénicos o variantes de los mismos.

[0054] Los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, la cual dirige de forma co-de traducción o post-de traducción la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede estar conjugado a un enlazador u otra secuencia para los casos de síntesis, purificación o identificación del polipéptido (p.ej., poli-His), o para reforzar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede estar conjugado a la región Fe de una inmunoglobulina.

23

[0055] Dentro de otras versiones ilustrativas, un polipéptido puede ser un polipéptido de fusión que comprende múltiples polipéptidos como los aquí descritos, o que comprende por lo menos un polipéptido como los aquí descritos y una secuencia no relacionada, como una proteína tumoral conocida. Un socio de fusión puede, por ejemplo, ayudar a proporcionar epítopes T cooperadores (un socio de fusión inmunológico), de preferencia epítopes de T cooperadores reconocidos por los seres humanos, o puede ayudar a expresar la proteína (un reforzador de expresión) en producidos más altos que la proteína recombinante nativa. Ciertos socios de fusión preferidos son a la vez socios de fusión inmunológicos y reforzadores de expresión. Otros socios de fusión se pueden seleccionar para que incrementen la solubilidad del polipéptido o habiliten al polipéptido para que sea elegido como diana por compartimientos intracelulares deseados. Otros socios de fusión incluyen marbetes de afinidad, los cuales facilitan la purificación del polipéptido.

[0056] Los polipéptidos de fusión en general se pueden preparar usando técnicas estándar que incluyen la conjugación química. De preferencia, un polipéptido de fusión se expresa como un polipéptido recombinante, lo cual permite la producción de niveles elevados, con respecto a un polipéptido no fusionado, en un sistema de expresión. En breves palabras, las secuencias de ADN que codifican los componentes del polipéptido se pueden ensamblar por separado, y ligar en un vector de expresión adecuado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica a un componente polipeptídico está ligado, con o sin un eslabonador de péptidos, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica al segundo componente polipeptídico de manera que los cuadros de lectura de las secuencias se encuentran en fase. Esto permite la traducción en un único polipéptido de fusión que retiene la actividad biológica de ambos componentes polipeptídicos.

[0057] Se puede emplear una secuencia enlazadora de péptidos para separar al primero y el segundo componentes polipeptídicos una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y terciaria. Dicha secuencia enlazadora de péptidos se incorpora al polipéptido de fusión usando técnicas estándar bien conocidas del estado de la técnica. Las secuencias enlazadoras de péptidos adecuadas se pueden elegir con base en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pudiera interactuar con epítopes funcionales en el primero y segundo polipéptidos; y (3) la ausencia de residuos hidrófobos o cargados que pudiesen

nck

reaccionar con los epítopos funcionales del polipéptido. Las secuencias enlazadoras de péptidos preferibles contienen residuos de Gli, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutros, como treonina y alanina también se pueden usar en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que se pueden usar con provecho como enlazadoras incluyen las reveladas en Maratea et al., *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:8258-8262, 1986; Patente estadounidense WO 4,935,233 y Patente estadounidense No. 4,751,180. La secuencia enlazadora generalmente puede tener de 1 a cerca de 50 aminoácidos de longitud. Las secuencias enlazadoras no se necesitan cuando el primer y el segundo polipéptidos tienen regiones N-terminales de aminoácidos no esenciales que se pueden usar para separar los dominios funcionales e impedir la interferencia estérica.

[0058] Las secuencias ligadas de ADN se vinculan de forma operativa a elementos adecuados de regulación de la transcripción o la traducción. Los elementos reguladores responsables de la expresión del ADN se localizan únicamente en 5' de la secuencia de ADN que codifica a los primeros polipéptidos. De manera parecida, los codones de detención que se requieren para finalizar las señales de terminación de la traducción y la transcripción sólo están presentes 3' de la secuencia de ADN que codifica al segundo polipéptido.

[0059] El polipéptido de fusión puede comprender un polipéptido como el que se describe aquí junto con una proteína inmunogénica no emparentada, como una proteína inmunogénica capaz de evocar una respuesta de memoria. Algunos ejemplos de dichas proteínas incluyen las proteínas del tétano, la tuberculosis y la hepatitis (véase, por ejemplo, Stoute et al. *New Engl. J. Med.*, 336:86-91, 1997).

[0060] En una versión preferida, el socio de fusión inmunológico se deriva de un *Mycobacterium* sp., como un fragmento Ra12 derivado del *Mycobacterium tuberculosis*. Las composiciones Ra12 y los métodos para su uso en el reforzamiento de la expresión o la inmunogenicidad de secuencias heterólogas de polinucleótido/polipéptido se describe en la Solicitud de Patente estadounidense 60/158,585. En pocas palabras, Ra12 se refiere a una región del polinucleótido que es una subsecuencia en un ácido nucleico MTB32A del *Mycobacterium tuberculosis*. El MTB32A una proteasa de serina de 32 KD de peso molecular codificada por un gen en cepas virulentas y no virulentas de *M. tuberculosis*. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de MTB32A han sido descritas (por ejemplo, Solicitud de Patente estadounidense 60/158,585; véase también, Skeiky et al, *Infection and Immun.* (1999) 67:3998-4007). Los fragmentos C -terminales

25 

de la secuencia que codifica al MTB32A se expresan en niveles altos y permanecen como polipéptidos solubles después del proceso de purificación. Además, el Ra12 puede intensificar la inmunogenicidad de los polipéptidos inmunogénicos heterólogos con los cuales se fusiona. Un polipéptido de fusión Ra12 preferido comprende un fragmento C-terminal de 14 KD que corresponde a los residuos de aminoácidos 192 a 323 de MTB32A. Otros polinucleótidos Ra12 preferidos generalmente comprenden por lo menos cerca de 15 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 30 nucleótidos, por lo menos alrededor de 60 nucleótidos, por lo menos alrededor de 100 nucleótidos, por lo menos alrededor de 200 nucleótidos, o por lo menos alrededor de 300 nucleótidos que codifican una porción de un polipéptido Ra12. Los polinucleótidos Ra12 pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica al polipéptido Ra12 o una porción de los mismos) o puede comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos Ra12 pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones o inserciones de manera que la actividad biológica del polipéptido de fusión codificado no se ve sustancialmente disminuida, con respecto a un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido Ra12 nativo. Las variantes de preferencia exhiben por lo menos alrededor de 70% de identidad, más de preferencia por lo menos alrededor de 80% de identidad y más de preferencia por lo menos alrededor de 90% de identidad con una secuencia de polinucleótidos que codifica a un polipéptido Ra12 nativo o una porción del mismo.

[0061] Dentro de otras versiones preferidas, un socio de fusión inmunológico se deriva de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa *Haemophilus influenza B* (WO 91/18926). De preferencia, un derivado de la proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (p.ej., los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales), y un derivado de la proteína D puede estar lipidado. Dentro de ciertas versiones preferidas, los primeros 109 residuos de un socio de fusión de la Lipoproteína D se incluye en el extremo N-terminal para proporcionar un polipéptido con epítopos exógenos adicionales a la célula T y para aumentar el nivel de expresión en la *E. coli* (funcionando así como un intensificador de expresión). La cola lipídica asegura la óptima presentación del antígeno a las células presentadoras de antígeno. Otros socios de fusión incluyen la proteína no estructural del virus de la influenza, NS1 (hemaglutinina). Por lo general se usan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque se pueden usar diferentes fragmentos que incluyen a los epítopos de las células T cooperadoras.

26 

[0062] En otra versión, el socio de fusión inmunológico es la proteína conocida como LYTA, o una porción de la misma (de preferencia una porción C-terminal). La LYTA se deriva del *Streptococcus pneumoniae*, el cual sintetiza una amidasa de N-acetil-L-alanina conocida como la amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; *Gene* 43:265-292, 1986). La LYTA es una autolisina que específicamente degrada ciertos enlaces de la estructura principal del peptidoglucano. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable por la afinidad por la colina o por algunos análogos de la colina como DEAE. Esta propiedad ha sido explotada para el desarrollo de plásmidos que expresan la C-LYTA del *E. coli* útiles para la expresión de proteínas de fusión. La purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en el extremo amino ha sido descrita (véase *Biotechnology* 70:795-798, 1992). Dentro de una versión preferida, una porción repetida de la LYTA se puede incorporar a un polipéptido de fusión. Una porción repetida se encuentra en la región C-terminal a partir del residuo 178. Una porción repetida particularmente preferida incorpora los residuos 188-305.

[0063] Otra versión ilustrativa involucra polipéptidos de fusión, y los polinucleótidos que los codifican, en donde el socio de fusión comprende una señal de reconocimiento capaz de dirigir a un polipéptido al compartimiento endosómico/lisosómico, como se describe en la Patente estadounidense No. 5,633,234. Un polipéptido inmunogénico de la invención, cuando se fusiona con esta señal de reconocimiento, se asociará de modo más eficiente con las moléculas MHC de clase II y con ello proporcionará estimulación intensificada *in vivo* de las células T CD4⁺ específicas del polipéptido.

[0064] Los polipéptidos de la invención se preparan usando cualquiera de entre una amplia gama de técnicas sintéticas o recombinantes bien conocidas. Los polipéptidos, las porciones y otras variantes generalmente de menos de cerca de 150 aminoácidos se pueden generar por medios sintéticos, usando técnicas bien conocidas para la persona medianamente versada en la técnica. En un ejemplo ilustrativo, esos polipéptidos se sintetizan usando cualquiera de las técnicas de fase sólida disponibles comercialmente, como el método de síntesis de fase sólida de Merrifield, en el cual se añaden aminoácidos de forma secuencial a una cadena creciente de aminoácidos. Véase Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 55:2149-2146, 1963. Los equipos para la síntesis automatizada de polipéptidos están disponibles comercialmente con proveedores como Perkin Ehner/Aplied BioSystems Division (Foster City, CA), y se pueden operar conforme a las instrucciones del fabricante.

[0065] En general, las composiciones polipeptídicas (incluidos los polipéptidos de fusión) de la invención son aislados. Un polipéptido "aislado" es aquel que es extraído de su ambiente original. Por ejemplo, una proteína o polipéptido natural es aislado si está separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. De preferencia, estos polipéptidos también son purificados, p.ej., son por lo menos alrededor de 90% puros, más de preferencia por lo menos alrededor de 95% puros y más de preferencia por lo menos alrededor de 99% puros.

[0066] La presente invención, en otros aspectos, proporciona compuestos que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican a un antígeno polipeptídico como se establece más arriba. Los términos "ADN" y "polinucleótido" se usan de forma esencialmente intercambiable en el presente documento para hacer referencia a una molécula de ADN que ha sido aislada libre del ADN genómico total de una especie en particular. "Aislada," como se usa en este contexto, significa que un polinucleótido se encuentra sustancialmente alejado de otras secuencias codificadoras, y que la molécula de ADN no contiene grandes porciones de ADN codificador no emparentado, como grandes fragmentos cromosómicos u otros genes funcionales o regiones codificadoras de polipéptidos. Por supuesto, esto hace relación a la molécula de ADN tal como se aísla originalmente, y no excluye a los genes o regiones codificadoras que más adelante se añadan al segmento por mano del hombre.

[0067] Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido/proteína de la invención o una porción de los mismos) o puede comprender una secuencia que codifica una variante o derivado, de preferencia y una variante o derivado inmunogénicos, de dicha secuencia. Por lo general, las variantes de polinucleótidos contendrán una o más sustituciones, adiciones, deleciones o inserciones, de preferencia de modo que la inmunogenicidad del polipéptido codificado por la variante del polinucleótido no se disminuye sustancialmente con respecto a un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos específicamente estipulada en este documento). También se entenderá que el término "variante" abarca genes homólogos de origen xenogénico.

[0068] En ciertas versiones preferidas, los polinucleótidos arriba descritos, p.ej., variantes, fragmentos y secuencias de hibridización de polinucleótidos, codifican polipéptidos que inmunológicamente reaccionan cruzadamente con un polipéptido antigénico o inmunogénico como se estipuló arriba. En otras versiones preferidas, dichos polinucleótidos codifican polipéptidos que tienen un nivel de actividad inmunogénica de

28

por lo menos alrededor de 50%, de preferencia por lo menos alrededor de 70%, y más de preferencia por lo menos alrededor de 90% de la de una secuencia polipeptídica específicamente estipulada en este documento.

[0069] Los polinucleótidos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, cualquiera que sea la longitud de la secuencia codificadora misma, se pueden combinar con otras secuencias de ADN, como promotores, señales de poliadenilación, sitios enzimáticos de restricción adicional, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificadores y similares, de manera que su longitud general puede variar en grado considerable. Por tanto, se contempla que se puede usar un fragmento de ácido nucleico de prácticamente cualquier longitud, siendo que la longitud total de preferencia se limita por la facilidad de preparación y uso en el protocolo pretendido de ADN recombinante. Por ejemplo, se contemplan segmentos ilustrativos de polinucleótido con longitudes totales de cerca de 10,000, cerca de 5000, cerca de 3000, cerca de 2,000, cerca de 1,000, cerca de 500, cerca de 200, cerca de 100, cerca de 50 pares de bases de longitud, y similares, (incluidas todas las longitudes intermedias) como útiles en numerosas versiones de la presente invención.

[0070] Las composiciones de polinucleótidos de la presente invención se pueden identificar, preparar o manipular usando cualquiera de entre una amplia gama de técnicas bien establecidas (véase, en general, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y otras referencias similares). Por ejemplo, un polinucleótido puede ser identificado, como se describe en más detalle más adelante, tamizando una micromatriz de ADNc de expresión asociada a tumor (es decir, la expresión que es por lo menos dos veces mayor en un tumor que en el tejido normal, como se determina usando un análisis representativo que se proporciona en este documento). Estos tamizajes se pueden llevar a cabo, por ejemplo, usando la tecnología de micromatriz de Afymetrix, Inc. (Santa Clara, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante (y esencialmente como se describe en Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10614-10619, 1996 y Heller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2150-2155, 1997). Como alternativa, los polinucleótidos se pueden amplificar de ADNc preparado de células que expresan las proteínas aquí descritas, como células tumorales.

