COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA ACTIVAR LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DEL "ESTIMULADOR DEL GEN DE INTERFERON"

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos 62/131.235 presentada el 10 de marzo de 2015, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado en formato ASCII mediante EFS-Web y se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. Dicha copia de ASCII, creada el 9 de marzo de 2016, se titulada ANZ1004PCT_SeqListing.txt y tiene 22 kilobytes de tamaño.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La siguiente argumentación de los antecedentes de la invención se proporciona simplemente para ayudar al lector en la comprensión de la invención y no se admite que describa o constituya técnica previa de la presente invención.

Nuevos conocimientos sobre los mecanismos subyacentes a la inmunoevasión, junto con los regímenes de tratamiento de combinación que fomentan la potencia de la vacunación terapéutica, ya sea directa o indirectamente a través de combinación con inhibidores de punto de control inmunológico u otras terapias, han servido como base para el desarrollo de

vacunas o moduladores inmunitarios que puedan aumentar o incrementar una respuesta inmunitariainmunitaria adaptativa efectiva, que consisten en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ de tumor específico, que sean específicos para una neoplasia maligna diana, lo que genera una respuesta antitumoral y beneficio clínico. La manera en la cual el sistema inmunitario innato se acopla mediante ligandos dirigidos da forma al desarrollo de una respuesta adaptativa y se presta para el diseño de vacunas e inmunomoduladores (Reed et ál., Trends Immunol., 30: 23-32, 2009; Dubensky and Reed, Semin. Immunol., 22: 155-61, 2010; Kastenmuller et ál., J. Clin. Invest., 121: 1782–1796, 2011; Coffman et ál., Immunity, 33: 492-503, 2010).

Los dinucleótidos cíclicos CDN di-AMP cíclicos (producidos por *Listeria monocytogenes* y otras bacterias) y sus análogos di-GMP cíclico y GMP-AMP cíclico (cGAMP) son reconocidos por la célula hospedadora como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), que se une al receptor de reconocimiento de patógenos (PRR), conocido como estimulador de genes de interferón (STING). STING es una proteina adaptadora en el citoplasma de las células hospedadoras de mamíferos que activa la cinasa de unión a TANK (TBK1)-IRF3 y el eje de señalización NF-κB, lo que genera la inducción de IFN-β y otros productos génicos que activan fuertemente la inmunidad innata. Ahora se reconoce que STING es un componente de la vía de vigilancia

citosólica hospedadora (Vance et ál., 2009), que detecta la infección con patógenos intracelulares y, en respuesta, induce la producción de IFN-β, originando el desarrollo de una respuesta inmunitariainmunitaria adaptativa protectora específica del patógeno que consiste en linfocitos T CD4 y CD8 específicos del antígeno, así como en anticuerpos específicos del patógeno. Ejemplos de dinucleótidos de purina cíclicos se describen en detalle en, por ejemplo: las Patentes de Estados Unidos N° 7,709458 y 7.592.326; solicitudes de patente WO2007/054279, WO2014/093936 y WO2014/189805; y Yan et ál., Bioorg. Med. Chem Lett. 18: 5631 (2008).

Se informó que un gen de ratón no caracterizado con una homología estructural significativa con el dominio catalítico de la oligoadenilato sintasa humana, GMP-AMP cíclico sintasa era la enzima responsable de la producción de CDN que se unen a STING en células de mamífero. Sun et ál., Science, 339(6121):786-91, 2013. Denominada GMP-AMP cíclico Sintasa (cGAS), esta enzima cataliza la síntesis de cGAMP a partir de ATP y GTP en presencia de ADN. Este cGAMP entonces funciona como un segundo mensajero que se une a STING y lo activa. Estos CDN producidos por cGAS difieren estructuralmente de los CDN producidos por bacterias en que poseen un enlace de fosfodiéster inusual. Por lo tanto, mientras que los CDN producidos por bacterias contienen un enlace bis-3', 5' entre

los dos nucleótidos, los CDN de mamífero contenían un enlace 2',5' y un enlace 3',5', o un denominado "enlace mixto (ML)" o CDN no canónicos. Estas moléculas 2', 5'-3', 5' se unen a STING con afinidad nM, 300 veces mejor que c-di-GMP bacteriana.

STING Humano (hSTING) también tiene polimorfismos conocidos, incluyendo los alelos que codifican histidina en la posición 232, que son refractarios a CDN bis-3',5' (canónicos), pero no a CDN 2', 5'-3',5'(enlace misto no canónico) (Diner et ál., Cell Reports 3, 1355-61, 2013; Jin et ál., Genes and Immunity, 12: 263-9, 2011). Se ha informado que los polimorfismos de nucleótidos individuales en el gen hSTING afectan a la capacidad de respuesta a CDN canónicos derivados de bacterias (Diner et ál., 2013; Gao et ál., Cell 154, 748–762, 2013; Conlon et. ál., J. Immunol. 190: 5216–5225, 2013). Se han informado cinco haplotipos de hSTING (alelos WT, REF, HAQ, AQ y Q), que varían en las posiciones de aminoácidos 71, 230, 232 y 293 (Jin et ál., 2011; Yi et ál., PLOS One 8: e77846, 2013). Las células que expresan hSTING responden mal, según se informa, a la estimulación con cGAMP CDN bacterianos, c-di-AMP y c-di-GMP que tienen enlaces bis-(3', 5'), pero son sensibles al producto cGAS producido endógenamente, ML cGAMP (Diner et ál., 2013). Por lo tanto, se ha sugerido que las moléculas 2', 5'-3', 5' representan ligandos fisiológicos mucho más potentes en términos de direccionamiento a hSTING. (Zhang et

ál., Mol. Cell. 51:226-35, 2013; Xiao and Fitzgerald, Mol. Cell 51: 135-39, 2013).

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Un objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones y métodos que modulen la respuesta inmunitaria a las enfermedades. Un objetivo adicional de la invención es proporcionar composiciones y métodos que proporcionen análogos cíclicos de dinucleótidos de purina que muestran mejores características cuando se emplean para la activación de STING de mamíferos, y preferiblemente, de humanos. Un objetivo adicional de la invención es proporcionar composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden:

uno o más dinucleotidos de purina bis-3’,5’ cíclicos mono- o di-fluoro sustituidos (“compuestos mono- o di-F-CDN”), o profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, que se unen al estimulador de genes de INterferón (“STING”) y estimulan la producción de interferón de tipo I dependiente de STING en concentraciones al menos 10 veces menores que uno o más (y preferiblemente cada uno de) de bis-3', 5' c-di GMP (es decir, 3'3'-(G)(G)), bis-3', 5 'c-di-AMP (es decir, 3'3' -(A)(A) o CDA), o bis-3', 5' c-GMP-AMP (es

decir, 3'3 '- (G)(A) o cGAMP) cuando se mide utilizando al menos un alelo STING humano (h). Preferiblemente, esta se mide utilizando el alelo hSTING (REF) descrito en *Ishikawa, H., y Barber, G.N. (2008). Nature 455, 674-678,* la secuencia de proteínas de la cual es la secuencia de referencia NCBI NP_938023 (SEQ ID NO: 1: Fig. 6). Esto se mide preferiblemente *in vitro* usando una línea celular de mamífero (por ejemplo, células HEK293T) que no expresa un STING funcional de forma endógena, pero se ha modificado para expresar de forma estable el alelo hSTING(REF) como se describe de aquí en adelante (por ejemplo, véase el Ejemplo 12).

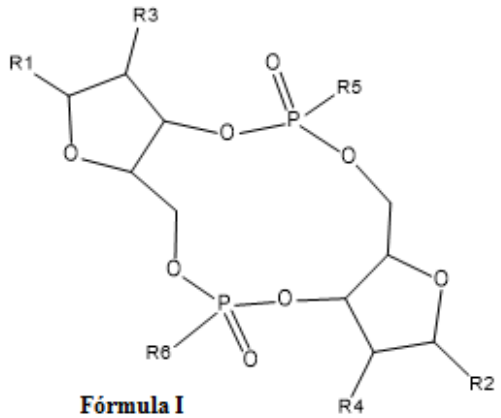
En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona composiciones que comprenden:

uno o más compuestos mono- o di-F-CDN que se unen al menos a un producto de proteína alélico de STING humano con una afinidad al menos 10 veces mayor que uno o más de bis-3', 5' c-di-GMP (es decir, 3'3'- (G)(G)), bis-3', 5' c-di-AMP (es decir, 3'3' - (A)(A) o CDA), o bis-3', 5' c-GMP-AMP (es decir, 3'3'- (G)(A) o cGAMP cuando se mide utilizando al menos una proteína STING humana. Preferiblemente, esto se mide usando aislada la proteína codificada por el alelo hSTING (REF) descrito *(Ishikawa, H., y Barber, GN (2008). Nature 455, 674-678)*, la secuencia de proteína de la cual es la Secuencia de Referencia NCBI NP_938023 usando un método tal como

fluorometría de barrido diferencial tal como se describe de aquí en adelante (por ejemplo, ver Ejemplo 11).