[0071] Se dispone de muchos procesos dependientes de plantilla para amplificar una secuencia diana de interés presente en una muestra. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es el de la reacción en cadena de polimerasa (PCR™) la

29 

cual se describe en detalle en las Patentes estadounidenses Nos. 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159. En pocas palabras, en la PCR™, se preparan dos secuencias iniciadoras que son complementarias con regiones situadas en hebras complementarias opuestas de la secuencia diana. Se añade un exceso de trifosfatos de desoxi nucleósido a una mezcla de reacción junto con una polimerasa de ADN (p.ej., polimerasa Taq). Si la secuencia diana se encuentra presente en una muestra, los iniciadores se enlazan a la diana y la polimerasa hará que los iniciadores se extiendan a lo largo la secuencia diana añadiéndose a los nucleótidos. Elevando y bajando la temperatura de la mezcla de reacción, los iniciadores extendidos se disociarán de la diana para formar productos de reacción, el exceso de iniciadores se unirá a la diana y al producto de reacción y el proceso de repite. De preferencia se puede llevar a cabo el procedimiento de transcripción reversa y amplificación de la PCR™ con el fin de cuantificar la cantidad de ARNm amplificada. Las metodologías de reacción en cadena de polimerasa son bien conocidas del estado de la técnica.

[0072] Otros varios procesos dependientes de plantilla, muchos de los cuales son variaciones de la técnica de amplificación de la PCR™, ya son conocidos y están disponibles en el estado de la técnica. A manera de ilustración, algunos de esos métodos incluyen la reacción en cadena de ligasa (LCR por sus siglas en inglés), descrita, por ejemplo, en la publicación de solicitud europea de patente No. 320,308 y Patente estadounidense No. 4,883,750; replicasa Qbeta, descrita en Publicación PCT de solicitud de patente internacional No. PCT/US87/00880; amplificación de desplazamiento de hebra (SDA en inglés) y reacción de reparación en cadena (RCR en inglés). Otros métodos de amplificación se describen en la publicación de solicitud británica de patente No. 2,202 328, y en la publicación de solicitud internacional de patente No. PCT/US89/01025. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS en inglés) (publicación de solicitud internacional de patente PCT No. WO 88/10315), incluida la amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y 3SR. La publicación de solicitud europea de patente No. 329,822 describe un proceso de amplificación de ácidos nucleicos que involucra la síntesis cíclica de ARN de hebra única ("ARNss"), ADNss, y ADN de doble hebra (ADNds). La publicación de solicitud internacional de patente No. WO 89/06700 describe un esquema de amplificación de secuencia de ácidos nucleicos basado en la hibridización de una secuencia promotora/iniciadora a un ADN diana de hebra única ("ADNss") seguido de la transcripción de muchas copias de ARN de la

30

secuencia. Otros métodos de amplificación como "RACE" (Frohman, 1990), y "PCR de un solo lado" (Ohara, 1989) también son bien conocidas del estado de la técnica.

[0073] Una porción amplificada de un polinucleótido de la presente invención se puede usar para aislar un gen de longitud total de una biblioteca adecuada (p.ej., una biblioteca de ADNc tumoral) usando técnicas bien conocidas. Dentro de dichas técnicas, se tamiza una biblioteca (ADNc o genómica) usando una o más sondas o iniciadores de polinucleótido adecuados para amplificación. De preferencia, se selecciona el tamaño de la biblioteca para que incluya moléculas más grandes. Las bibliotecas cebadas al azar también se pueden preferir para identificar 5' y regiones de genes corriente arriba. Las bibliotecas genómicas se prefieren para obtener intrones y secuencias 5' de extensión.

[0074] En cuanto a las técnicas de hibridización, se puede marcar una secuencia parcial (p.ej., mediante traducción de muesca o marcación con ^{32}P) usando técnicas bien conocidas. Entonces se tamiza generalmente una biblioteca bacteriana o de bacteriófago mediante la hibridización de filtros que contienen colonias bacterianas desnaturalizadas (o prados que contienen placas de fagos) con la sonda marcada (véase Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Las colonias o placas de hibridización se seleccionan y amplían, y el ADN se aísla para análisis ulterior. Los clones de ADNc se pueden analizar para determinar la cantidad de secuencia adicional mediante, por ejemplo, PCR usando un iniciador de la secuencia parcial y un iniciador del vector. Se pueden generar mapas de restricción y secuencias parciales para identificar uno o más clones traslapados. Entonces se puede determinar la secuencia completa usando técnicas estándar, que pueden incluir la generación de una serie de clones de delección. Las secuencias traslapadas resultantes se pueden ensamblar en una secuencia contigua única. Una molécula de ADNc de longitud completa se puede generar ligando fragmentos adecuados, usando técnicas bien conocidas.

[0075] Como alternativa, las técnicas de amplificación, como las arriba descritas, pueden ser útiles para obtener una secuencia codificadora de longitud completa de una secuencia parcial de ADNc. Una de dichas técnicas de amplificación es la PCR inversa (véase Triglia et al, *Nucl. Acids Res.* 75:8186,1988), para la cual se usan enzimas de restricción para generar un fragmento en la región conocida del gen. El fragmento entonces se circulariza mediante enlace intramolecular y se usa como plantilla para la PCR con iniciadores divergentes derivados de la región conocida. En un enfoque alternativo, las secuencias adyacentes a una secuencia parcial se pueden recuperar

mediante amplificación con un iniciador a una secuencia enlazadora y un iniciador específico de una región conocida. Las secuencias amplificadas se suelen someter a una segunda ronda de amplificación con el mismo iniciador enlazador y un segundo iniciador específico de la región conocida. Una variación de este procedimiento, que usa dos iniciadores que inician la extensión en direcciones opuestas de la secuencia conocida, se describe en WO 96/38591. Otra de estas técnicas se conoce como "amplificación rápida de extremos de ADNc" (RACE por sus siglas en inglés). Esta técnica involucra el uso de un iniciador interno y un iniciador externo, los cuales se hibridizan a una región poliA o secuencia vectora, para identificar secuencias que son 5' y 3' de una secuencia conocida. Otras técnicas incluyen la PCR de captura (Lagerstrom et al, *PCR Methods Applic.* 1:111-19, 1991) y la PCR caminante (Parker et al., *Nucl. Acids. Res.* 79:3055-60, 1991). Otros métodos que emplean la amplificación también se pueden emplear para obtener una secuencia de ADNc de longitud completa.

[0076] En ciertos casos, es posible obtener una secuencia de ADNc de longitud completa mediante el análisis de secuencias proporcionadas en una base de datos de etiquetas de secuencias expresadas (EST), como la que ofrece GenBank. Las búsquedas de EST traslapadas se puede llevar a cabo en general usando programas bien conocidos (p.ej., búsquedas NCBI BLAST), y estas EST se pueden usar para generar una secuencia contigua de longitud completa. Las secuencias de ADN de longitud completa también se pueden obtener mediante el análisis de fragmentos genómicos.

[0077] En otras versiones de la invención, las secuencias de polinucleótidos o fragmentos de las mismas que codifican polipéptidos estipulados arriba, o proteínas de fusión o equivalentes funcional de las mismas, se pueden usar en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido en células huésped adecuadas. Debido a la degradación inherente del código genético, se pueden producir otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos o una o a funcionalmente equivalente y estas secuencias se pueden usar para clonar y expresar un polipéptido dado.

[0078] Las secuencias que codifican un polipéptido deseado se pueden sintetizar, en todo o en parte, usando métodos químico bien conocidos del estado de la técnica (véase Caruthers, M. H. et al. (1980) *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, Horn, T. et al. (1980) *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232).

[0079] Con el fin de expresar un polipéptido deseado, se pueden insertar las secuencias de nucleótidos que codifican al polipéptido, o equivalentes funcionales,

AV
7

dentro de un vector de expresión adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada. Se pueden usar métodos bien conocidos de la persona versada en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican a un polipéptido de interés y elementos de control de transcripción y traducción adecuados. Estos métodos incluyen técnicas *in vitro* de ADN recombinante, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

[0080] Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector—intensificadores, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas—que interactúan proteínas de las células del huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su potencia y especificidad. Dependiendo del sistema vector y del huésped utilizado, se puede usar cualquier número de elementos adecuados para transcripción y traducción, incluidos los promotores constitutivos e inducibles.

[0081] En las células de mamíferos hay varios sistemas de expresión basados en virus generalmente disponibles. Por ejemplo, en los casos en que se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden ligarse a un complejo de transcripción/traducción del adenovirus compuesto por el último promotor y la secuencia tripartita líder. La inserción en una región no esencial E1 ó E3 del genoma viral se puede usar para obtener un virus viable capaz de expresar el polipéptido en células infectadas del huésped (Logan, J. y Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57:3655-3659). Además, los intensificadores de transcripción, como el intensificador del virus del sarcoma de Rous (RSV), se pueden usar para aumentar la expresión en células del mamífero huésped.

[0082] También se pueden usar señales de iniciación específicas para alcanzar una traducción más eficiente de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Dichas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En los casos de las secuencias que codifican al polipéptido, su codón de iniciación, y las secuencias corriente arriba se insertan en el vector de expresión adecuado, puede que no se necesiten más señales de control de transcripción o traducción. Con todo, en los casos en los cuales sólo se inserta la secuencia codificadora, o una porción de la misma, se

Am

deben proporcionar señales exógenas de control de traducción incluido el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el cuadro de lectura correcto para asegurar la traducción de todo el inserto. Los elementos de traducción y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de intensificadores que son adecuados para un sistema celular en particular empleado, como los descritos en la bibliografía (Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl Cell Differ.* 20:125-162).

[0083] Hay varios protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, usando ya sean anticuerpos policlonales o monoclonales específicos del producto que son conocidos del estado de la técnica. Algunos ejemplos incluyen análisis de inmunosorbencia ligado a enzimas (ELISA en inglés), radioinmunoanálisis (RTA), y clasificación de células activadas con fluorescencia (FACS). Un inmunoanálisis de dos sitios basado en anticuerpos monoclonales que reaccionan contra dos epítopes sin interferencia en un polipéptido dado se puede preferir para algunas aplicaciones, pero también se puede usar un análisis de unión competitiva. Estos y otros métodos están descritos, entre otros, en Hampton, R. et al. (1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul. Minn.) y Maddox, D. E. et al. (1983; *J. Exp. Med.* 755:1211-1216).

Composiciones farmacéuticas y métodos

[0084] Se entenderá que, si se desea, compuestos aquí revelados se pueden administrar en combinación con otras modalidades terapéuticas, como compuestos o terapias antimicrobianos, antivirales y antimicóticos, diversos agentes terapéuticos basados en ADN, terapéuticos basados en ARN, terapéuticos basados en polipéptidos y con otros inmunoefectores. En efecto, prácticamente cualquier otro componente también se puede incluir, dado que el o los componentes adicionales no causan un efecto adverso significativo al entrar en contacto con las células diana o los tejidos del huésped. Por ello, las composiciones se pueden dar al mismo tiempo con otros varios agentes que se necesiten o deseen para la o las versiones específicas de la invención que se está llevando a la práctica. A manera de ilustración, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir, o se pueden usar en conjunto con un ADN que codifica a una o más proteínas terapéuticas, ARNs de sentido inverso, ribozimas o similares.

[0085] En un aspecto, los compuestos de la invención y las composiciones que los comprenden se pueden administrar junto con un antígeno, para dar un efecto adyuvante o intensificador del antígeno, es decir, para intensificar la respuesta

34

inmunitaria del paciente o sujeto. En otro aspecto, los compuestos y composiciones de la invención se administran en ausencia de antígeno exógeno, para el efecto terapéutico del compuesto mismo.

[0086] En otro aspecto, en donde el compuesto o la composición se administra sin antígeno exógeno, la presente invención proporciona métodos para tratar, aminorar o prevenir en grado sustancial enfermedades infecciosas en sujetos eucarióticos, particularmente en animales, de preferencia en seres humanos. Dada la importancia de las señales mediadas por TLR para la respuesta inmunitaria innata al desafío microbiano, la capacidad de estimular dichas vías de forma selectiva y con mínima toxicidad supone un poderoso enfoque para las modalidades profilácticas o terapéuticas de tratamiento contra una amplia gama de agentes infecciosos.

[0087] Los métodos aquí descritos se pueden aplicar prácticamente contra cualquier tipo de agente infeccioso, incluidas bacterias, virus, parásitos y hongos. A manera de ilustración, la invención es útil para la profilaxis o el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por especies de *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Candida*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* y muchas otras. Los problemas virales ilustrativos que se pueden tratar conforme a la invención incluyen aquellos causados, por ejemplo, por virus de Influenza, Adenovirus, parainfluenza, rinovirus, virus sincicial respiratorio, Herpes, Citomegalovirus, Hepatitis, p.ej., virus de las Hepatitis B y C, y otros. Algunos hongos a manera de ilustración incluyen, por ejemplo, *Aspergillus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, y otros.

[0088] En una versión ilustrativa, la invención proporciona métodos que se pueden usar en sujetos, especialmente sujetos inmunocomprometidos que están sufriendo o corren el riesgo de sufrir infecciones bacterianas y virales nosocomiales. Cerca de 2 millones de los 40 millones de individuos que se hospitalizan cada año sufren de una infección nosocomial durante su estancia y 1% de estos, es decir, cerca de 400.000 pacientes, presenta una neumonía nosocomial, más de 7.000 de los cuales fallecen. Esto convierte a la neumonía nosocomial en una de las principales causas de muerte por infecciones adquiridas en el hospital. Así las cosas, esta versión satisface una importante necesidad de contar con abordajes profiláctico efectivos al tratamiento de las infecciones nosocomiales.

[0089] En una versión relacionada, la presente invención proporciona abordajes profilácticos para pacientes inmunocomprometidos, como pacientes con infección por



VIH, que tienen neumonía o corren el riesgo de infectarse ya sea por un germen oportunista o por la reactivación de una infección suprimida o latente. En 1992 se informaron cerca de 20.000 casos de infecciones por *Pneumocystis carinii* en pacientes con sida sólo en los Estados Unidos. Además, 60-70% de los pacientes con sida adquieren una infección por *P. carinii* en algún punto durante el curso de la enfermedad. Así las cosas, la presente invención en esta versión proporciona métodos profilácticos efectivos para esta población de alto riesgo.

[0090] En otra versión relacionada, los métodos de la presente invención se usan para tratar a otras poblaciones de paciente que pueden estar inmunocomprometidos o que corren el riesgo de presentar enfermedades infecciosas, incluidos, por ejemplo, pacientes con fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y otros pacientes inmunocomprometidos o institucionalizados.

[0091] En otro aspecto de la invención, los compuestos y composiciones de la invención se emplean (sin antígeno exógeno) en métodos para tratar, mejorar o sustancialmente prevenir trastornos y enfermedades alérgicas, como sinusitis, rinosinusitis crónica, asma, dermatitis atópica y psoriasis. Este abordaje se basa por lo menos en parte en la capacidad de los compuestos de activar la producción de citocinas de células diana que pueden competir con respuestas citocinas de estereotípicas de tipo alérgico caracterizadas por la producción de IL-4 o hiperreactividad a la IL-4. La administración de algunos de los mono- y disacáridos aquí revelados da lugar a la expresión de IFN-gamma e IL-12 a partir de células procesadoras y presentadoras de antígeno, así como de otras células, lo cual da lugar a la regulación descendente de las citocinas asociadas con respuestas alérgicas como IL-4, 5, 6, 10 y 13.

[0092] Todavía en otro aspecto de la invención, los compuestos y composiciones de la invención se emplean (sin antígeno exógeno) en métodos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunes. Los compuestos que se usan en ésta se seleccionarán normalmente de entre aquellos capaces de antagonizar, inhibir o de otra forma modular negativamente uno o más receptores de tipo "peaje", en especial Tlr2 o Tlr4, de manera que una respuesta autoinmune asociada con un padecimiento dado se mejora o se previene en grado sustancial. A manera de ilustración, los métodos proporcionados en esta versión se pueden usar en el tratamiento de problemas como enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, artritis crónica, esclerosis múltiple y psoriasis.

[0093] Los compuestos de la invención también se pueden usar como adyuvantes e inmunoefectores que intensifican la generación de anticuerpos en animales inmunizados,

36

estimulan la producción de citocinas y estimulan una respuesta inmunitaria mediada por células, incluida la respuesta de linfocitos T citotóxicos.

[0094] En métodos conforme a la invención, por ejemplo, para efectuar la respuesta inmunitaria de un individual, los compuestos y composiciones de la invención se pueden formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección o ingestión. Como se usa en este contexto, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un medio que no interfiere con la actividad inmunomoduladora del ingrediente activo y no es tóxica para el paciente a quien se le administra. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, composiciones acuosas, liposomas, microcuentas y microsomas. Por ejemplo, el vehículo puede ser una microesfera o micropartícula que tiene un compuesto de la presente invención dentro de la matriz de la esfera o partícula o adsorbido sobre la superficie de la esfera o partícula. El vehículo también puede ser una solución acuosa o una dispersión micelar que contiene trietilamina, trietanolamina u otro agente que vuelve a la formulación alcalina, o una suspensión que contiene hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, fosfato de calcio o adsorbato de tirosina. Los vehículos también pueden incluir a todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes retardantes isotónico y de la absorción, amortiguadores, soluciones transportadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido del estado de la técnica. Excepto en el caso de que algún medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas.

[0095] Las formulaciones de los compuestos de la invención que se pueden administrar por vía parenteral, es decir, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, incluyen los siguientes vehículos preferidos. Algunos ejemplos de vehículos preferidos para uso subcutáneo incluyen una solución salina con amortiguador de fosfato (PBS) y trietanolamina al 0,01-0,1 % en Agua para inyección USP. Los vehículos adecuados para inyección intramuscular incluyen etanol USP 10%, propileno glicol 40% y el balance de una solución isotónica aceptable como dextrosa al 5%.

[0096] Algunos ejemplos de vehículos preferidos para uso intravenoso incluyen etanol 10% USP, propileno glicol 40% USP y el balance Agua para inyección USP. Otro vehículo aceptable es etanol 10% USP y Agua para inyección USP; otro vehículo aceptable es trietanolamina 0,01-0,1% en Agua para inyección USP. Los solventes

27
3

parenterales farmacéuticamente aceptables son aquellos que proporcionan una solución o dispersión que puede pasarse a través de un filtro de 5 micras sin eliminar el ingrediente activo.

[0097] Un método de administración preferido de las composiciones de la presente invención es la administración a través de la mucosa, particularmente la administración intranasal o la administración por inhalación (administración pulmonar). La administración pulmonar de un fármaco se puede lograr con varios abordajes diferentes, incluidos nebulizadores de líquidos, inhaladores de dosis medidas en aerosol (MDIs), y dispositivos de dispersión de polvo seco. Las composiciones que se pueden usar para administraciones de este tipo suelen ser polvos secos o aerosoles. Para la administración de aerosoles, que es el método de administración preferido de la presente invención, las composiciones se dan a través de inhaladores, algunos tipos de los cuales se describen más adelante.

[0098] Los polvos secos contienen, además del ingrediente activo, un vehículo, un intensificador de absorción, y opcionalmente otros ingredientes. El vehículo es, por ejemplo, un mono-, di- o polisacárido, un azúcar alcohol u otro poliol. Los vehículos adecuados incluyen lactosa, glucosa, rafinosa, melezitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol; y almidón. La lactosa se prefiere a los demás, sobre todo en forma de monohidrato. También se incluyen los intensificadores de absorción como polipéptidos, surfactantes, glucósidos alquílicos, aminas de ácidos grasos o fosfolípidos. Los ingredientes de la formulación tienen que estar en forma finamente fraccionada, es decir, su diámetro mediano debe generalmente ser de cerca de 30 a cerca de 200 micras, medido con un instrumento de difracción con rayo láser o un contador coulter. El tamaño deseado de partícula se puede alcanzar usando métodos conocidos del estado de la técnica, p.ej. molienda, micronización o precipitación directa.

[0099] La vía intranasal de administración ofrece numerosas ventajas sobre muchas otras formas de administración para los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, una ventaja de la administración intranasal es la comodidad. Un sistema inyectable exige la esterilización de la jeringa hipodérmica y en el escenario institucional, acarrea preocupaciones entre el personal médico respecto del riesgo de contraer una enfermedad al pincharse accidentalmente con una aguja contaminada. También se imponen estrictos requisitos para la disposición final de las agujas y jeringas usadas en el escenario institucional. En contraposición, la administración intranasal exige poco tiempo por parte del paciente y el personal médico que lo atiende, y es

38

mucho menos dispendioso para la institución que los inyectables.

[0100] Una segunda ventaja importante de la vía intranasal es la aceptación del paciente del sistema de administración del fármaco. La administración intranasal se percibe como no invasiva, no se acompaña de dolor, no tiene efectos persistentes importantes produce la gratificación del pronto alivio de los síntomas del paciente. Ésta es una ventaja especial cuando el paciente es un niño. Otra consideración importante es que el paciente puede ser capaz de auto-administrarse la dosis prescrita del aerosol nasal.

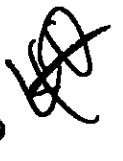
[0101] Para la administración intranasal las composiciones de la presente invención se pueden formular como líquidos o sólidos. Dichas composiciones pueden contener uno o más adyuvantes, agentes para intensificar la absorción de los ingredientes activos mediante permeación a través de la membrana nasal, y (para las composiciones líquidas) un diluyente acuoso como, por ejemplo, agua. Como alternativa, el diluyente puede comprender un amortiguador acuoso como el de fosfato. La composición además como opción puede incluir uno o más alcoholes polihidratados y uno o más preservativos como, por ejemplo, gentamicina, bacitracina (0,005%) o cresol. Las composiciones se pueden administrar en la cavidad nasal en la forma de un aerosol usando un atomizador, nebulizador, pulverizador, gotero u otro dispositivo que asegure el contacto de la solución con la membrana nasal. El dispositivo puede ser sencillo como un aerosol nasal que puede ser usado por el paciente, o un instrumento más elaborado para que la dispensación de las composiciones sea más precisa, que se puede usar en el consultorio del médico o en una institución de salud.

[0102] Las composiciones en polvo para administración nasal se pueden producir mezclando el agente activo y el excipiente, ambos los cuales poseen el tamaño deseado de partícula. Primero, se produce una solución del agente activo y los excipientes de ciclodextrina, lo cual va seguido de precipitación, filtración y pulverización. También es posible eliminar el solvente mediante liofilización, seguida de pulverización hasta lograr el tamaño deseado de partícula usando técnicas convencional, conocidas de la bibliografía farmacéutica. La última etapa es la clasificación del tamaño mediante tamizaje, por ejemplo, para obtener partículas que tienen de preferencia entre 30 y 200 micras de diámetro. El polvo se puede administrar a través de un insuflador nasal, o se pueden poner en un juego de cápsula de un dispositivo de inhalación o insuflación. La cápsula se perfora en sus dos polos con una aguja y se hace pasar aire para soplar las partículas de polvo. La formulación en polvo también se puede administrar en un aerosol de chorro de un gas inerte o suspendida en fluidos orgánicos líquidos.

39
B

[0103] En una versión específica, la composición farmacéutica se puede administrar con un sistema de liberación controlada o sostenida. En una versión, se puede usar una bomba para alcanzar una liberación controlada o sostenida (véase Langer, *Science*, 249:1527-1533 (1990); Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:10; Buschwald et al., 1980, *Surgery* 58:507; Saudek et al., 1989 *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra versión, se pueden usar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida del agonista del receptor de opioides o del antagonista de los opioides (véase, p.ej., *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macrol. Chem.* 23:61; véase también Levy et al., 1985 *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105; Patente estadounidense No. 5,679,377; Patente estadounidense No. 5,916,597, Patente estadounidense No. 5,912,015; Patente estadounidense No. 5,989,463; Patente estadounidense No. 5,128,326; Publicación PCT No. WO 99/12154; y Publicación PCT No. WO 99/20253). Algunos ejemplos de polímeros empleados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitaciones, poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(metil metacrilato), ácido poli(acrílico), acetato de poli(etileno-co-vinilo), ácido poli(metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), alcohol poli(vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos)(PLGA), y poliortoésteres. En una versión preferida, el polímero empleado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está desprovisto de impurezas que puedan percolar, permanece estable durante el almacenamiento, es estéril y biodegradable. En otra versión, un sistema de liberación controlada o sostenida se puede poner en la proximidad del objetivo terapéutico, lo cual exige tan solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p.ej., Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

[0104] Los vehículos que se pueden emplear con dichas composiciones farmacéuticas son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables. En ciertas versiones, la formulación de preferencia proporciona un nivel relativamente constante de liberación del componente activo. En otras versiones, empero, se puede desear una mayor velocidad de la liberación inmediatamente después de la administración. La formulación de dichas composiciones cae bien dentro del nivel de conocimiento medio

40 

en la técnica usando técnicas conocidas. Los vehículos ilustrativos útiles a este respecto incluyen micropartículas de poli(láctido-co-glicólido), poliacrilato, látex, almidón, celulosa, dextrano y similares. Otros vehículos ilustrativos de liberación retardada incluyen biovectores supramoleculares, los cuales comprenden un núcleo hidrófilo no líquido (p.ej., un polisacárido o oligosacárido con enlaces cruzados) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfipático, como un fosfolípido (véase, p.ej., Patente estadounidense No. 5,151,254 y solicitudes PCT WO 94/20078, WO/94/23701 y WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenida dentro de una formulación de liberación sostenida depende del lugar de su implantación, la velocidad y la duración esperada de la liberación y la naturaleza del padecimiento que se va a tratar o a prevenir.

[0105] Los compuestos de la invención se administran a un individuo en una cantidad efectiva o una cantidad farmacéuticamente efectiva, para efectuar o intensificar la respuesta inmunitaria del individuo. Como se usa en este contexto, "cantidad efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" es aquella cantidad que muestra una respuesta sobre y por encima del vehículo o los controles negativos. Una "cantidad efectiva adyuvante" es aquella cantidad del compuesto en cuestión la cual, cuando se administra en conjunto con un antígeno, muestra una respuesta superior a la producida por el antígeno solo. La dosificación precisa de los compuestos de la invención que se van a administrar a un paciente dependerán del compuesto particular empleado, la vía de administración, la composición farmacéutica y el paciente. Por ejemplo, cuando se administra por vía subcutánea para intensificar una respuesta de anticuerpos, la cantidad de compuesto empleada va de 1 a cerca de 250 microgramos, de preferencia de cerca de 25 a cerca de 50 microgramos con base en la administración a un paciente adulto típico de 70 kg de peso.

[0106] En otra versión, las composiciones inmunogénicas ilustrativas, p.ej., composiciones inmunogénicas o de vacuna, de la presente invención comprenden ADN que codifica a uno o más de los polipéptidos como se describió arriba, de manera que el polipéptido es generado *in situ*. Como se anotó antes, el polinucleótido se puede administrar dentro de cualquiera de una amplia gama de sistemas de suministro conocidos para la persona medianamente versada en la materia técnica correspondiente. En efecto, numerosas técnicas de administración de genes son bien conocidas del estado de la técnica, como las descritas por Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 75:143-198, 1998, y las referencias que se citan en ese documento. Por supuesto, los

41 

sistemas adecuados de polinucleótidos de expresión contendrán las secuencias reguladoras de ADN necesarias para la expresión en un paciente (como un promotor y una señal de terminación adecuados).

[0107] En consecuencia, en ciertas versiones, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos inmunogénicos aquí descritos se introducen en células del mamífero huésped adecuadas para expresión usando cualquiera de varios sistemas virales conocidos. En una versión ilustrativa, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente y efectiva para los sistemas de administración de genes. Una secuencia de nucleótidos seleccionada que codifica a un polipéptido de la presente invención se puede insertar en un vector y empacar en partículas retrovirales usando técnicas conocidas del estado de la técnica. El virus recombinante se puede entonces aislar y administrar al sujeto. Se han descrito varios sistemas retrovirales ilustrativos (p.ej., Patente estadounidense No. 5,219,740; Miller y Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

[0108] Además, también se han descrito numerosos sistemas ilustrativos con adenovirus. A diferencia de los retrovirus que se integran al genoma del huésped, los adenovirus permanecen fuera de los cromosomas, lo cual reduce los riesgos asociados con la mutagénesis insercional (Haj-Ahmad y Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett et al. (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth et al. (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr et al. (1994) *Gene Therapy* 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) *BioTechniques* 6:616-629; y Rich et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476).

[0109] También se han desarrollado varios sistemas de vectores asociados a adenovirus (AAV) para la administración de polinucleótidos. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente usando técnicas bien conocidas del estado de la técnica. Véase, p.ej., Patentes estadounidenses Nos. 5,173,414 y 5,139,941; Publicaciones Internacionales Nos. WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Shelling y Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169; y Zhou et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

42

[0110] Otros vectores virales útiles para administrar los polinucleótidos que codifican polipéptidos de la presente invención mediante transferencia de genes incluyen aquellos derivados de la familia de los virus pox, como el virus de la vaccinia y los poxvirus aviarios. A manera de ejemplo, los virus recombinantes de vaccinia que expresan las novedosas moléculas se pueden construir de la siguiente manera. El ADN que codifica a un polipéptido se inserta primero en un vector adecuado de manera que queda adyacente a un promotor de vaccinia y flanqueando a las secuencias de ADN de vaccinia, como la secuencia que codifica a la quinasa de timidina (TK). Este vector entonces se usa para transfectar células que al mismo tiempo están infectadas con vaccinia. La recombinación homóloga sirve para insertar al promotor de vaccinia más el gen que codifica al polipéptido de interés dentro del genoma viral. El resultante TK. sup.(-) recombinante se puede seleccionar cultivando las células en presencia de 5-bromodesoxiuridina y recogiendo las placas virales resistentes a esta sustancia.