Como se describe de aquí en adelante, la sustitución de uno o ambos de los 2´-hidroxilos libres con flúor sobre los dinucleotidos de purina bis-3’,5’ cíclicos de la presente invención mejora sustancialmente su unión a STING humana. Una cantidadde CDN 2'-fluoro sustituidos son útiles en la presente invención. Los CDN 2'-fluoro sustituidos preferidos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados por sustitución de uno o ambos 2'- hidroxilos sobre c-di-AMP, c-di-GMP, c-di-IMP, c-AMP GMP, c-AMP-IMP, c-GMP-IMP, y análogos, o profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de estos. Esta lista no pretende ser taxativa. Aspectos y modalidades adicionales de los compuestos mono- o di-F-CDN se describen en lo sucesivo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un compuesto dinucleotido de purina bis-3’,5’-3’,5’ cíclico mono- o di-fluoro sustituido (mono- o di-F-CDN) de la Fórmula I:



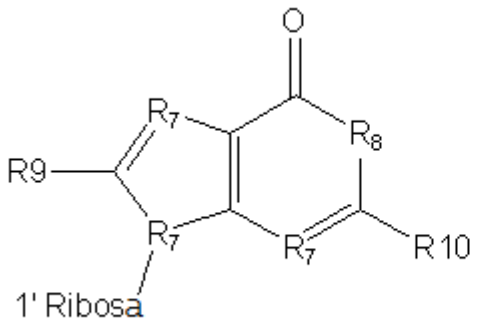
Fórmula I

,

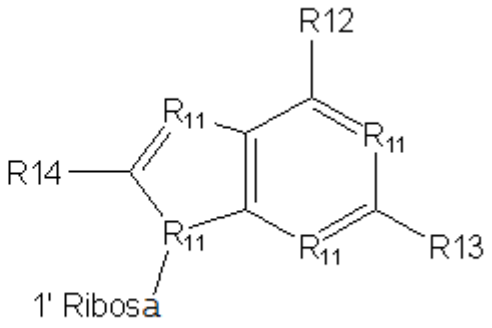
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada R1 y R2 es independientemente una purina; cada R3 y R4 es independientemente H, OH o F, siempre que uno o ambos de R3 y R4 sean F; y cada R5 y R6 es independientemente OH o SH.

En determinadas modalidades del segundo aspecto, cada R5 y R6 es SH. En modalidades preferidas cuando R5 y R6 es SH, las composiciones comprenden uno o más estereoisómeros Sp,Sp, Rp,Rp, Sp,Rp, o Rp,Sp sustancialmente puros. En algunas modalidades, las composiciones comprenden uno o más estereoisómeros Rp,Rp sustancialmente puros.

Las purinas R1 y R2 que pueden ser útiles en los compuestos descritos en la presente tienen las siguientes estructuras generales:



o



en donde:

cada R7 o R11 es independientemente -CR- o -N-; R8 es $-C(R)_2-$, -O-, o –NR-;

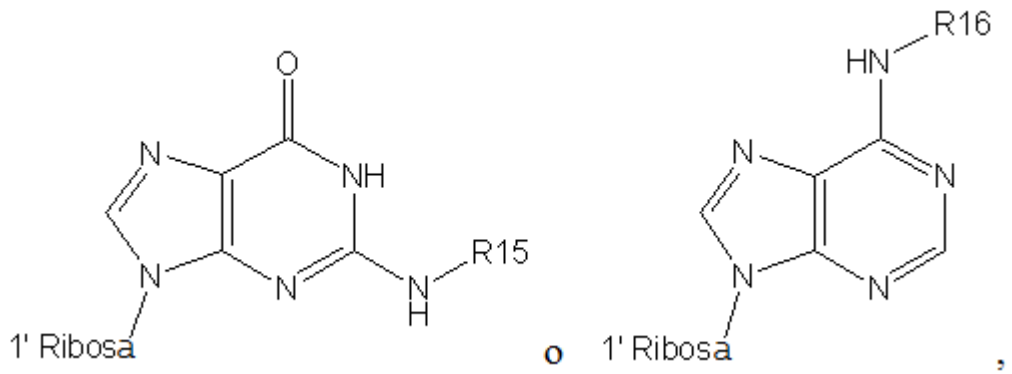
cada R9, R10, R12, R13, o R14 se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, -CN, -OR, -SR, $-N(R)_2$, -C(O)R, $-CO_2R$, $-S(O)R$, $-S(O)_2R$, $-C(O)N(R)_2$, $-SO_2N(R)_2$, -OC(O)R, -N(R)C(O)R, $-N(R)N(R)_2$, -C=NOR, $-N(R)C(O)N(R)_2$, $-N(R)SO_2N(R)_2$, $-N(R)SO_2R$, $-OC(O)N(R)_2$ o un sustituyente opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consta de fenilo alifático C_{1-12}, un anilllo monocíclico carbocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros, un anillo bicíclico carbocíclico saturado o parcialmente insaturado de 7-10 miembros, un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre, un anillo bicíclico heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 7-10 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre, y un anillo heteroarilo de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, en donde cada R es independientemente un sustituyente opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consta de fenilo alifático C_{1-12}, un anillo carbocíclico monocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros, un anillo carbocíclico bicíclico saturado o parcialmente insaturado de 7-10 miembros, un anillo heterociclico saturado o parcialmente

insaturado de 3-7 miembros que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico saturado o parcialmente insaturado de 7-10 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre, y un anillo heteroarilo de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre, o dos grupos R en el mismo nitrógeno se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo heteroarilo, saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre. Cada fenilo alifático C_{1-12}, anillo carbocíclico monocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros, anillo carbocíclico bicíclico saturado o parcialmente insaturado de7-10 miembros, anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros, anilllo heterociclico biciclico saturado o parcialmente insaturado de 7-10 miembros, y anillo heteroarilo de 5-6 miembros, o dos grupos R en el mismo nitrógeno tomados juntos para formar un anillo heteroarilo, saturado o parcialmente insaturado, de 3-7 miembros, se sustituyeopcionalmente con 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, o 1 sustituyentes seleccionados independientemente del

grupo que conta de halógeno, -CN, $-NO_2$, -OH, =O, $-NH_2$, alquilo C_{1-6}, alcoxi C_{1-6}, alquilamino C_{1-6} y di-alquilaamino C_{1-6}.

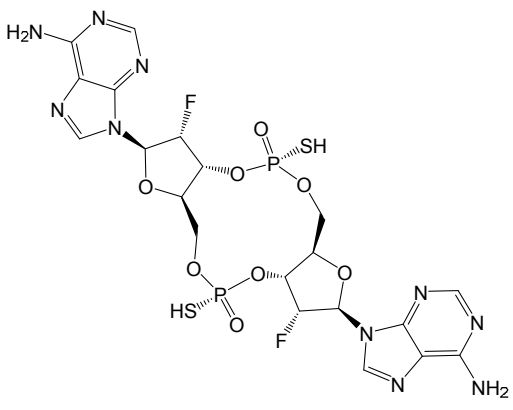
En determinadas modalidades del segundo aspecto y modalidades de este, cada R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en adenina, guanina, isoguanina, hipoxantina, y xantina o análogos de estos. En algunas modalidades, cada R1 y R2 es, independientemente, adenina o guanina. En algunas modalidades, R1 o R2 es adenina, y el otro de R1 o R2 es guanina; cada R1 y R2 es adenina; o cada R1 y R2 es guanina, o en cada caso o análogos de estos. En una modalidad preferida, R1 y R2 son, independientemente, adenina o guanina, siempre que R1 y R2 no sean ambos guanina, o análogos de estos.

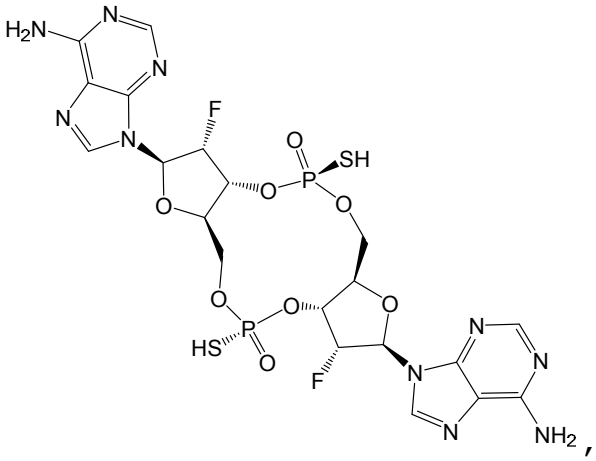
En algunas modalidades del segundo aspecto y modalidades de este, cada R5 y R6 es SH y R1 y R2 son independientemente:

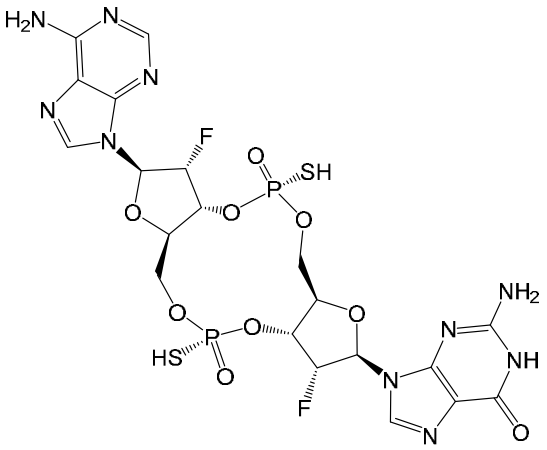


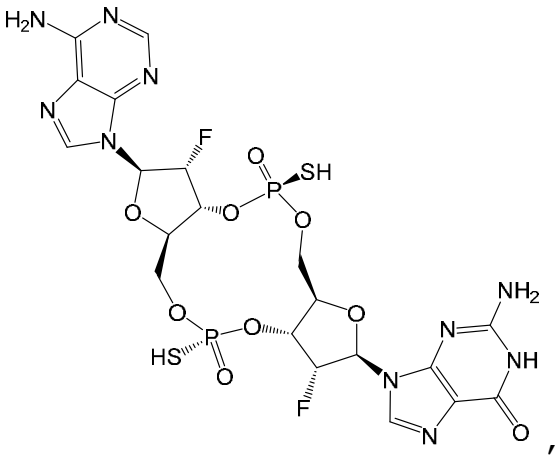
en donde R15 y R16 son independientemente H o -C(O)R', en donde R' es alquilo C_{1-6} o fenilo. En algunas modalidades, R15 es H o -C(O)-isopropilo y R16 es H o -C(O)-fenilo.