[0111] Un sistema de infección/transfección basado en vaccinia puede ser empleado con comodidad para dar lugar a la expresión o coexpresión inducible, transitoria de uno más polipéptidos de los aquí descritos en células huésped de un organismo. En este sistema en particular, las células se infectan primero *in vitro* con un virus recombinante de vaccinia que codifica a la polimerasa del ARN del bacteriófago T7. Esta polimerasa muestra una exquisita especificidad ya que sólo transcribe plantillas que portan promotores T7. Luego de la infección, las células se transfectan con el polinucleótido o polinucleótidos de interés, conducidos por un promotor T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del virus recombinante de vaccinia transcribe al ADN transfectado en un ARN que es luego traducido en polipéptido por el huésped de la maquinaria de traducción. El método da lugar a la producción citoplásmica transitoria y de alto nivel de grandes cantidades de ARN y sus productos de traducción. Véase, p.ej., Elroy-Stein y Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:6743-6747; Fuerst et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:8122-8126.

[0112] Como alternativa, los poxvirus aviarios, como el virus pox de las aves de corral y el virus pox de los canarios, también se pueden usar para entregar la secuencia codificadoras de interés. Se sabe que los virus pox aviarios recombinantes, que expresan inmunógenos de patógenos de mamíferos, confieren inmunidad protectora cuando se administran a especies no aviarias. En uso de un vector avipox es particularmente deseable en los seres humanos y en otras especies de mamíferos ya que algunos elementos del genus Avipox sólo se pueden replicar de forma productiva en especies

aviaries susceptibles y por tanto no son infecciosos para las células de los mamíferos. Los métodos para producir Avipoxvirus recombinantes son conocidos del estado de la técnica y se basan en recombinación genética, como se describió arriba con respecto a la producción de virus de vaccinia. Véase, p.ej., WO 91/12882; WO 89/03429; y WO 92/03545.

[0113] Cualquiera de entre varios vectores de alfavirus también se puede usar para la entrega de composiciones de polinucleótidos de la presente invención, como aquellos vectores descritos en las Patentes estadounidenses Nos. 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 y 6,015,694. También se pueden usar ciertos vectores basados en la encefalitis equina venezolana (VEE), algunos ejemplos ilustrativos de los cuales se pueden encontrar en las Patentes estadounidenses Nos. 5,505,947 y 5,643,576.

[0114] Además, los vectores moleculares conjugados, como los vectores quiméricos de adenovirus descritos en Michael et al. *J. Biol. Chem.* (1993) 268:6866-6869 y Wagner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:6099-6103, también se pueden usar para la administración de genes conforme a la invención.

[0115] Se puede encontrar información ilustrativa adicional sobre estos y otros sistemas virales conocidos de administración por ejemplo en Fisher-Hoch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:317-321, 1989; Flexner et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86-103, 1989; Flexner et al., *Vaccine* 8:11-21, 1990; Patentes estadounidenses Nos. 4,603,112, 4,769,330, y 5,017,487; WO 89/01973; Patente estadounidense No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, *BioTechniques* 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., *Scienza* 252:431-434, 1991; Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994; Kass-Eisler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11498-11502, 1993; Guzmán et al., *Circulation* 55:2838-2848, 1993; y Guzmán et al., *Cir. Res.* 73:1202-1207, 1993.

[0116] En ciertas versiones, un polinucleótido se puede integrar al genoma de una célula diana. Esta integración puede ser en la ubicación y orientación específicas a través de recombinación homóloga (reemplazo de genes) o se puede integrar en una ubicación aleatoria inespecífica (aumento de genes). En otras versiones, el polinucleótido se puede mantener de forma estable en la célula como un segmento de ADN separado, episómico. Dichos segmentos o "episomas" de polinucleótidos codifican secuencias suficientes para permitir mantenimiento y replicación independiente de o en sincronización con el ciclo de la célula del huésped. La forma como la construcción de la expresión se hace llegar a la célula y lugar de la célula donde permanece el

44

polinucleótido dependen del tipo de construcción de expresión empleada.

[0117] En otra versión de la invención, se administra/hace llegar un polinucleótido en la forma de ADN "desnudo" como está descrito, por ejemplo, en Ulmer et al., *Science* 259:1745-1749, 1993 y revisado por Cohen, *Science* 259:1691-1692, 1993. La captación de ADN desnudo se puede incrementar recubriendo cuentas biodegradables con ADN, las cuales son transportadas eficientemente hacia el interior de las células.

[0118] En otra versión, una composición de la presente invención se puede entregar a través de una estrategia de bombardeo de partículas, muchas de las cuales han sido descritas. En un ejemplo ilustrativo, la aceleración de partículas impulsada por gas se puede lograr con dispositivos como los manufacturados por Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), algunos ejemplos de los cuales se describen en las Patentes estadounidenses Nos. 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; y Patente EP No. 0500 799. Este abordaje ofrece un mecanismo de entrega sin aguja en la cual una formulación de polvo seco de partículas microscópicas, como partículas de polinucleótido o polipéptido, se acelera hasta que alcanza una gran velocidad dentro de un chorro de helio generado por un dispositivo manual, lo cual impulsa a las partículas hacia un tejido diana de interés.

[0119] En una versión relacionada, otros dispositivos y métodos que pueden ser útiles para la inyección sin aguja, impulsada por gas de composiciones de la presente invención incluyen los provistos por Bioject, Inc. (Portland, OR), algunos ejemplos de los cuales están descritos en las Patentes estadounidenses Nos. 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 y 5,993,412.

[0120] Dentro de ciertas versiones de la invención, la composición farmacéutica de preferencia es una que induce una respuesta inmunitaria predominantemente del tipo Th1. Los niveles elevados de citocinas de tipo Th1 (p.ej., IFN- γ , TNF α , IL-2 y IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno administrado. En contraposición, los niveles altos de citocinas tipo Th2 (p.ej., IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuesta inmunitarias humorales. Luego de la aplicación de una composición inmunogénica como se describe aquí, un paciente montará una respuesta inmunitaria que incluye respuestas de tipos Th1 y Th2. Dentro de una versión preferida, la cual la respuesta es de predominio de tipo Th1, el nivel de citocinas tipo Th1 aumentará en mayor grado que el nivel de las citocinas tipo Th2. Los niveles de estas citocinas se pueden valorar fácilmente usando pruebas

45

estándar. Como alternativa, o además, los niveles altos de citocinas tipo Th2 (p.ej., IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) pueden ser deseables para ciertas aplicaciones terapéuticas. Los niveles de estas citocinas pueden valorarse fácilmente pruebas estándar. Puede encontrarse una revisión de las familias de citocinas en Mosmann y Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

[0121] Las composiciones ilustrativas para usar en la inducción de citocinas tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de oligonucleótidos que contienen CpG (en los cuales el dinucleótido CpG es no metilado) como se describe, por ejemplo, en WO 96/02555, WO 99/33488 y las Patentes estadounidenses Nos. 6,008,200 y 5,856,462. las secuencias inmunostimuladoras de ADN también se describen, por ejemplo, en Sato et al., *Science* 273:352, 1996. Otros inmunoestimulantes adecuados comprenden saponinas, como QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), y derivados relacionados de la saponina y miméticos de la misma.

[0122] Se puede incluir cualquiera de entre una amplia gama de inmunoestimulantes adicionales en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, citocinas, como GM-CSF, interferones o interleucinas para modular todavía más una respuesta inmunitaria de interés. Además, Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie SBAS de adyuvantes (p.ej., SBAS-2 o SBAS-4, disponible en SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), y el inmunoestimulante Enhanzyn™ (Corixa, Hamilton, MT). Los inmunoestimulantes de éter de polioxietileno se describen en WO 99/52549A1 y también se pueden usar.

[0123] Las composiciones farmacéuticas de la invención con frecuencia además comprenderán uno o más amortiguadores (p.ej., solución salina neutra amortiguada o solución salina amortiguada con fosfato), carbohidratos (p.ej., glucosa, marínosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos como glicina, antioxidantes, bacteriostáticos, agentes quelantes como EDTA o glutatión, adyuvantes (p.ej., hidróxido de aluminio), solutos que hacen que la formulación se torne isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con respecto a la sangre del receptor, agentes suspensorios, agentes espesantes p preservativos. Como alternativa, las composiciones de la presente invención se pueden formular como liofilizados.

[0124] Las composiciones farmacéuticas aquí descritas se pueden presentar en recipientes de dosis única o dosis múltiples, como ampollas o viales sellados. Dichos recipientes suelen venir sellados con el fin de preservar la esterilidad y estabilidad de la

46

formulación hasta el uso. En general, las formulaciones se pueden almacenar como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos. Como alternativa, una composición farmacéutica se puede almacenar liofilizada lo cual sólo requiere la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes del uso.

[0125] El desarrollo de dosificaciones y regímenes de tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares aquí descritas en diversos regímenes de tratamiento, incluidos, p.ej., administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular, es bien conocido del estado de la técnica, y algunos de ellos se examinan brevemente a continuación para propósitos generales de ilustración.

[0126] En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas aquí reveladas se pueden administrar por vía oral a un animal. De esta forma, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden venir encerradas en cápsulas duras o blandas de gelatina, o se pueden convertir en comprimidos, o se pueden incorporar directamente a los alimentos.

[0127] Los compuestos activos se pueden incluso incorporar con excipientes y usuarios en la forma de tabletas ingeribles, pastillas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares (véase, por ejemplo, Mathiowitz et al., *Nature* 1997 Mar 27;386(6623):410-4; Hwang et al., *Crit Rev Ther Drug Carrier Sits* 1998;15(3):243-84; Patente estadounidense 5,641,515; Patente estadounidense 5,580,579 y Patente estadounidense 5,792,451). Las tabletas, trociscos, grageas, cápsulas y similares también pueden contener cualquiera de entre una amplia variedad de componentes adicionales como, por ejemplo, un ligante, como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes como difosfato de calcio; un agente desintegrador, como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico y similares; un lubricante como estearato de magnesio; y se le puede añadir un agente endulzante como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente saborizante, como yerbabuena, aceite de gaulteria, o sabor a cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo mencionado arriba, un vehículo líquido. Puede haber otros varios materiales presentes como recubrimientos o que de otro modo modifiquen la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, las tabletas, grageas o cápsulas pueden estar recubiertas con goma laca, azúcar, o ambas. Por supuesto, cualquier material empleado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente atóxico en las cantidades utilizadas. Además, los compuestos activos se pueden incorporar a las

47 

preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

[0128] Por lo general, estas formulaciones contendrán por lo menos alrededor de 0,1% del compuesto activo o más, aunque el porcentaje del o los ingredientes activos puede, por supuesto, variarse y estar de modo conveniente entre cerca de 1 o 2% y cerca de 60% o 70% o del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de compuesto activo en cada composición de uso terapéutico se puede preparar de manera que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria del compuesto. Factores como solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, vía de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas serán contempladas por la persona medianamente versada en la materia técnica de la preparación de las formulaciones farmacéuticas, y por ende, se pueden desear contar con varios regímenes de dosificación y de tratamiento.

[0129] Para la administración oral, las composiciones de la presente invención como alternativa se pueden incorporar con uno o más excipientes en la forma de un enjuague bucal, dentífrico, pastilla bucal, aerosol oral, o formulación sublingual administrada por vía oral. Como alternativa, el ingrediente activo se puede incorporar a una solución oral que contenga borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o dispersarla en un dentífrico o añadirla en una cantidad terapéuticamente efectiva a una composición que puede incluir agua, ligantes, abrasivos, agentes saborizantes, agentes espumantes y humectantes. Como alternativa las composiciones pueden tomar la forma de una tableta o solución que se puede poner debajo de la lengua o disolverla en la boca.

[0130] En ciertas circunstancias será deseable dar las composiciones farmacéuticas aquí reveladas por vías parenteral, intravenosa, intramuscular, o incluso intraperitoneal. Estos abordajes son bien conocidos de la persona versada en la técnica, y algunos de ellos se describen en más detalle, por ejemplo, en la Patente estadounidense 5,543,158; Patente estadounidense 5,641,515 y Patente estadounidense 5,399,363. En ciertas versiones, las soluciones de los compuestos activos en forma de base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un surfactante, como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietileno glicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones generalmente contendrán un preservativo para evitar el crecimiento de microorganismos.

[0131] Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas o dispersiones estériles y polvos estériles para la preparación

98

extemporánea de soluciones inyectables o dispersiones estériles (por ejemplo, véase la Patente estadounidense 5,466,468). En todos los casos la forma tiene que estar estéril y fluida hasta el punto de que sea fácil usarla con una jeringa. Tiene que permanecer estable en las condiciones de manufactura y almacenamiento y se tienen que preservar contra la acción contaminante de los microorganismos, como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p.ej., glicerol, propileno glicol, y polietileno glicol líquido, y similares), adecuado para mezclas de los mismos, o aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, con el uso de un recubrimiento, como lecitina, con el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de la dispersión o con el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede facilitar con diversos agentes antibacterianos y antimicóticos como, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos será preferible que incluyan agentes isotónicos como, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir con el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción como, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0132] En una versión, para la administración parenteral en una solución acuosa, la solución debe estar adecuadamente amortiguada si es necesario y hacer que el diluyente líquido primero se torne isotónico con suficiente cantidad de solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas en particular son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, un medio acuoso estéril que se puede emplear será conocido para la persona medianamente versada en la técnica a la luz de la presente revelación. Por ejemplo, una dosificación se puede disolver en 1 mL de solución isotónica de NaCl y añadirla bien sea a 1000 mL de fluido intravenoso o inyectarla en el lugar propuesto para la infusión, (véase, por ejemplo, *"Remington's Pharmaceutical Sciences"* 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Será necesario que tenga lugar alguna variación en la dosificación dependiendo de la enfermedad del sujeto que se está tratando. Además, para la administración a los seres humanos, las preparaciones por supuesto de preferencia tienen que satisfacer las normas de esterilidad, pirogenicidad, y seguridad y pureza generales exigidas por la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

[0133] En otra versión de la invención, las composiciones aquí reveladas se pueden formular en forma neutral o de sal. Las sales ilustrativas farmacéuticamente

29

aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y las cuales se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares. Al momento de la formulación, las soluciones se administrarán de una forma compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. [0134] En ciertas versiones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por aerosoles intranasales, inhalación, o otros vehículos para administración en aerosol. Los métodos para administrar genes, ácidos nucleicos, y composiciones peptídicas directamente a los pulmones a través de aerosoles nasales han sido descritos, p.ej., en la Patente estadounidense 5,756,353 y la Patente estadounidense 5,804,212. De manera parecida, la administración de fármacos con el uso de micropartículas de resinas intranasales (Takenaga et al, *J Controlled Release* 1998 Mar 2;52(1-2):81-7) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente estadounidense 5,725,871) también son bien conocidos en la química farmacéutica. De manera similar, la administración ilustrativa de fármacos a través de las mucosas en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la Patente estadounidense 5,780,045.

[0135] En ciertas versiones se usan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas lipídicas, vesículas y similares para la introducción de las composiciones de la presente invención en células huésped/organismos adecuados. En particular, las composiciones de la presente invención se pueden formular para administrarlas ya sea encapsuladas en una partícula lipídica, liposoma, vesícula, nanoesfera, o nanopartícula o similares. Como alternativa, las composiciones de la presente invención se pueden enlazar, ya sea a través de enlaces covalente o no covalentes, a la superficie de dichos vehículos.

[0136] La formación y el uso de liposoma y preparaciones parecidas a liposomas como posibles vehículos de fármacos es generalmente conocida para las personas versadas en la técnica (véase, por ejemplo, Lasic, *Trends Biotechnol* 1998 Jul;16(7):307-21; Takakura, *Nippon Rinsho* 1998, Mar; 56(3):691-5; Chandran et al, *Indian J Exp Biol*. 1997 Aug;35(8):801-9; Margalit, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1995;12(2-3):233-61; Patente estadounidense 5,567,434; Patente estadounidense 5,552,157; Patente

50 

estadounidense 5,565,213; Patente estadounidense 5,738,868 y Patente estadounidense 5,795,587).

[0137] Los liposomas se han usado con éxito con varios tipos celulares que normalmente son difíciles de transfectar mediante otros procedimientos, incluidas las suspensiones de célula T, cultivos primarios de hepatocitos y células PC 12 (Renneisen et al., *J Biol Chem.* 1990 Sep 25;265(27): 16337-42; Muller et al, *DNA Cell Biol.* 1990 Apr;9(3):221-9). Además, los liposomas no están sujetos a los constreñimientos de longitud del ADN que son típicos de los sistemas de administración virales. Los liposomas se han usado con eficacia para introducir genes, varios fármacos, agentes radioterapéuticos, enzimas, virus, factores de transcripción, efectores alostéricos y similares, en diversas líneas de cultivos celulares y animales. Además, el uso de liposomas no parece estar asociado con respuestas autoinmunes o toxicidad inaceptable después de la administración sistémica.

[0138] En ciertas versiones, los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas multilamelares concéntricas de doble capa (que también se denominan vesículas multilamelares (MLVs)).

[0139] Como alternativa, en otras versiones, la invención da lugar a formulaciones farmacéuticamente aceptables en nanocápsulas de las composiciones de la presente invención. Las nanocápsulas generalmente pueden atrapar compuestos en forma estable y reproducible (véase, por ejemplo, Quintanar-Guerrero et al., *Drug Dev Ind Pharm.* 1998 Dec;24(12):1113-28). Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga intracelular de polímeros, se pueden diseñar estas partículas ultrafinas (que miden cerca de 0,1 μm) usando polímeros que se pueden degradar *in vivo*. Dichas partículas se pueden lograr como se describe, por ejemplo, en Couvreur et al, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1988;5(1):1-20; zur Muhlen et al, *Eur J Pharm Biopharm.* 1998 Mar;45(2):149-55; Zambaux et al. *J Controlled Release.* 1998 Jan 2;50(1-3):31-40; y Patente estadounidense 5,145,684.

Terapias contra el cáncer

[0140] Los abordajes inmunológicos a la terapia contra el cáncer se basan en el reconocimiento de que las células cancerosas a menudo pueden evadir las defensas del organismo contra células y moléculas aberrantes o ajenas, y que estas defensas se

51 5

podrían estimular terapéuticamente para que recuperen el terreno perdido, p.ej. pgs. 623-648 en Klein, *Immunology* (Wiley-Interscience, New York, 1982). Numerosas observaciones recientes de que diversos efectores inmunitarios pueden inhibir directa o indirectamente el crecimiento de tumores han causado interés renovado por este enfoque para la terapia contra el cáncer, c.g. Jager, et al., *Oncology* 2001; 60(1): 1-7; Renner, et al., *Ann Hematol* 2000 Dec;79(12):651-9.

[0141] Los siguientes son cuatro tipos celulares básicos cuya función ha sido asociada con inmunidad celular antitumoral y con la eliminación de células tumorales del organismo: i) linfocitos B los cuales segregan inmunoglobulinas en el plasma para identificar y marcar las células invasoras ajenas; ii) monocitos que segregan las proteínas del complemento que son responsable de lisar y procesar las células invasoras diana recubiertas de inmunoglobulinas; iii) linfocitos asesinos naturales que tienen dos mecanismos para la destrucción de las células tumorales, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y eliminación natural; y iv) linfocitos T que poseen receptores específicos del antígeno y tienen la capacidad de reconocer una célula tumoral que porta moléculas marcadoras complementarias (Schreiber, H., 1989, en *Fundamental Immunology* (ed). W. E. Paul, pp. 923-955).

[0142] La inmunoterapia del cáncer generalmente se concentra en la inducción de la respuesta inmunitaria humoral, celular o ambas. Además, es bien conocido que la inducción de las células T cooperadoras CD4⁺ es necesaria para poder inducir secundariamente ya sea los anticuerpos o las células T citotóxicas CD8⁺. Los antígenos polipeptídicos que son selectivos o idealmente específicos de las células cancerosas ofrecen un poderoso abordaje a la inducción de la respuesta inmunitaria contra el cáncer, y constituyen un importante aspecto de la presente invención.

[0143] En consecuencia, en otros aspectos de la presente invención, las composiciones farmacéuticas aquí descritas se pueden usar para estimular una respuesta inmunitaria contra el cáncer. Dentro de dichos métodos, las composiciones farmacéuticas aquí descritas se administran a un paciente, por lo general un animal de sangre caliente, de preferencia un ser humano. Un paciente puede o no estar afectado por un cáncer. Las composiciones farmacéuticas y vacunas se pueden administrar ya sea antes o después de la extirpación quirúrgica de tumores primarios o su tratamiento como con la administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales. Como ya se dijo, la administración de las composiciones farmacéuticas se puede hacer mediante cualquier método adecuado, incluida la administración por las vías

A
5

intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica, anal, vaginal, tópica y oral.

[0144] Dentro de ciertas versiones, la inmunoterapia puede ser una inmunoterapia activa, en la cual el tratamiento se basa en la estimulación *in vivo* del sistema inmunológico endógeno del huésped para que reaccione contra tumores con la administración de agentes que modifican la respuesta inmunitaria (como los polipéptidos y polinucleótidos aquí previstos).

[0145] Las vías y la frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas aquí descritas, así como su dosificación, variarán de un individuo a otro, y se pueden establecer fácilmente usando técnicas estándar. En general, las composiciones farmacéuticas y las vacunas se pueden administrar mediante inyección (p.ej., intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), o por vía intranasal (p.ej., por aspiración) u oral. De preferencia, se pueden administrar entre 1 y 10 dosis en un periodo de 52 semanas. De preferencia, se administran 6 dosis, a intervalos de 1 mes, y se pueden dar vacunaciones de refuerzo periódicamente en lo sucesivo. Puede haber protocolos alternativos adecuados para cada paciente. Una dosis adecuada es una cantidad de un compuesto que, cuando se administra como se dijo arriba, es capaz de promover una respuesta inmunitaria antitumoral, y está por lo menos 10-50% por encima del nivel inicial (es decir, sin tratamiento). Dicha respuesta se puede vigilar midiendo los anticuerpos antitumorales en un paciente o mediante la generación dependiente de vacuna células efectoras citolíticas capaces de matar las células tumorales del paciente *in vitro*. Dichas vacunas también deben ser capaces de evocar una respuesta inmunitaria que conduzca a un desenlace clínico favorable (p.ej., remisiones más frecuentes completas o parciales, o supervivencia más prolongada libre de enfermedad) en los pacientes vacunados comparados con los no vacunados. En general, para composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden uno o más polipéptidos, la cantidad de cada polipéptido debe estar presente en intervalos de dosificación de cerca de 25 µg a 5 mg por kg del huésped. Las dosis adecuadas variarán de acuerdo con la constitución del paciente, pero por lo general serán de cerca de 0,1 mL a cerca de 5 mL.

[0146] En general, un régimen adecuado de dosificación y tratamiento proporciona el o los compuestos activos en cantidad suficiente para conferir un beneficio terapéutico o profiláctico. Dicha respuesta puede ser vigilada mediante el establecimiento de un desenlace clínico más favorable (p.ej., remisiones más frecuentes, completas o parciales, o supervivencia más prolongada libre de enfermedad) en



pacientes tratados comparados con no tratados. Los aumentos de la respuesta inmunitaria preexistente a una proteína tumoral generalmente se correlacionan con un mejor desenlace clínico. Dichas respuestas inmunitarias generalmente se pueden evaluar usando exámenes estándar de proliferación, citotoxicidad o citocinas, las cuales se pueden llevar a cabo usando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

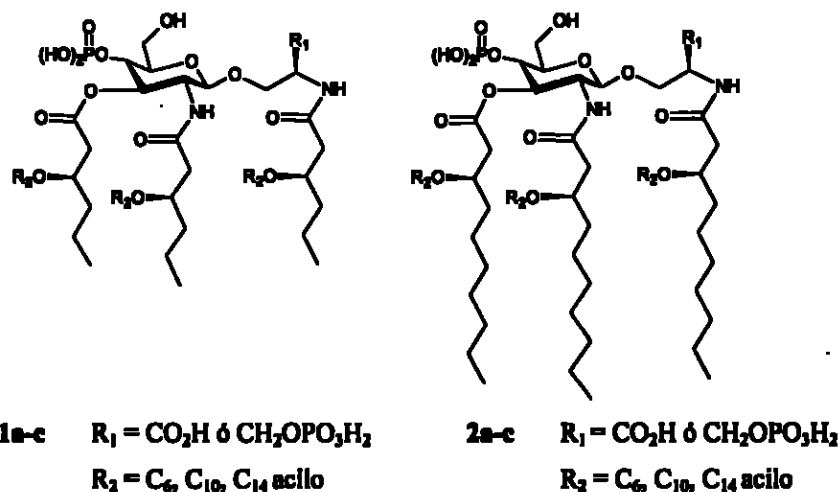
[0147] La presente invención se describe aún más por intermedio de los siguientes Ejemplos y Ejemplos de prueba no limitantes que se dan con fines ilustrativos únicamente. Todas las referencias aquí citadas se incorporan mediante referencia a la presente en su integridad.

EJEMPLOS

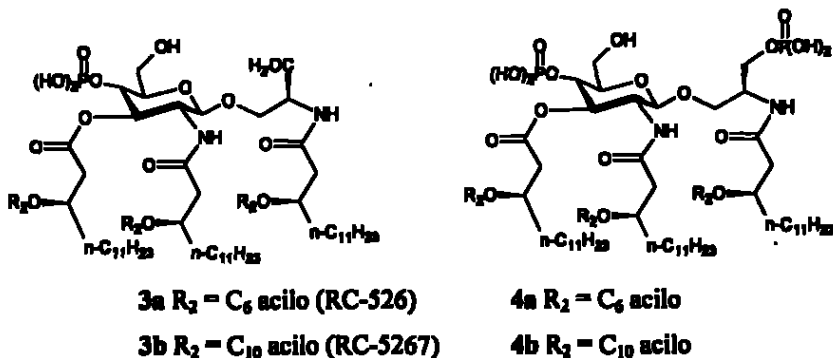
Ejemplo 1

Modificaciones de la cadena primaria de acilo graso

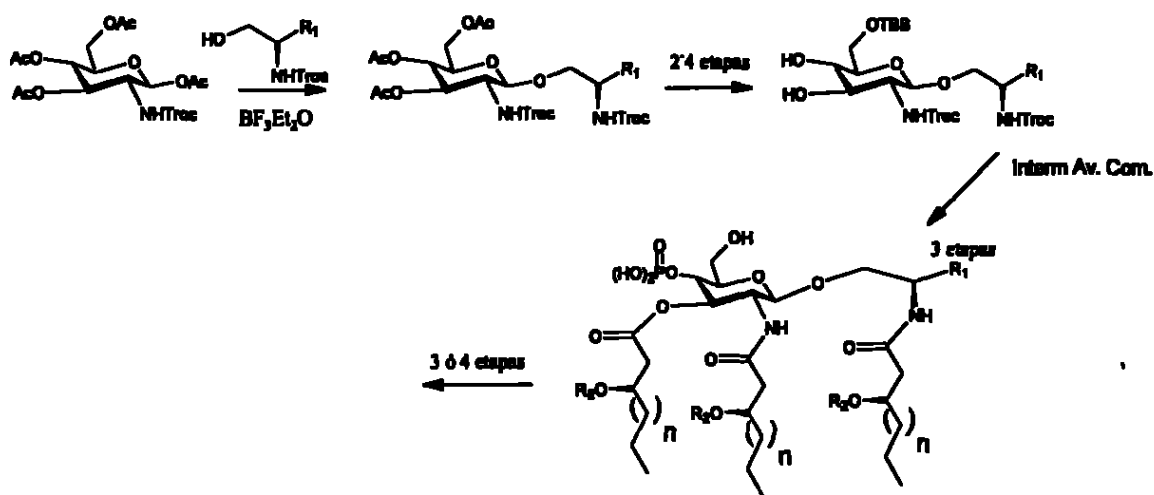
[0148] Este ejemplo describe la preparación de derivados del ácido graso primario que tienen cadenas de acilo graso primario de longitud variable, solas o en combinación con las cadenas variables de ácidos grasos secundarios. Por ejemplo, los compuestos 1a-c y 2a-c, en los cuales los ácidos grasos primarios de cadenas cortas (C_6) y medias (C_{10}) se combinan con ácidos grasos secundarios de cadenas cortas, medias, o largas.



[0149] Estos compuestos se preparan ya sea usando el bien establecido aglicón de serina ($R_1 = CO_2H$) o, como alternativa, usando una unidad de aglicón de fosfato de serinol químicamente más estable y ionizable ($R_1 = CH_2OPO_3H_2$). La selección fosfato de serilo/serinol se basará en la comparación de las actividades biológicas de derivados conocidos de serilo 3a,b con novedosos fosfatos de serinol 4a,b.