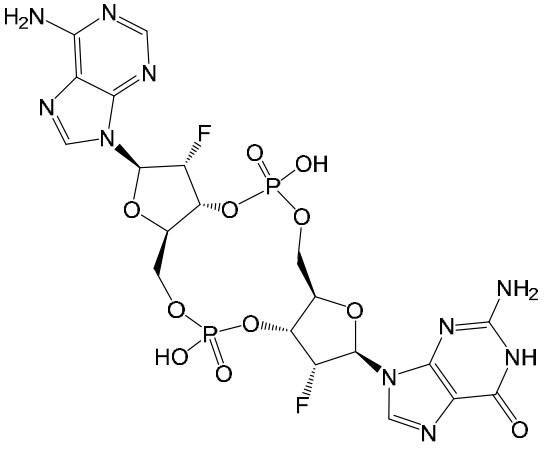
En algunas modalides del segundo aspecto y modalidades de este, el compuesto de la Fórmula I se selecciona del grupo que consiste en:

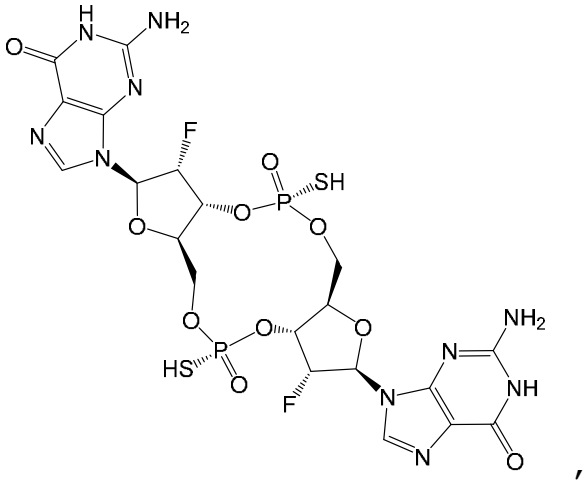

,

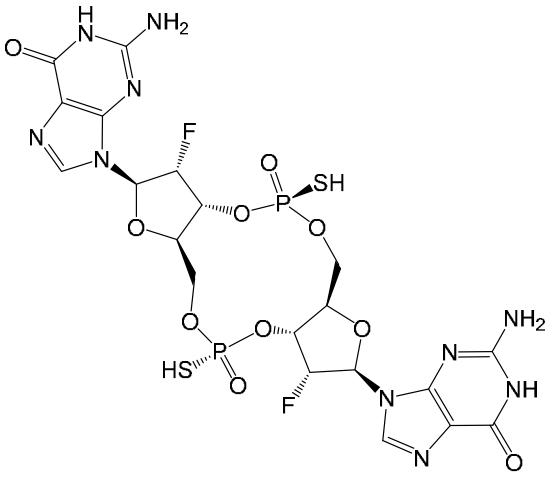
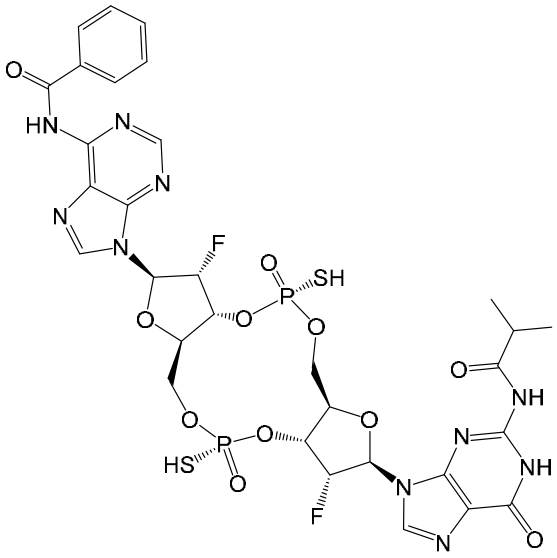
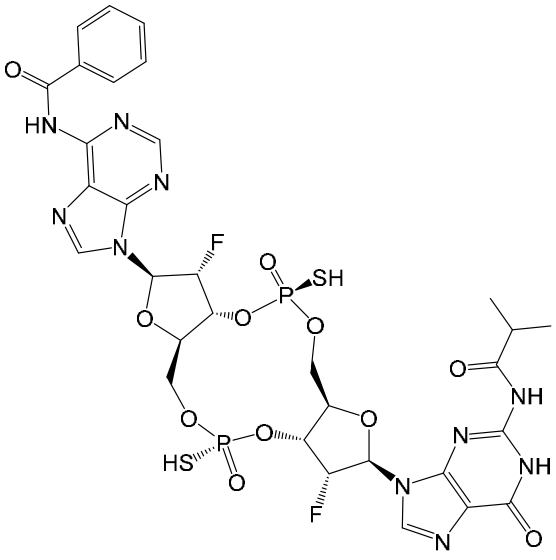
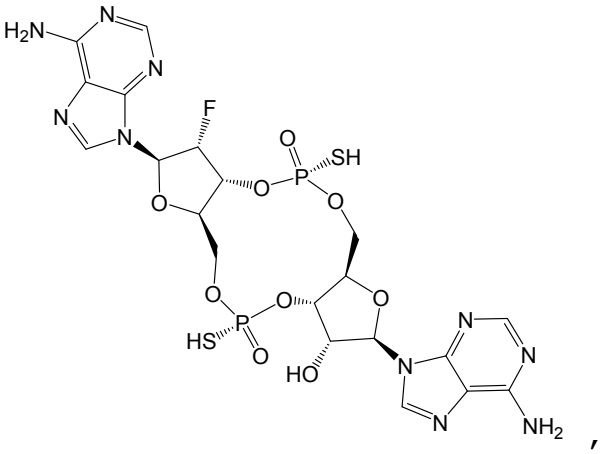
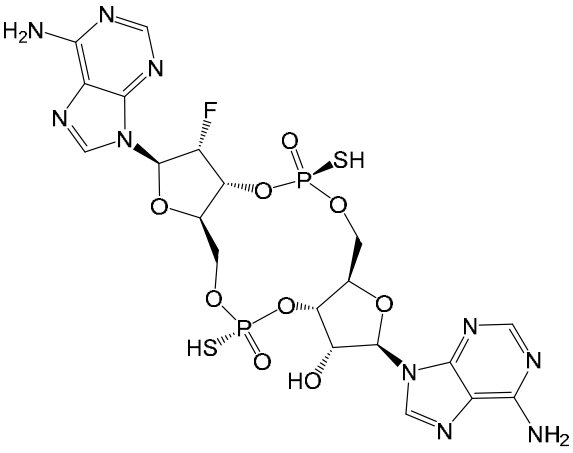
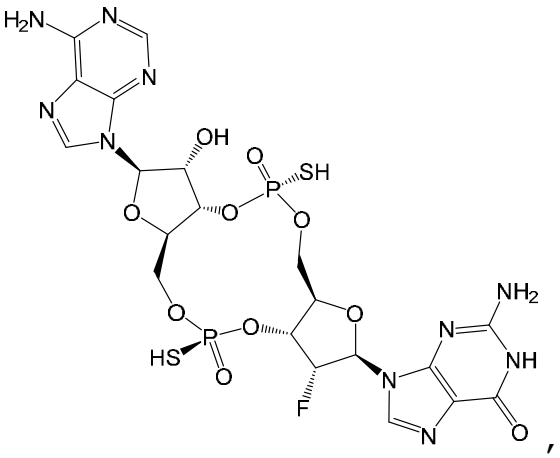