54 ~~5~~

[0150] Los derivados de los compuestos de cadena primaria modificada se sintetizan mediante la modificación de un método previamente descrito (B1 en Johnson et al., Patente estadounidense No. 6,355,251) empleando un intermediario avanzado común que permite la introducción de los ácidos aciloxi ligados a amida y éster cercanos al extremo de la síntesis (Esquema I). La etapa inicial de la síntesis es la glucosilación del aceptor 6 con el tetraacetato 5 conocido (preparado en 4 etapas a partir de la glucosamina) para dar p-glucósido 7 y la conversión de 7 a intermediario avanzado común (CAT) 8, el cual se optimiza para $R_1 = CO_2Bn$. La 4-O-acilación y la N-desprotección/acilación da lugar a un derivado hexaacilo 9, el cual se convierte en 3-4 etapas a 1a-c o 2a-c a través de fosforilación y desbloqueo.



[0151] Los ácidos (R)-3-*n*-alcanoiloxialcanoicos requeridos se preparan conforme a Keegan et al., *Tetrahedron: Asymmetry*; 7(12):3559-3564, 1996, comenzando con los ésteres 3-oxo metílicos adecuados. La alta pureza química y diastereomérica de los productos 1 y 2 se alcanza ya sea con cromatografía de fase normal en gel de sílice o, como alternativa, a través de cromatografía en celulosa o cromatografía de partición líquido-líquido en gel Sephadex LH-20. La pureza de las sales aisladas de trietilamonio se establece por medios espectroscópicos (IR, RMN ^1H y ^{13}C) y físicos (análisis de

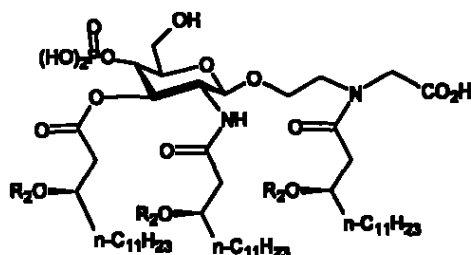
55

combustión, FAB-MS), así como mediante HPLC.

Ejemplo 2

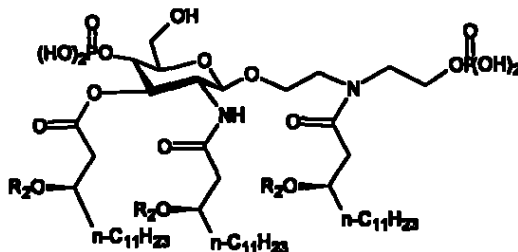
Compuestos glicilo y fosfonooxietilo (PE)

[0152] Este ejemplo describe la síntesis de compuestos glicilo 11a,b y los compuestos fosfonooxietilo (PE) 12a,b, los cuales son casi regioisoméricos con 3a,b y 4a,b.



11a $R_2 = C_6$ acilo

11b $R_2 = C_{10}$ acilo



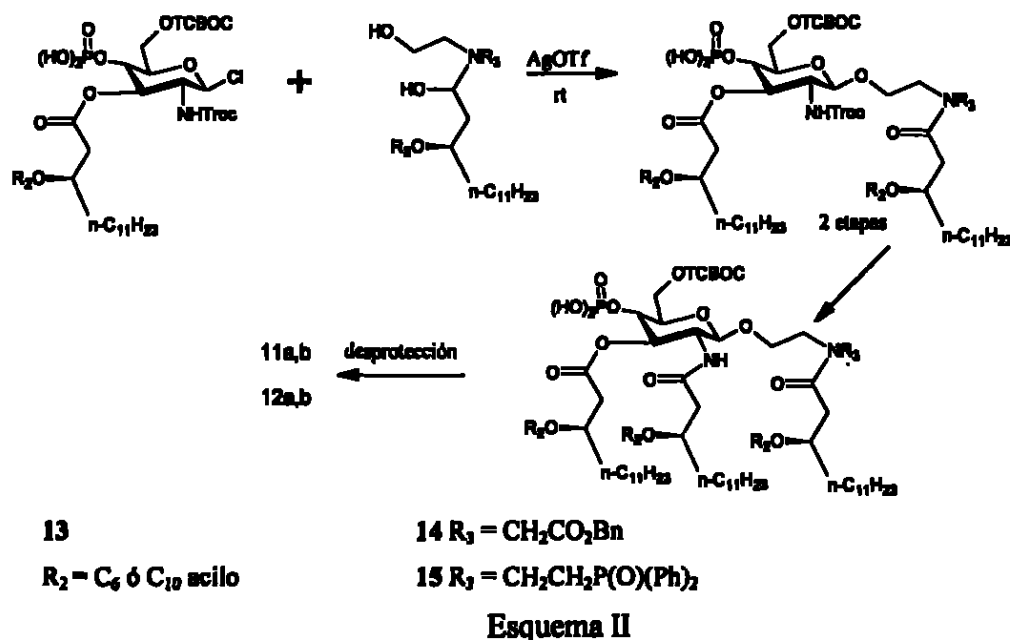
12a $R_2 = C_6$ acilo

12b $R_2 = C_{10}$ acilo

[0153] Estos compuestos se preparan más fácilmente mediante una síntesis más convergente que la descrita en el Esquema I, en la cual un donante glucosilo común C_6 o C_{10} 13 se acopla a una unidad aceptora N-acilada adecuada (o, como alternativa, N-Troc protegida, que no se muestra) 14 o 15 en presencia de iones de plata para dar p-glucósidos 16 (Esquema II). El aceptor de glicina 14 se prepara como dice Bulusu et al., *J Med Chem*; 35(19):3463-3469, 1992 a partir de etanolamina y bromoacetato de bencilo (o de t-butilo) seguido de N-acilación o protección. El fosfato 15 se prepara mediante monofosforilación de dietanolamina N-acilada (o protegida). Se espera que la N-desprotección/acilación o la N,N-diacilación en caso de aglicón Troc-protegido (Jiang et al., *Tetrahedron*; 58(43):8833-8842, 2002) de los P-glucósidos 16 y la división del grupo fenilo y otros grupos protectores del derivado hexaacilado resultante 17 dé como resultado los compuestos deseados 11a,b y 12a,b, los cuales se aíslan y caracterizan como sus sales de trietilamonio después de purificación cromatográfica en sílice o gel LH-20 o celulosa DEAE.

[0154] Los compuestos 16 son novedosos y constituyen otro aspecto de la presente invención.

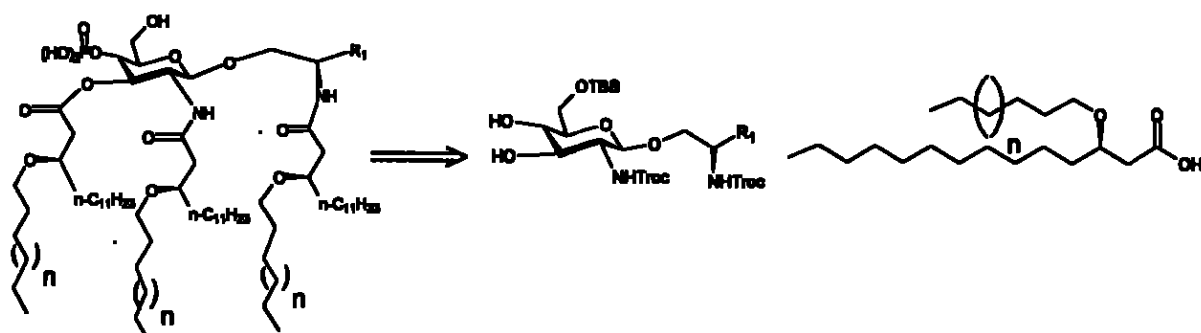
56



Ejemplo 3 Éteres lipídicos secundarios

[0155] Este ejemplo describe la síntesis de derivados del ácido (R)-3-alkiloxitetradecanoico (18a,b) los cuales son resistentes al metabolismo desfavorable o la hidrólisis acuosa. Para sintetizar compuestos 18a,b se tienen que preparar inicialmente los análogos de éter lipídico de los ácidos grasos secundarios presentes en los compuestos 3a,b o los correspondientes fosfatos de serinol 4a,b. Como se muestra retrosintéticamente en el Esquema III, la síntesis de las moléculas deseadas 18a,b se puede alcanzar mediante sustitución de ácido (R)-3-hexiloxitetradecanoico o ácido (R)-3-deciloxitetradecanoico por los acilooxiácidos correspondientes comenzando con la 3-O-acilación selectiva del intermediario avanzado común 8 del Esquema I y procediendo a través del intermediario 9 ($R_2 = \text{C}_6 \text{ ó } \text{C}_{10} \text{ alquilo, } n=9$). Los ácidos alquiloxi 19 requeridos se sintetizan a partir de ácido (R)-3-hidroxitetradecanoico o su éster fenacílico, intermediarios de la síntesis de acilooxiácidos, por métodos conocidos en >50% de producido total (Keegan et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, 7(12):3559-3564, 1996, Watanabe et al., *Carbohydr Res*; 332(3):257-277, 2001, Jiang., *Bioorg Med Chem Lett*; 12(16):2193-7] 06, 2002, Christ et al., Patente estadounidense NO: 5,530,113. 1996).

5



18a = n = 1 (C₆ alquilo)

8 R₁ = CH₂O₂Bn ó CO₂Bn

19 n = 1, 5

18b = n = 5 (C₁₀ alquilo)

Intermediario avanzado común

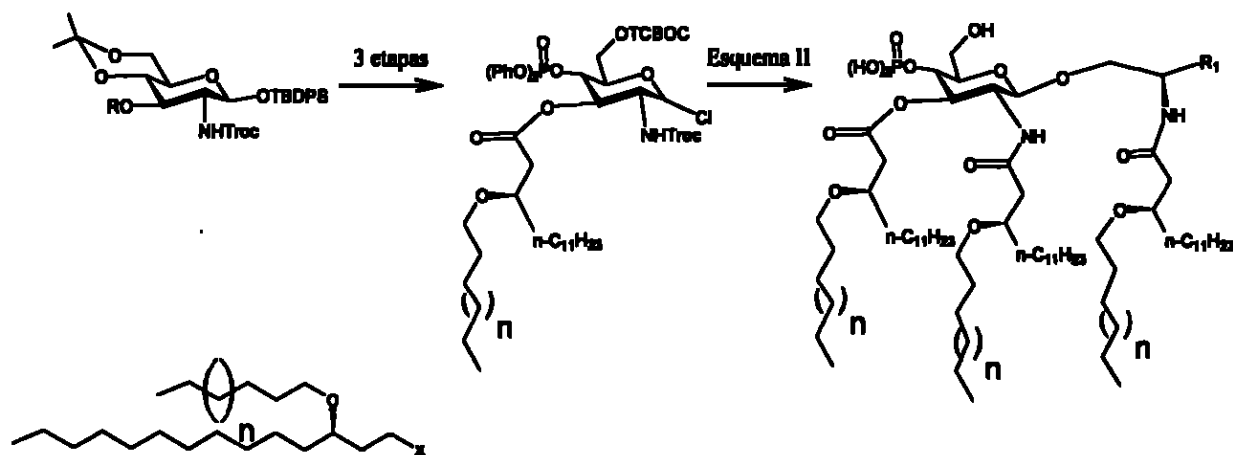
R₁ = CH₂OPO₃H₂ o bien CO₂H

Esquema III

Ejemplo 4

Éteres lipídicos primarios y secundarios

[0156] Este ejemplo describe compuestos (20a,b) que contienen un éter lipídico primario en la posición del azúcar C-3 así como para tres éteres lipídicos secundarios. Estos compuestos se sintetizan mediante alquilación de acetona 21, un intermediario en la síntesis del donante glucosilo 13 (Esquema II), con sulfonato 22, el cual a su vez se genera en una etapa a partir del alcohol precursor de 19, para dar diéter 23 (Esquema IV). La 4,6-funcionalización y activación anomérica arroja cloruro de glucosilo 24, el cual luego se procesa como en el Esquema II usando los alquiloxiácidos correspondientes en las etapas de N-acilación. En un esquema alternativo, los derivados 2-azido⁴² o 2-trifluoroacetamido⁴⁵ se pueden emplear en la etapa de 3-O-alquilación.



22 NaH = 21 R = H 23 R = (R)-3-alquiloxitetradecilo n = 1,5

24 = n = 1,5

20a = n = 1 (C₆ alquilo)

20b = n = 5 (C₁₀ alquilo)

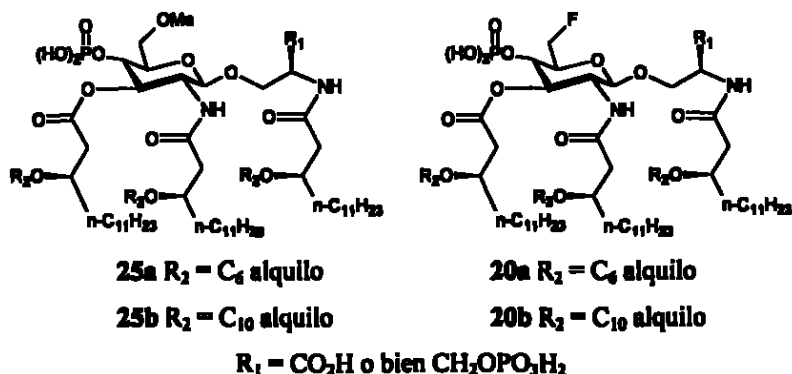
R₁ = CH₂OPO₃H₂ o bien CO₂H

Esquema IV

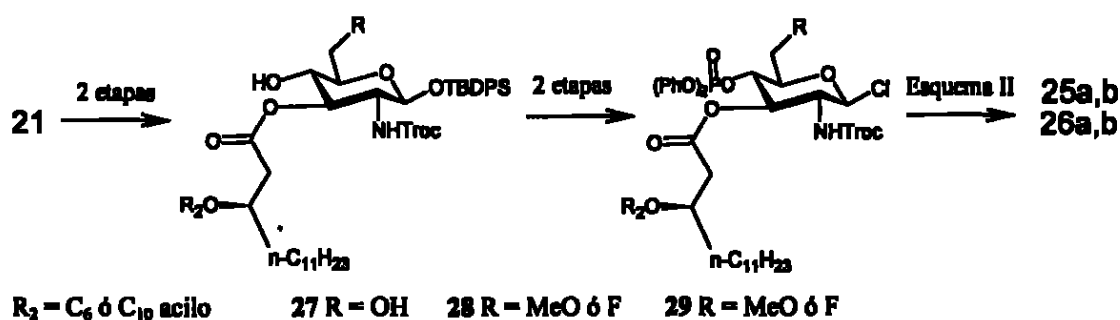
85

Ejemplo 5**Compuestos C-6 modificados**

[0157] Este ejemplo describe los compuestos que tienen un 6-hidroxilo bloqueado o un 6-sustituyente como flúor. En este ejemplo se usa un éter metílico o un grupo flúor en conjunto con compuestos de fosfato de serilo o serinol 25a,b y 26a,b. Como ya se mencionó, estos compuestos también forman un aspecto de la invención.