,

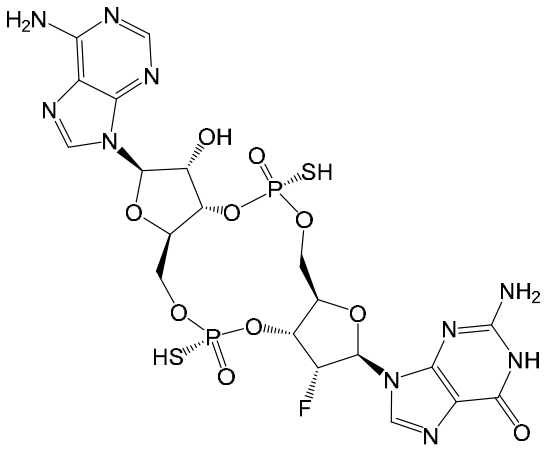
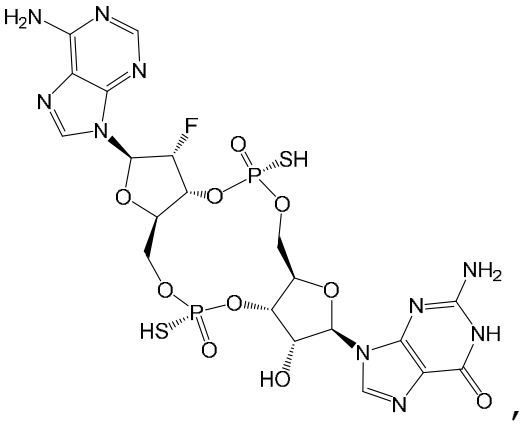
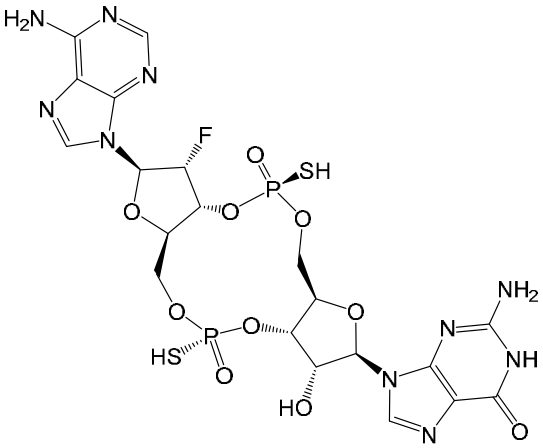
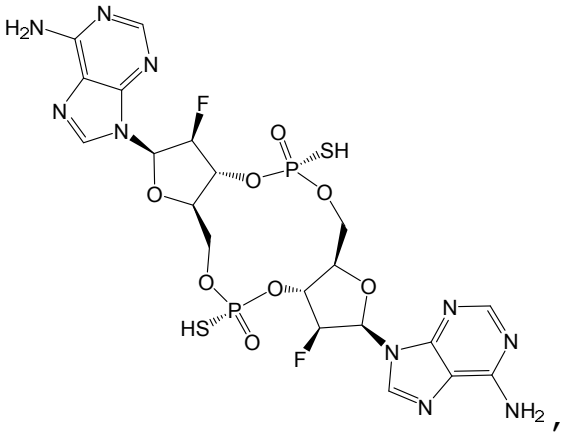
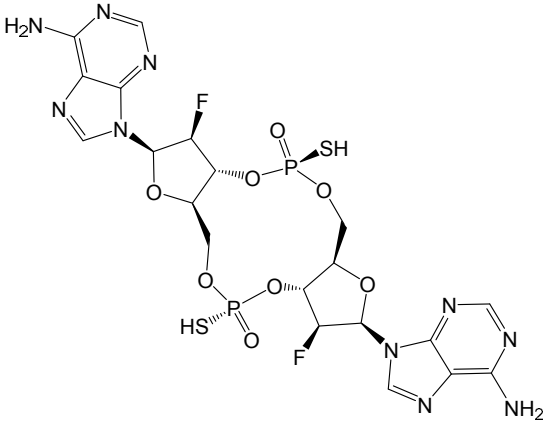
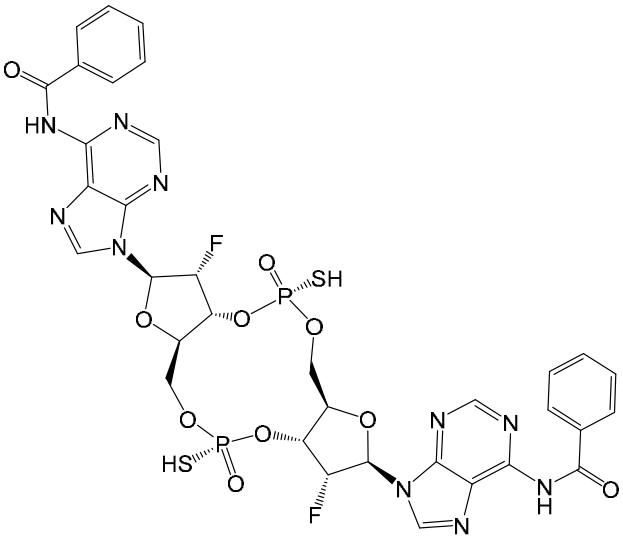

,

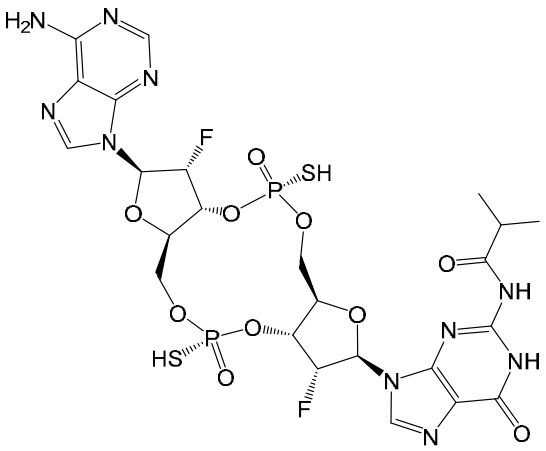

,


,


,


,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

.



y

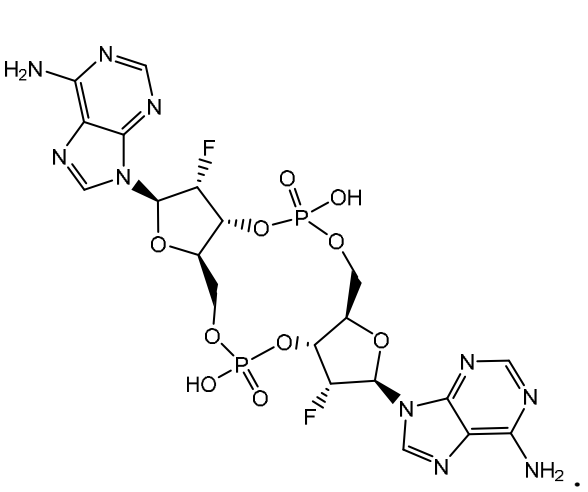
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de estos.

En modalidades preferidas del segundo aspecto y modalidades de este, cada R3 y R4 es F. Esto se denomina en la presente 2', 2''- diF o di-2'F.

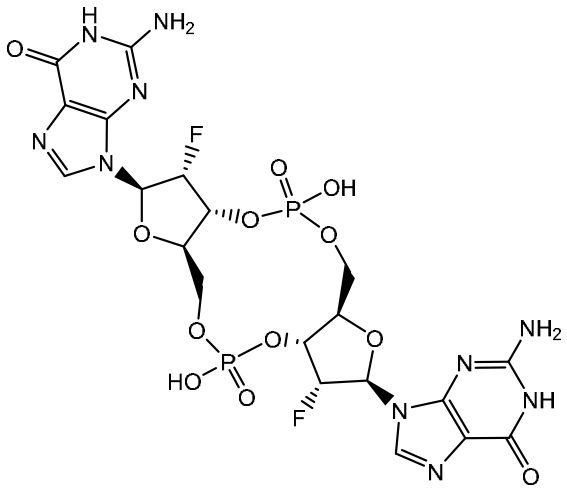
En algunas modalidades, uno o más compuestos son dinucleotidos de purina cíclicos 2’,2’’-diF-Rp,Rp (así, en los cuales cada R5 y R6 es SH), incluidos, de modo no taxativo, 2’,2’’-diF-Rp,Rp-c-di-AMP (también denominado en la presente 2’,2’’-diF-R,R-CDA o 3’3’-RR-(2’F-A)(2’F-A)), 2’,2’’-diF-Rp,Rp-c-di-GMP (también denominado en la presente2’,2’’-diF-R,R-CDG o 3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-G)), 2’,2’’-diF-Rp,Rp-c-di-IMP (también denominado en la presente 2’,2’’-diF-R,R-CDI o 3’3’-RR-(2’F-I)(2’F-I)), 2’,2’’-diF-Rp,Rp-c-AMP-GMP (también denominado en la presente

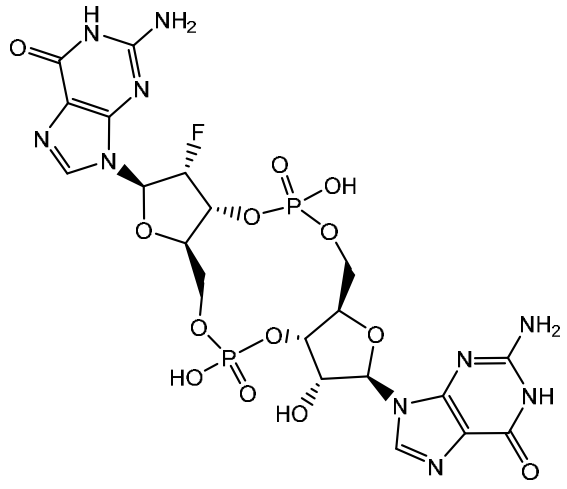
2’,2’’-diF-R,R-cGAMP o 3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-A)), 2’,2’’-diF-Rp,Rp-c-AMP-IMP (también denominado en la presente 2’,2’’-diF-R,R-cIAMP o 3’3’-RR-(2’F-I)(2’F-A)), 2’,2’’-diF-Rp,Rp-c-GMP-IMP (también denominado en la presente 2’,2’’-diF-R,R-cGIMP o 3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-I)), y análogos de estos.

En una modalidad preferida del segundo aspecto, y cualquiera de las modalidaes de este, el compuesto no es uno de los siguientes:



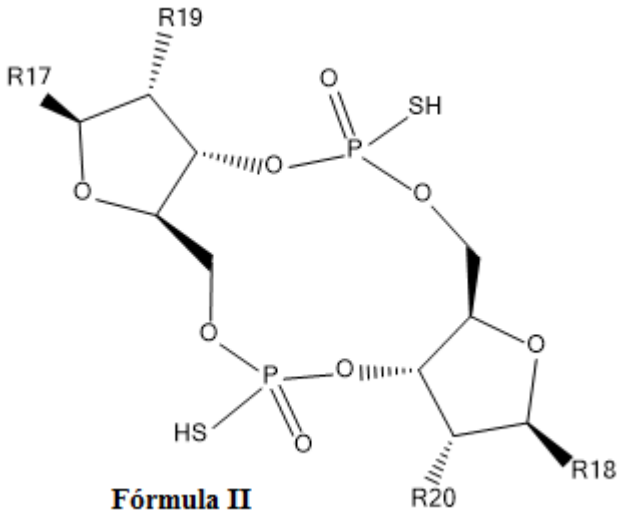
.





o .