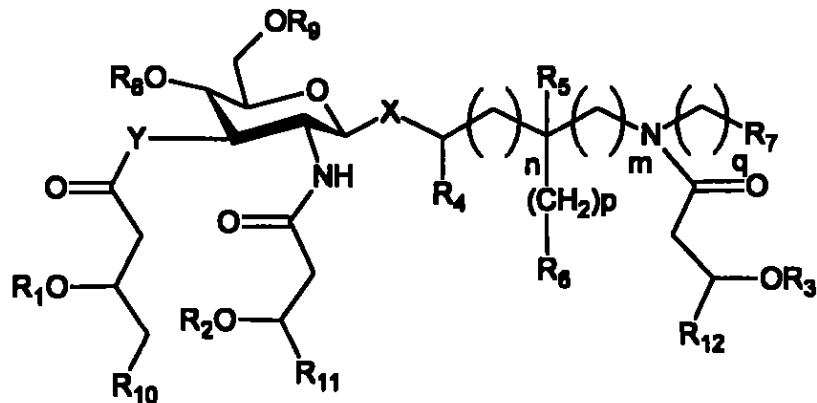
[0158] Los compuestos se preparan a partir de diol 27 como se muestra en el Esquema V. El intermediario 27, obtenido en dos etapas a partir de acetónida 21, se funcionaliza en la posición 6 mediante métodos conocidos (Christ et al., Patente estadounidense No: 5,530,113, 1996; Watanabe et al., *Carbohydr Res*; 333(3):203-231, 2001) para dar alcohol 28. La conversión de 28 a los cloruros 29 en dos etapas y la elaboración conforme al Esquema II da las moléculas deseadas 25a,b y 26a,b. Los compuestos con uniones etéricas primaria o secundaria como los descritos en el Ejemplo 4 se pueden modificar como se describió en este ejemplo para proteger todavía más a las moléculas contra la degradación química y enzimática.

**Esquema V**

[0159] Se entiende que los anteriores ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención. Se pueden hacer ciertas modificaciones de las composiciones o los métodos empleados y seguir alcanzando los objetivos de la invención. Dichas modificaciones están contempladas dentro del alcance de la invención reivindicada.

Reivindicaciones

1. Un compuesto que tiene la fórmula (I):



(I)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son residuos de acilo graso que tienen de 1 a 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ y R₅ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R₆ y R₇ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxilo, fosfono, fosfonooxilo, sulfo, sulfooxilo, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxi, y ésteres y amidas de los mismos; R₈ y R₉ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfono y H, y por lo menos uno de R₈ y R₉ es fosfono; y R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 10 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica de materia que comprende:

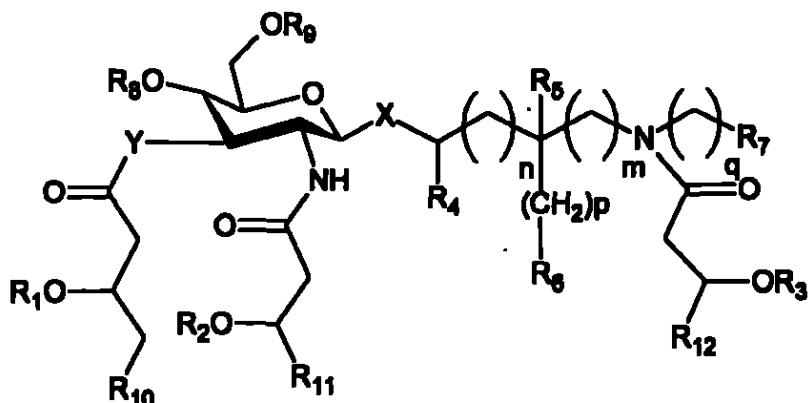
una cantidad efectiva de un compuesto conforme a la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(a) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. Un compuesto que tiene la fórmula (II)

Reivindicaciones

1. Un compuesto que tiene la fórmula (I):



(I)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son residuos de acilo graso que tienen de 1 a 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ y R₅ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R₆ y R₇ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxilo, fosfono, fosfonooxilo, sulfo, sulfooxilo, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxilo, y ésteres y amidas de los mismos; R₈ y R₉ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfono y H, y por lo menos uno de R₈ y R₉ es fosfono; y R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 10 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

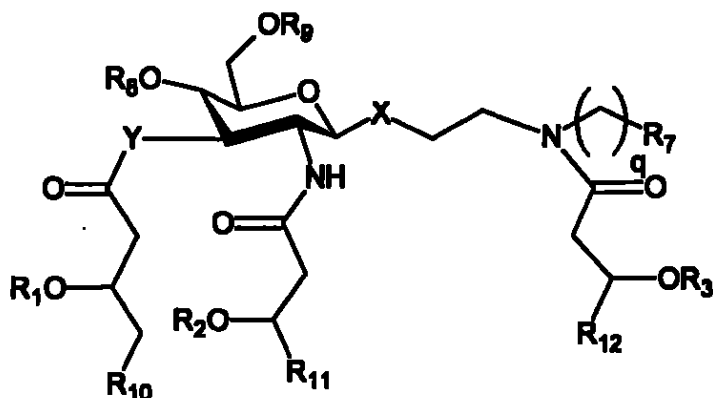
2. Una composición farmacéutica de materia que comprende:

una cantidad efectiva de un compuesto conforme a la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(a) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. Un compuesto que tiene la fórmula (II)

61



(II)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; R_1 , R_2 y R_3 son iguales o distintos y son residuos de acilo graso que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R_1 , R_2 o R_3 es opcionalmente hidrógeno; R_4 se selecciona de entre el grupo compuesto por H y metilo; q es 1 y R_7 es COOH, o bien, q es 2 y R_7 es OPO_3H_2 ; R_8 y R_9 son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfona y H, y por lo menos uno de R_8 y R_9 es fosfona; y R_{10} , R_{11} y R_{12} se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

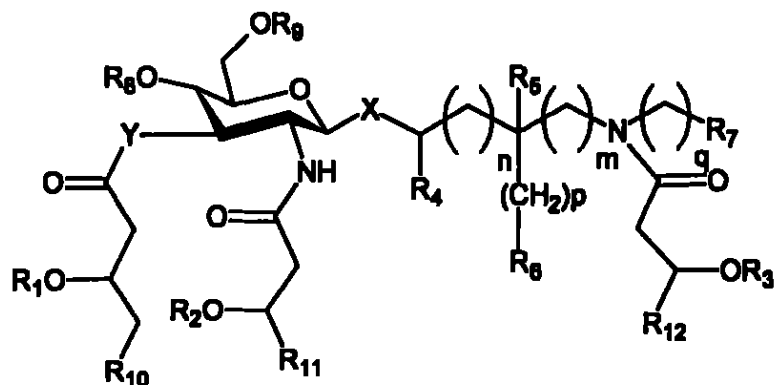
en el entendido de que R_7 sea COOH, entonces por lo menos uno de R_{10} , R_{11} y R_{12} es un grupo alifático no sustituido de cadena recta que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Una composición farmacéutica de materia que comprende:

- (a) una cantidad efectiva de un compuesto conforme a la reivindicación 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable

5. Un compuesto que tiene la fórmula (III)



26

(III)

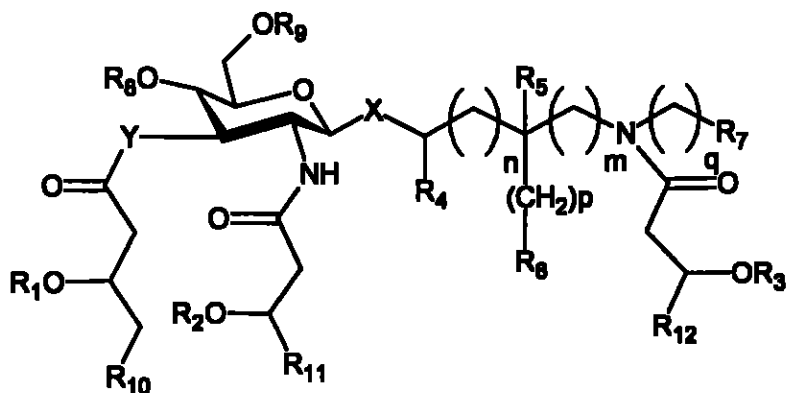
en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son grupos alifáticos saturados de cadena recta (es decir, grupos alquilo de cadena recta) que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ y R₅ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R₆ y R₇ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxi, fosfona, fosfonooxi, sulfona, sulfonooxi, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxi, y ésteres y amidas de los mismos; R₈ y R₉ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfona y H, y por lo menos uno de R₈ y R₉ es fosfona; R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Una composición farmacéutica de materia que comprende

- (a) una cantidad efectiva de un compuesto conforme a la reivindicación 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Un compuesto que tiene la fórmula (IV):



(IV)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son grupos alifáticos saturados de cadena recta (es decir, grupos alquilo de cadena recta) que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ y R₅ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto

por H y metilo; R_6 y R_7 son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxilo, fosfona, fosfonooxilo, sulfona, sulfonooxilo, amino, mercapto, ciano, nitrilo, formilo y carboxilo, y ésteres y amidas de los mismos; R_8 y R_9 son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfona y H, y por lo menos uno de R_8 y R_9 es fosfona; R_{10} , R_{11} y R_{12} se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

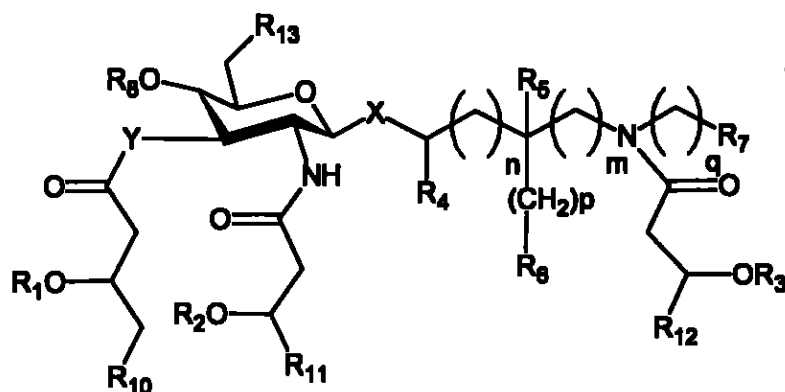
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Una composición farmacéutica de materia que comprende

(a) una cantidad efectiva de un compuesto conforme a la reivindicación 7 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. Un compuesto que tiene la fórmula (V):



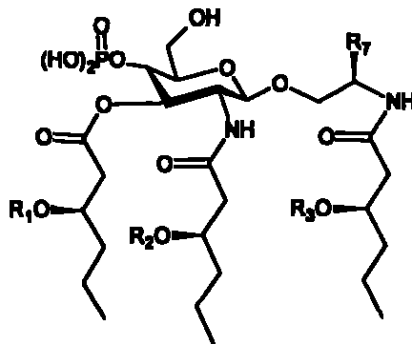
(V)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R_1 , R_2 y R_3 son iguales o distintos y son residuos de acilo graso o grupos alifáticos saturados de cadena recta que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R_1 , R_2 y R_3 es opcionalmente hidrógeno; R_4 y R_5 son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R_6 y R_7 son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxilo, fosfona, fosfonooxilo, sulfona, sulfonooxilo, amino, mercapto, ciano, nitrilo, formilo y carboxilo, y ésteres y amidas de los mismos; R_8 es fosfona; R_{13} es F ó O-PG; PG representa un grupo protector hidroxilo como se define más adelante, y R_{10} , R_{11} y R_{12} se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

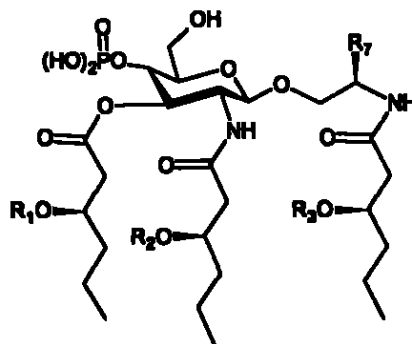
64

10. Un compuesto o composición conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en donde X y Y son oxígeno .
11. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 10 en donde X y Y son oxígeno, R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan independientemente de grupos C_6 - C_{14} acilo alifáticos saturados y grupos alifáticos saturados de cadena recta, y R_{10} , R_{11} y R_{12} son independientemente grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 3 a 10 átomos de carbono.
12. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 11 en donde R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan independientemente de grupos C_6 - C_{10} acilo saturados y grupos alifáticos saturados de cadena recta.
13. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 11 o 12 en donde R_{10} , R_{11} y R_{12} son independientemente grupos alifáticos no sustituidos de cadena recta que tienen de 3 a 7 átomos de carbono.
14. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 1 o 2 que tiene la fórmula



en donde R_7 es $COOH$ o $CH_2OPO_3H_2$ y cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_6 - C_{14} acilo saturados.

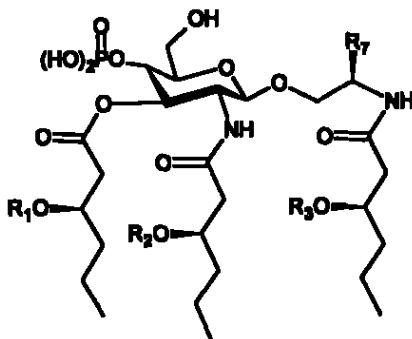
15. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 1 o 2 que tiene la fórmula



en donde R_7 es $COOH$ o $CH_2OPO_3H_2$ y cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_6 acilo saturados.

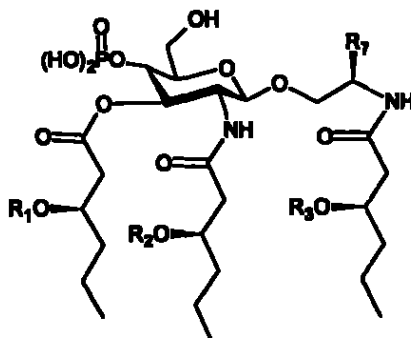
6

16. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 1 o 2 que tiene la fórmula



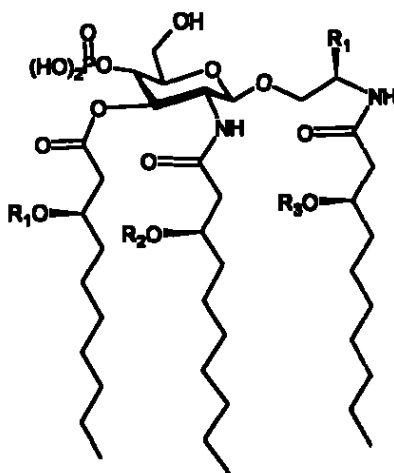
en donde R_7 es $COOH$ o $CH_2OPO_3H_2$ y cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_{10} acilo saturados.

17. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 1 o 2 que tiene la fórmula



en donde R_7 es $COOH$ o $CH_2OPO_3H_2$ y cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_{14} acilo saturados.

18. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 1 o 2 que tiene la fórmula:

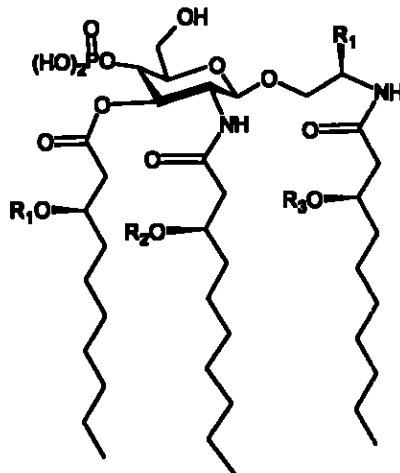


en donde R_1 es $COOH$ o $CH_2OPO_3H_2$ y cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_6 acilo saturados.

19. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 1 o 2 que tiene la

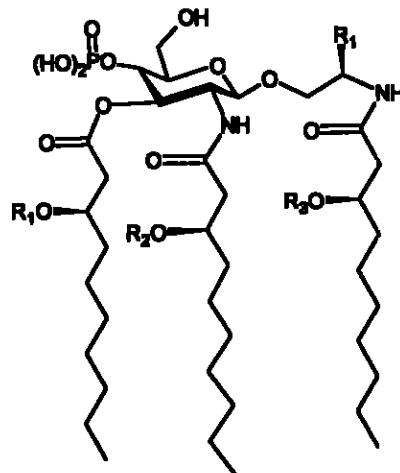
66

fórmula:



en donde R_1 es COOH o $\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$ y cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_{10} acilo saturados.

20. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 1 o 2 que tiene la fórmula:



en donde R_1 es COOH o $\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$ y cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_{14} acilo saturados.

21. Un compuesto o composición conforme a las reivindicaciones 3 ó 4 en donde q es 2 y R_7 es OPO_3H_2 .

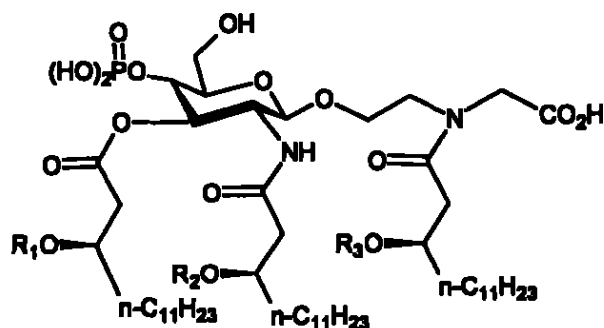
22. Un compuesto o composición conforme a las reivindicaciones 3 ó 4 en donde q es 1 y R_7 es COOH .

23. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 22 en donde R_{10} , R_{11} y R_{12} se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 10 átomos de carbono.

24. Un compuesto o composición conforme a las reivindicaciones 3 ó 4 en donde R_{10} , R_{11} y R_{12} son grupos idénticos.

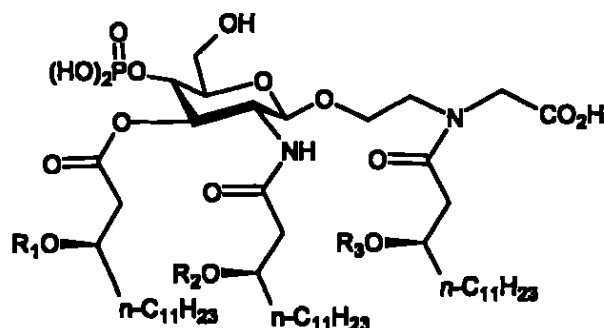
25. Un compuesto o composición conforme a las reivindicaciones 3 ó 4 que tiene la

fórmula:



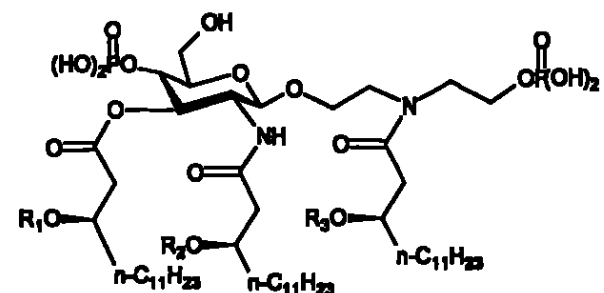
en donde cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_6 acilo saturados.

26. Un compuesto o composición conforme a las reivindicaciones 3 ó 4 que tiene la fórmula:



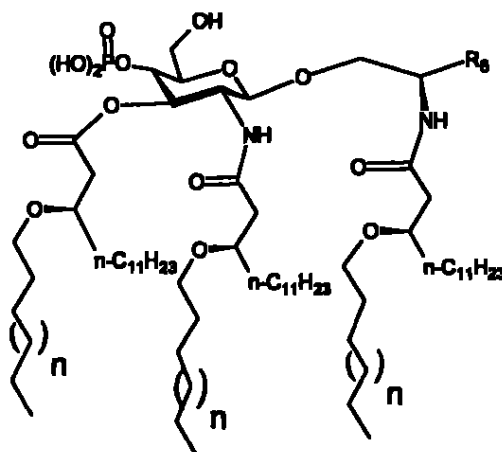
en donde cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_{10} acilo saturados.

27. Un compuesto o composición conforme a las reivindicaciones 3 ó 4 que tiene la fórmula:



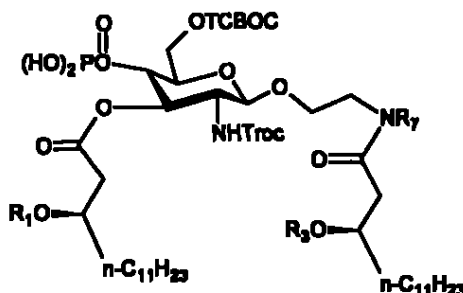
en donde cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son grupos C_6 acilo saturados.

28. Un compuesto o composición conforme a las reivindicaciones 5 ó 6 que tiene la fórmula:



en donde n es 1 ó 5 y R_6 es COOH ó $\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$.

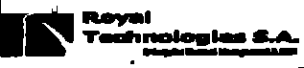
29. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 28 en donde n es 1.
30. Un compuesto o composición conforme a la reivindicación 28 en donde n es 5.
31. Un compuesto conforme a la reivindicación 9 en donde R_{13} es $-\text{OCH}_3$.
32. Un compuesto conforme a la reivindicación 9 en donde R_{13} es F.
33. Un compuesto que tiene la fórmula:



en donde TBOC representa un grupo protector 2,2,2-tricloro-1,1-dimetiletil cloroformilo; Troc represente un grupo protector 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo; R_1 y R_3 son grupos acilo alifáticos saturados C_6 ó C_{10} ; y R_7 es un grupo carboxilo o fosfato protegido.

34. Una composición conforme a cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 6, y 8 adecuada para administración en las mucosas.
35. Una composición conforme a cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 6, y 8 adecuada para administración intranasal.
36. Una composición conforme a cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 6, y 8 que además comprende un antígeno y una cantidad adyuvante efectiva del mencionado compuesto o sal del mismo.
37. Un método para intensificar la respuesta inmunitaria de un sujeto que comprende administrarle a dicho sujeto una cantidad efectiva de un compuesto o composición

FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Expediente No		07011980	No de Folio
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA X	1	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		
Observaciones: Sobre con Arte Final.			

70

69
28
6

conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-30.

38. Un método conforme a la reivindicación 37 que además comprende administrar un antígeno exógeno al mencionado sujeto.
39. Un método para mejorar o prevenir en grado sustancial una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o un trastorno alérgico en un sujeto, que comprende administrarle a dicho sujeto una cantidad efectiva de un compuesto o composición conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-30.

71 71



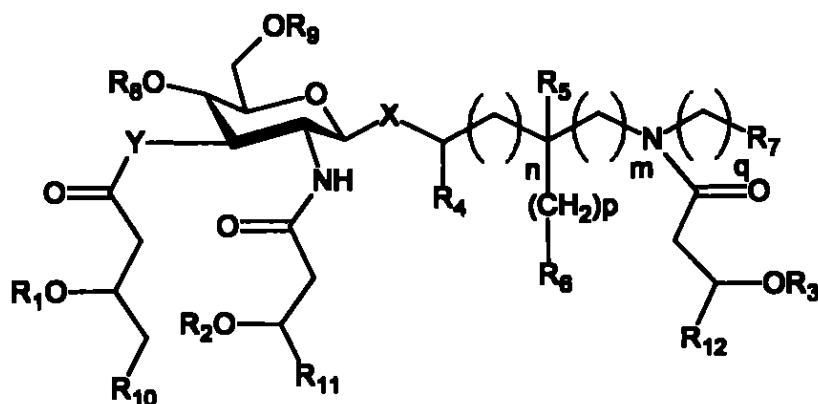
**EXTRACTO PARA LA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

.(21) No. SOLICITUD	.(51) INT.CL:
.(22) FECHA DE PRESENTACION	.(71) SOLICITANTE:
.(30) PRIORIDAD	CORIXA CORPORATION
.(31) No. DE SOLICITUD 10/888,883	.(72) INVENTOR(ES):
.(32) FECHA DE PRESENTACION Julio 8, 2004	David A. JOHNSON - David H. PERSING
.(33) PAIS E.U.A.	.(74) APODERADO:
	LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE

.(54) TITULO: CIERTOS COMPUESTOS DE FOSFATO DE AMINOALQUILO GLUCOSAMINIDIA Y SU USO

.(57) RESUMEN

1. Un compuesto que tiene la fórmula (I):



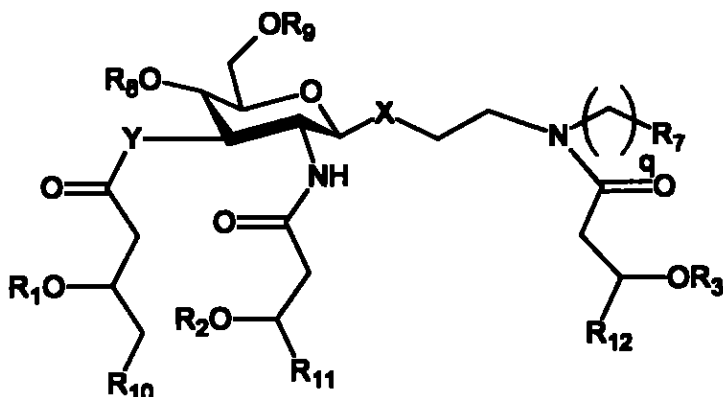
(I)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son residuos de ácido graso que tienen de 1 a 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ y R₅ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R₆ y R₇ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxilo, fosfónico, fosfonooxilo, sulfato, sulfonooxilo, amino, mercapto, cloro, nitrilo, formilo y carboxilo, y ésteres y amidas de los mismos; R₈ y R₉ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfónico y H, y por lo menos uno de R₈ y R₉ es fosfónico; y R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 10 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

72

3. Un compuesto que tiene la fórmula (II)



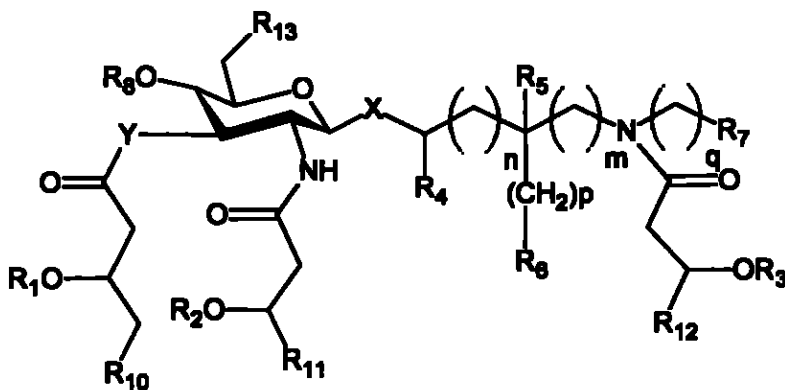
(II)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son residuos de acilo graso que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ o R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ se selecciona de entre el grupo compuesto por H y metilo; q es 1 y R₇ es COOH, o bien, q es 2 y R₇ es OPO₃H₂; R₈ y R₉ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por fosfona y H, y por lo menos uno de R₈ y R₉ es fosfona; y R₁₀, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

en el entendido de que R₇ sea COOH, entonces por lo menos uno de R₁₀, R₁₁ y R₁₂ es un grupo alifático no sustituido de cadena recta que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Un compuesto que tiene la fórmula (V):



(V)

en donde X se selecciona de entre el grupo compuesto por O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona de entre el grupo compuesto por O y NH; n, m, p y q son números enteros de 0 a 6; R₁, R₂ y R₃ son iguales o distintos y son residuos de acilo graso o grupos alifáticos saturados de cadena recta que tienen desde 1 hasta cerca de 20 átomos de carbono y en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es opcionalmente hidrógeno; R₄ y R₅ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H y metilo; R₆ y R₇ son iguales o distintos y se seleccionan de entre el grupo compuesto por H, hidroxilo, alcoxilo, fosfona, fosfonoxilo, sulfo, sulfoxilo, amino, mercapto, ciano, nitrilo, formilo y carboxilo,

y ésteres y amidas de los mismos; R_8 es fosfono; R_{13} es F ó O-PG; PG representa un grupo protector hidroxilo como se define más adelante, y R_{10} , R_{11} y R_{12} se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 07-11980

Fecha: 7 de Febrero del 2007.

Se certifica que:

Desde fecha 3 de septiembre de 1999,
del folio 109057 al folio 109066 del
libro de Protocolo N° 389, obra el poder
N° 19663 conferido por CORIXA
CORPORATION

domiciliado(a) en Seattle, estado de
Washington, Estados Unidos de América

al doctor GERMAN CASTILLO GRAU Y/O ADRIANA
CASTILLO GIBSON Y/O LUIS FELIPE CASTILLO
GIBSON.

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
mismos.

Facultad para desistir y sustituir si.

Revisado 202030.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

75

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

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 presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ 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 y 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 se 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 trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13, No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

76

Doctor(a)
CASTILLO GIBSONE LUIS FELIPE
Apoderado(a) y/o Representante de
CORIXA CORPORATION

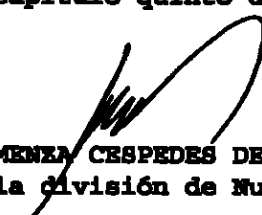
REFERENCIA	Radicación No.	7 11980
	Solicitud internacional	PCT/US2005/022522
	Fecha inicio fase nacional	08/02/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	4648

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:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

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.

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 No.10 de 2001.


ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 20 ABR 2007
adpall