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto mono- o di-F-CDN de la Formula II:



Fórmula II

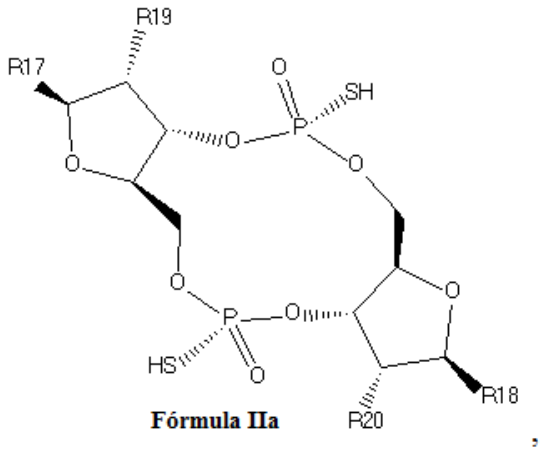
,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

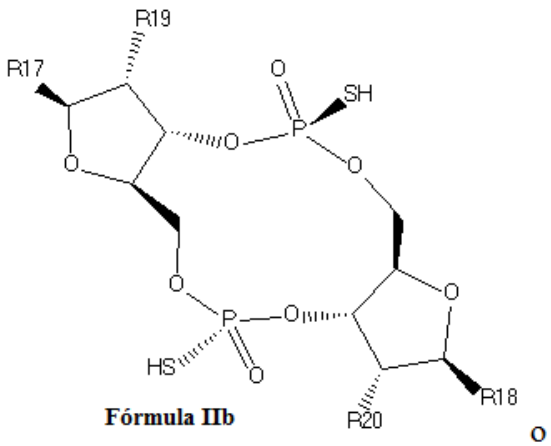
R17 y R18 son independientemente una guanina o adenina unida a la estructura a través de la posición N9, en donde la amina de la posición 6 de adenina está opcionalmente sustituida con un grupo benzoílo y en el que la amina de la posición 2 de la guanina está sustituida opcionalmente con un grupo isobutirilo;

R19 y R20 son, independientemente, OH o F, siempre que al menos uno de R19 y R20 sea F.

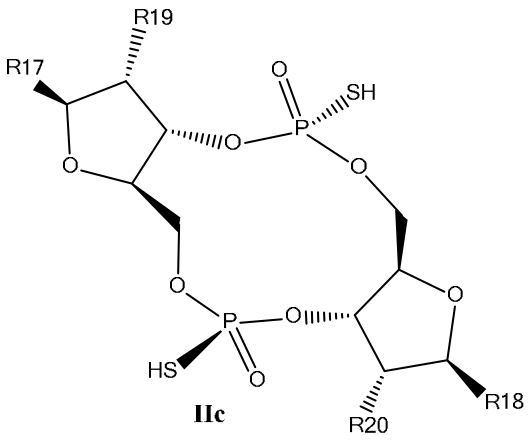
En una primera modalidad del tercer aspecto, el compuesto de la Fórmula II es un compuesto de la Fórmula IIa, un compuesto de la Fórmula IIb o un compuesto de la Fórmula IIc:



Fórmula IIa ,



Fórmula IIb o



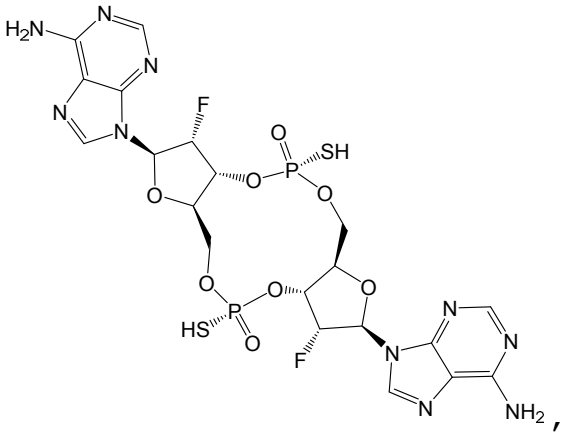
IIc

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde R17, R18, R19 y R20 son como se definen para la Fórmula II.

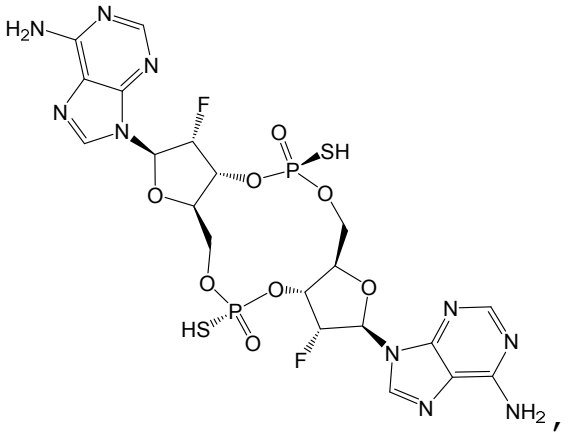
En una segunda modalidad del tercer aspecto o primera modalidad de este, R17 y R18 son, independientemente, adenina o guanina. En algunas modalidades, R17 y R18 son, independientemente, adenina o guanina, siempre que R17 y R18 no sean ambos guanina. En algunas modalidades, R17 y R18 son ambos adenina. En algunas modalidades, R17 y R18 son ambos guanina. En algunas modalidades, uno de R17 y R18 es adenina y el otro de R17 y R18 es guanina.

En algunas modalides del tercer aspecto, y la primera o segunda modalidad de este, uno de R19 y R20 es F y el otro de R19 y R20 es OH. En algunas modalidades, R19 y R20 son ambos F. En algunas modalidades, R19 y R20 son ambos F y el compuesto es un compuesto de la Fórmula IIa.

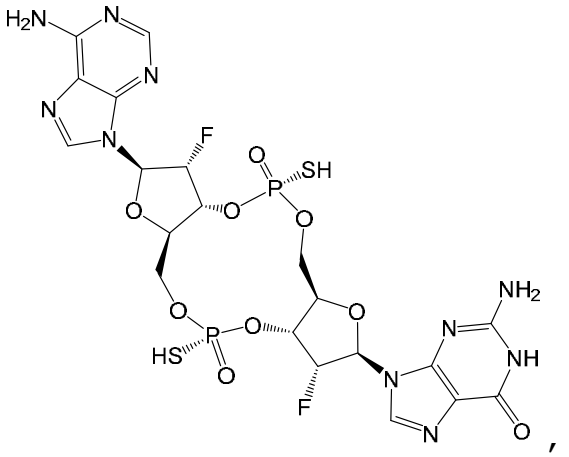
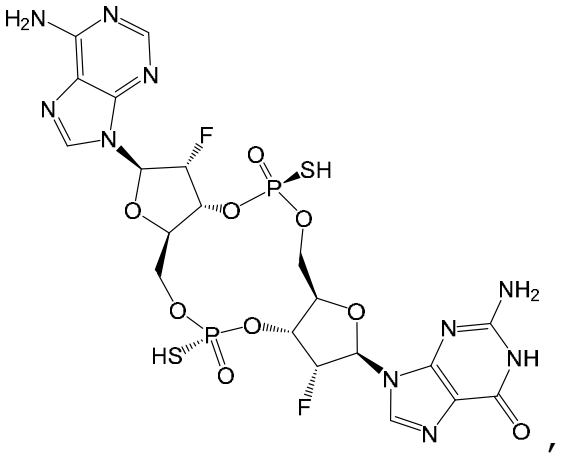
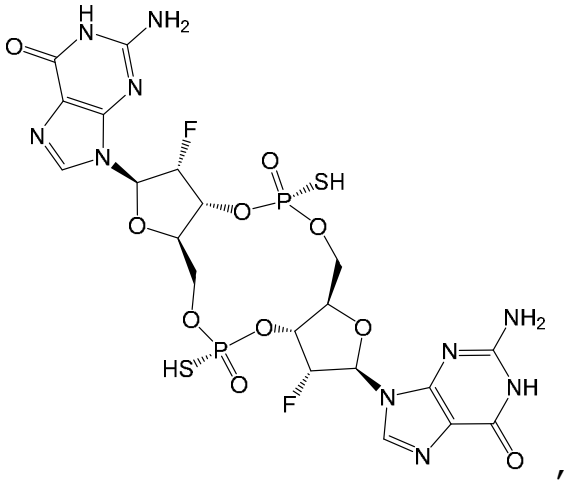
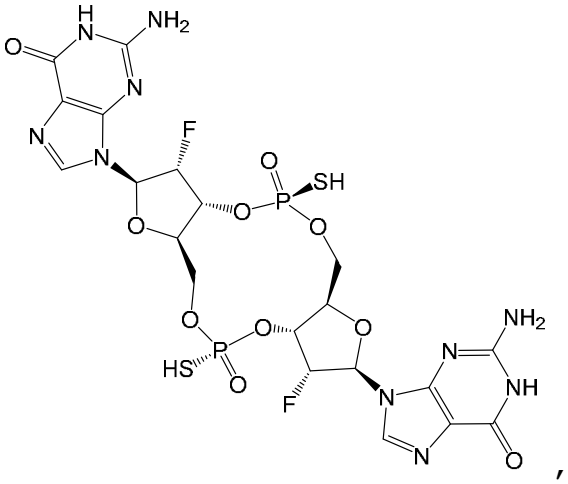
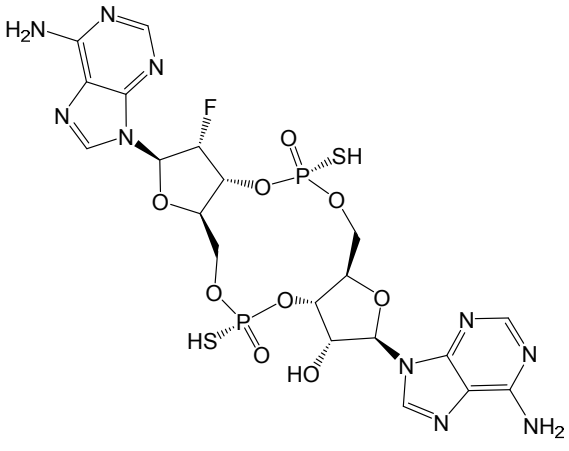
En algunas modalidades del tercer aspecto, el compuesto mono- o di-F-CDN se selecciona del grupo que consiste en:

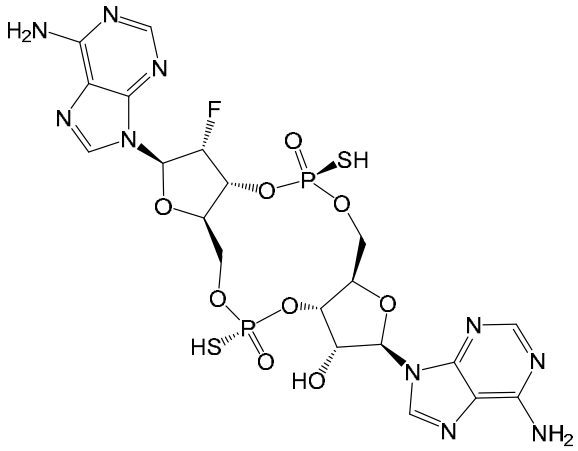
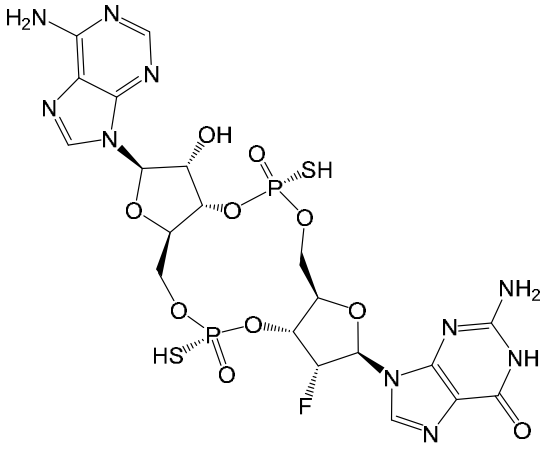
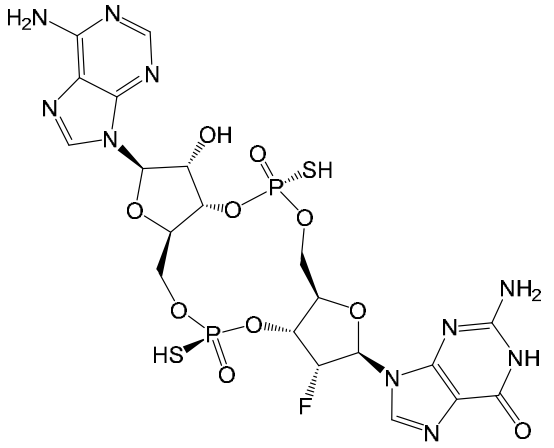
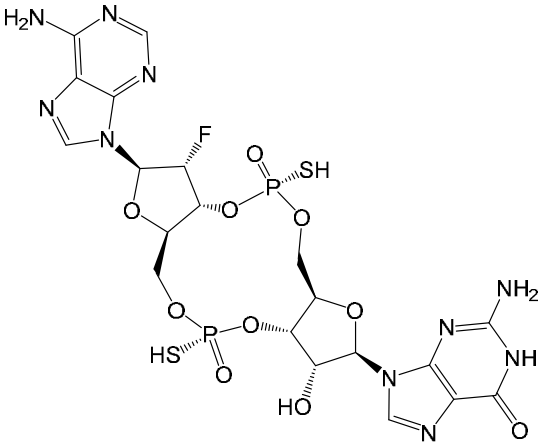
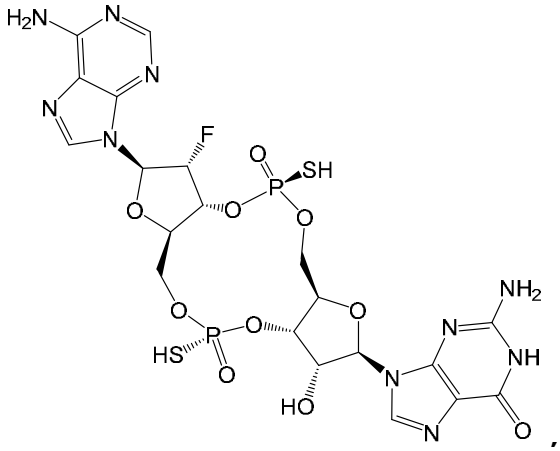


,



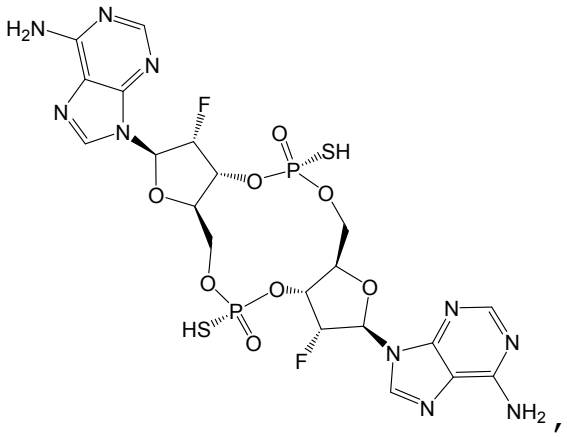
,

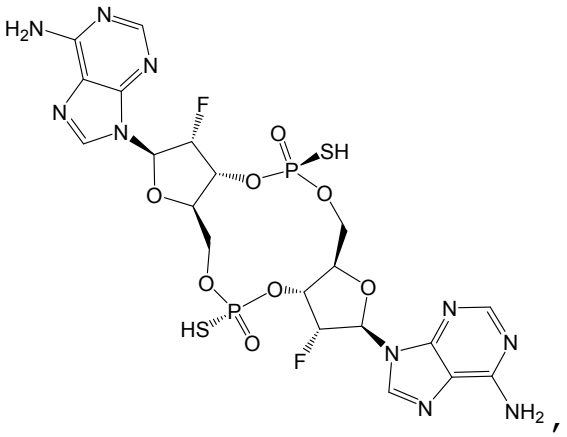

,

,

,

,

,

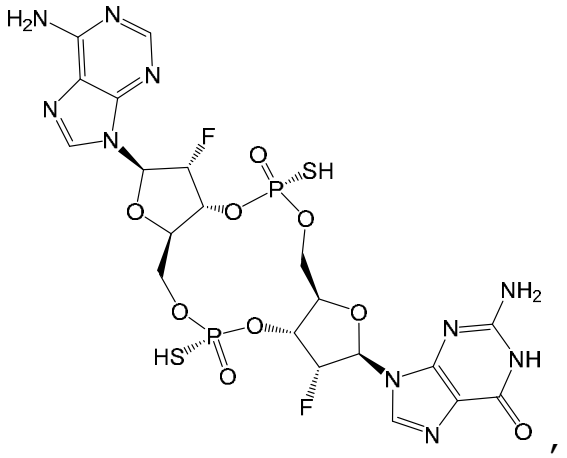

,

,

,

y

,

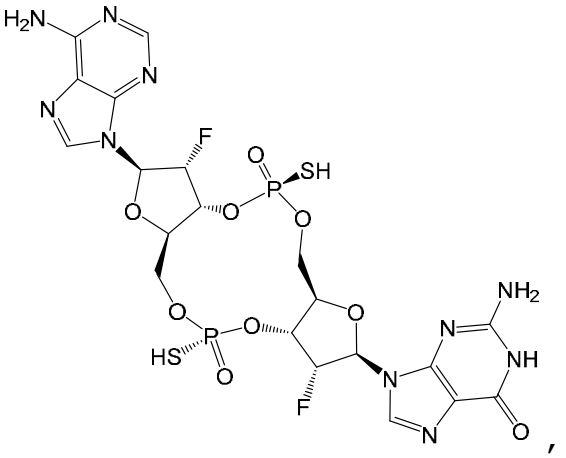
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

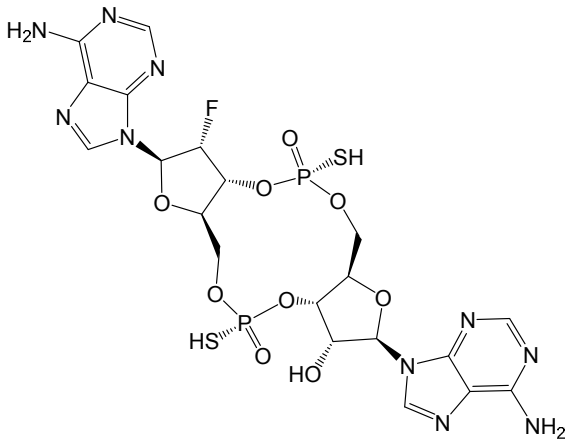
En algunas modalidades del tercer aspecto, el compuesto mono- o di-F-CDN se selecciona del grupo que consiste en:

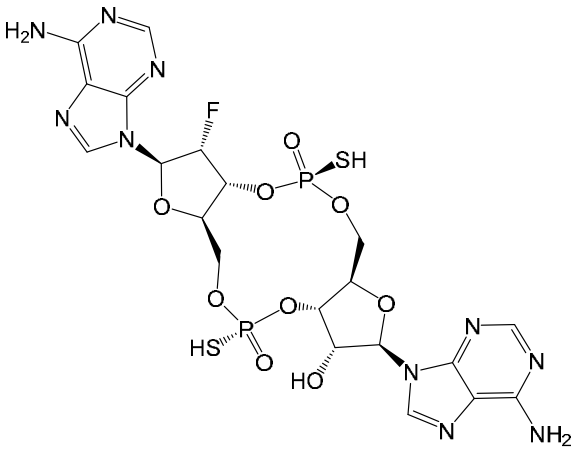
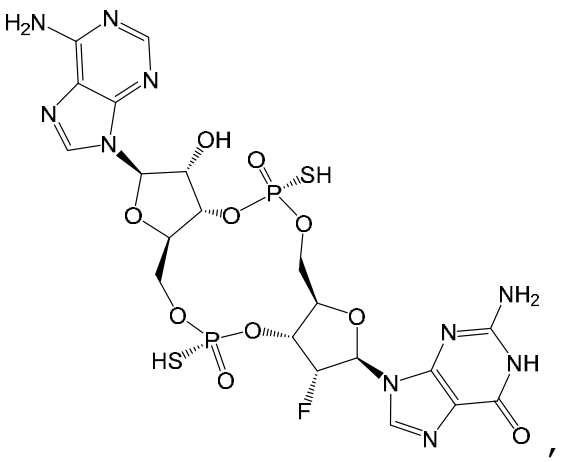
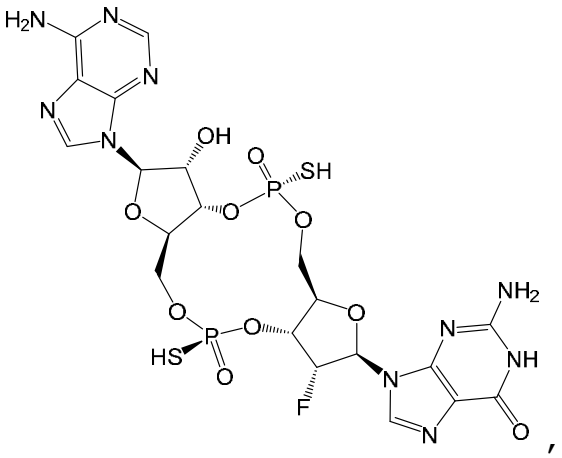
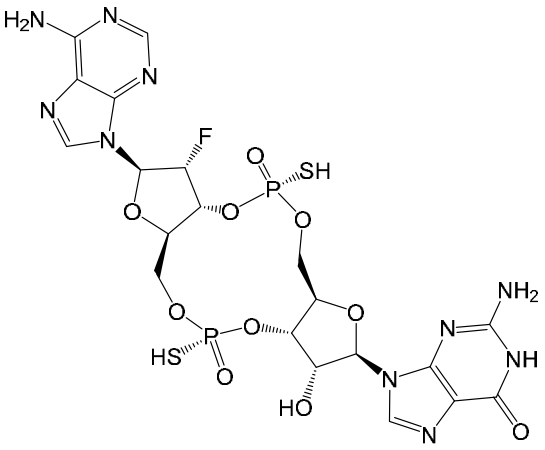
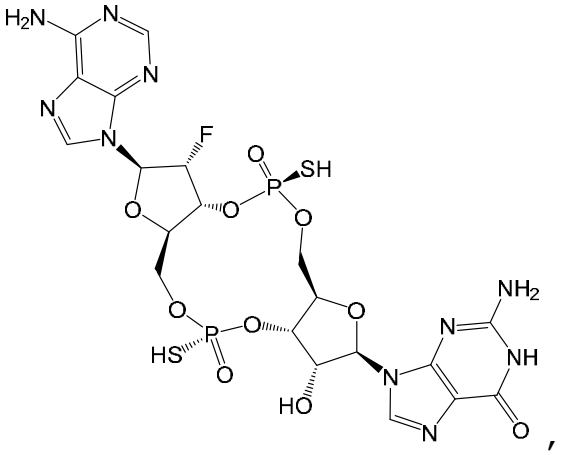

,


,


,

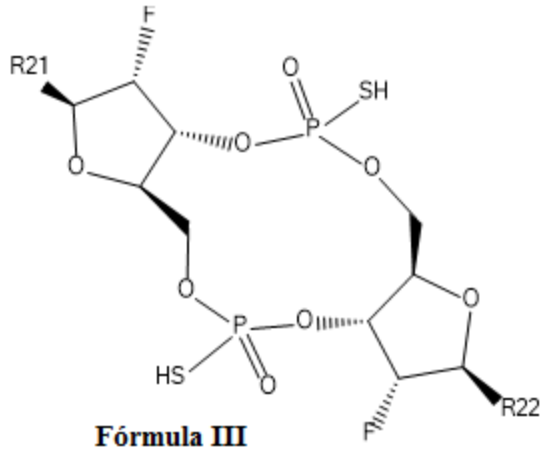

,


,


,

,

,

y

,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un compuesto di-F-CDN de la Formula III:

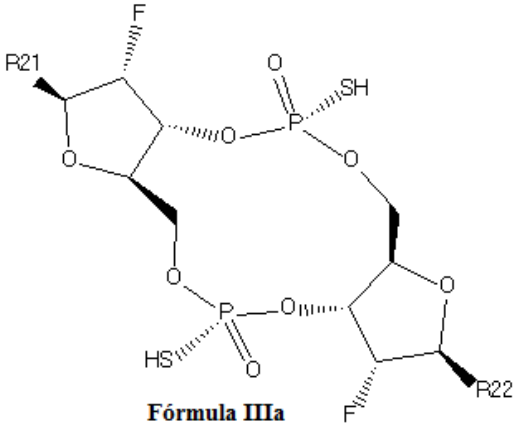


Fórmula III

,

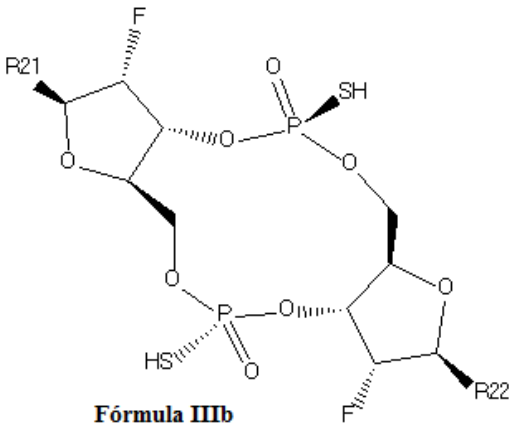
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde R21 y R22 son independientemente una guanina o adenina unida a la estructura a través de la posición N9.

En una primera modalidad del cuarto aspecto, el compuesto de la Fórmula III es un compuesto de la Fórmula IIIa, o un compuesto de la Fórmula IIIb:



Fórmula IIIa

o



Fórmula IIIb

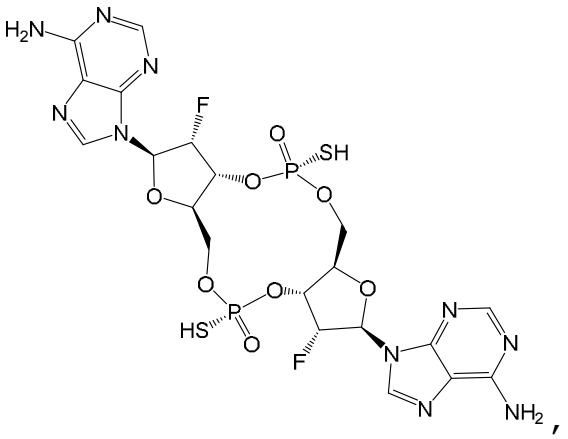
,o

un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde R21 y R22 son como se definen para la Fórmula III.

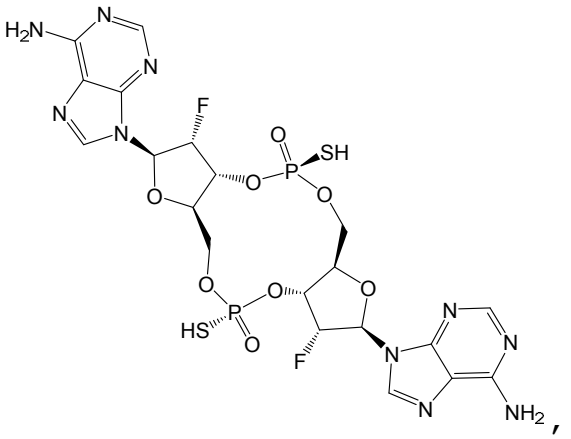
En una segunda modalidad del cuarto aspecto o primera modalidad de este, R21 y R22 son independientemente una guanina o adenina, siempre que R21 y R22 no sean ambos guanina. En algunas modalidades, R21 y R22 son ambos adenina. En algunas modalidades, R21 es adenina y R22 es guanina.

En algunas modalidades del cuarto aspecto, o la primera o segunda modalidad de este, el compuesto es un compuesto de fórmula IIIa.

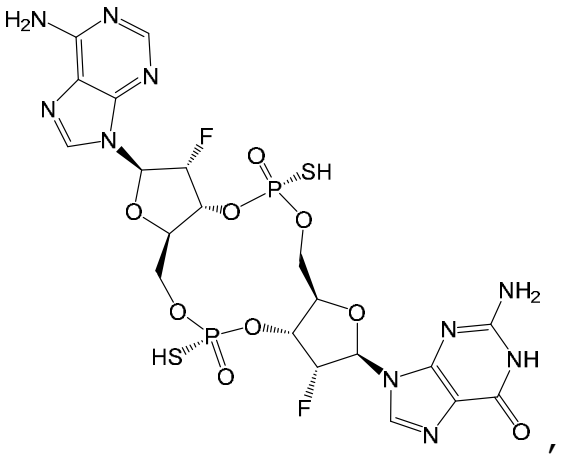
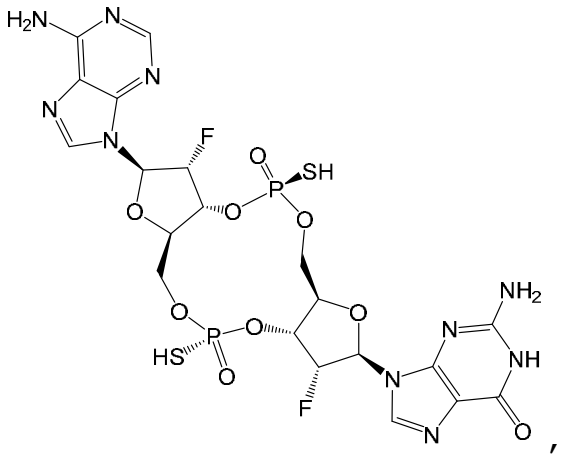
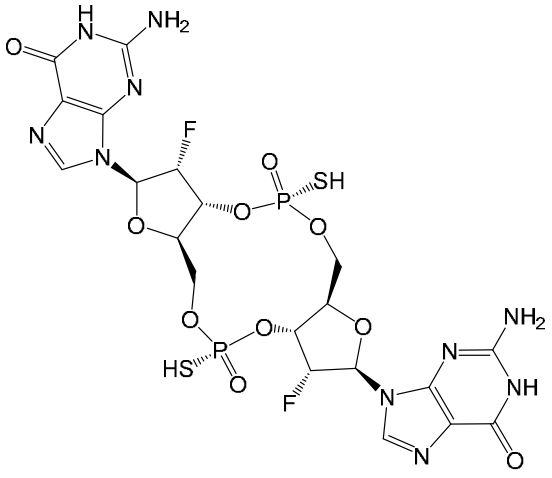
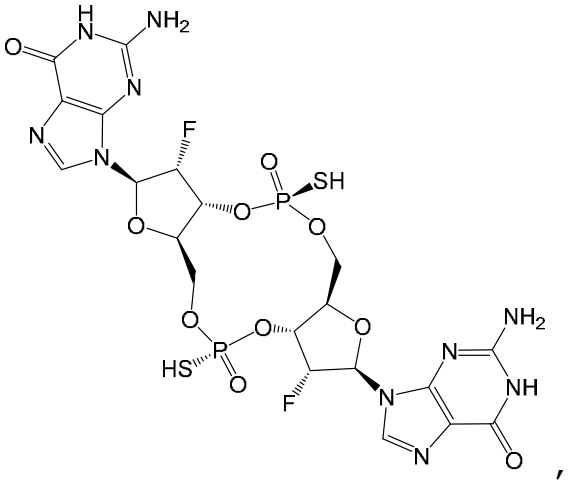
En algunas modalidades del cuarto aspecto, el compuesto di-F-CDN se selecciona del grupo que consiste en:



,

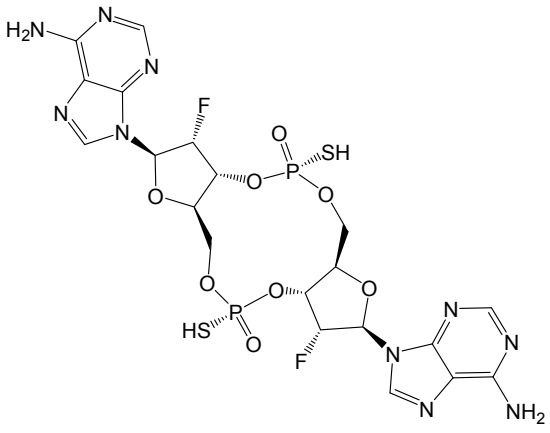
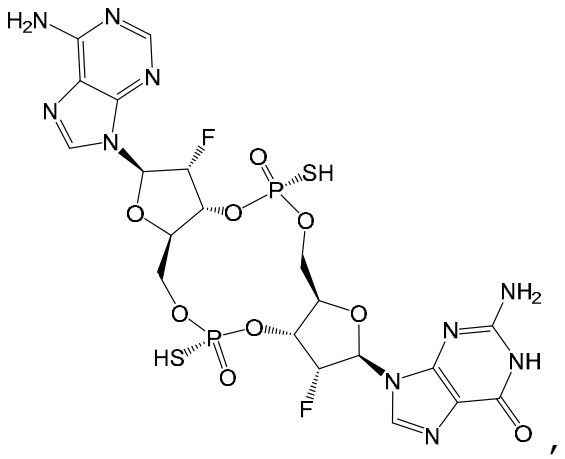
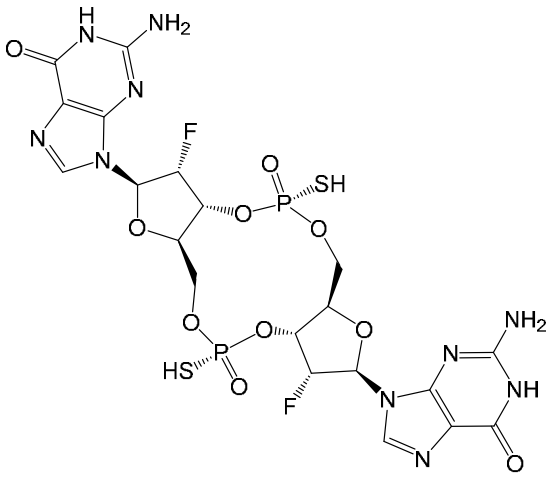


,


,

,

y

,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

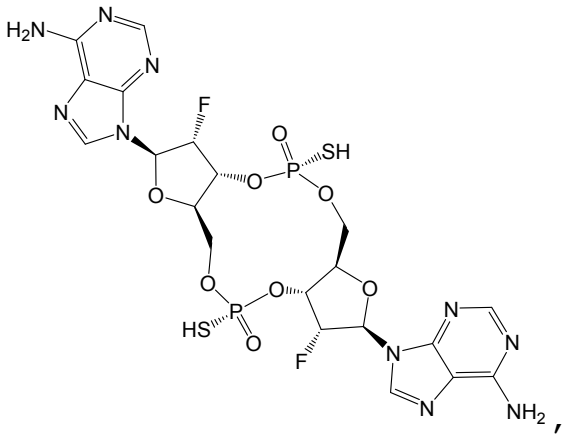
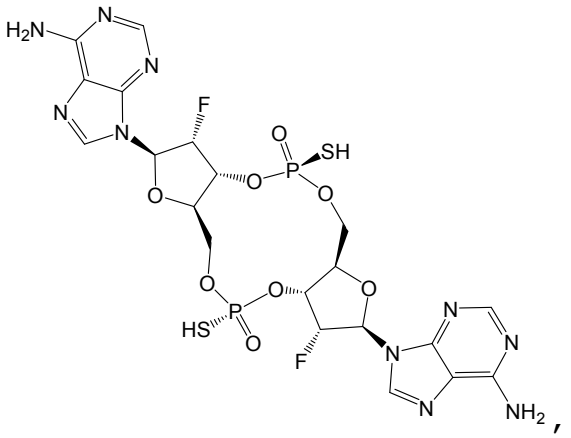
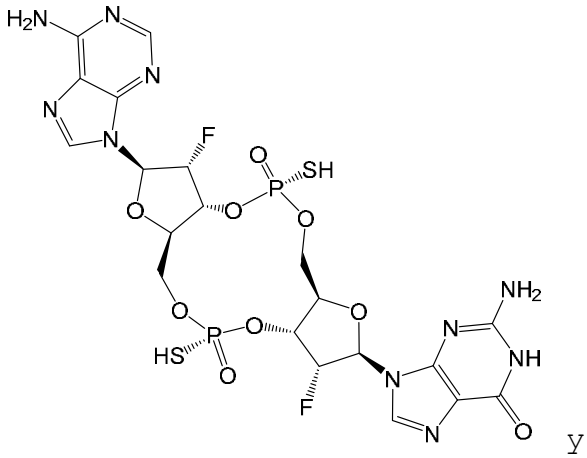
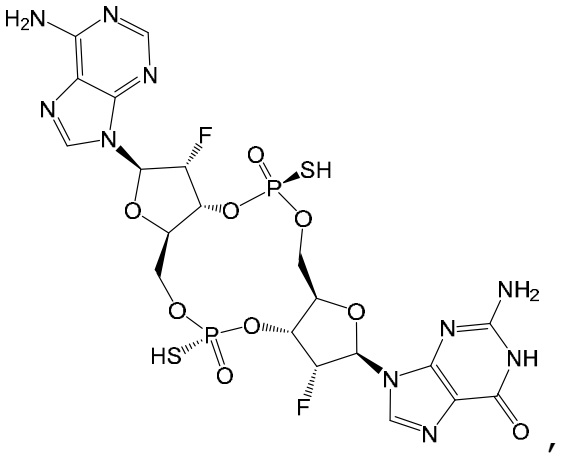
En algunas modalidades del cuarto aspecto, el compuesto di-F-CDN se selecciona del grupo que consiste en:

y

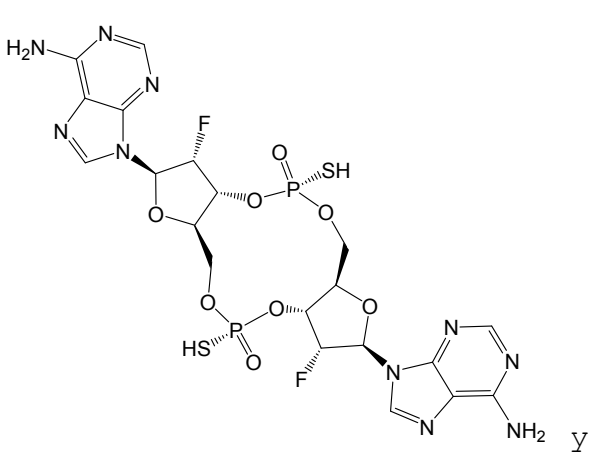
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas modalidades del cuarto aspecto, el compuesto di-F-CDN se selecciona del grupo que consiste en:

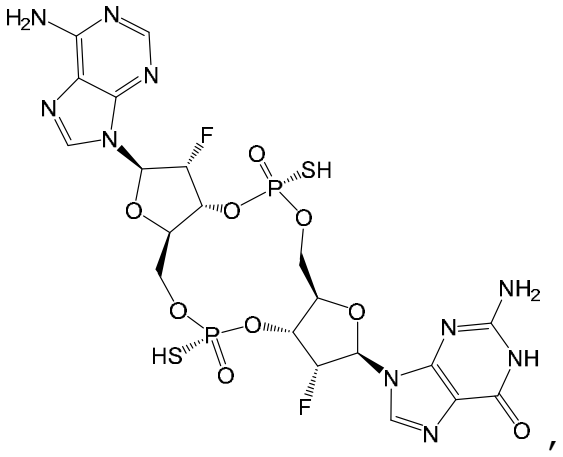





o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas modalidades del cuarto aspecto, el compuesto di-F-CDN se selecciona del grupo que consiste en:



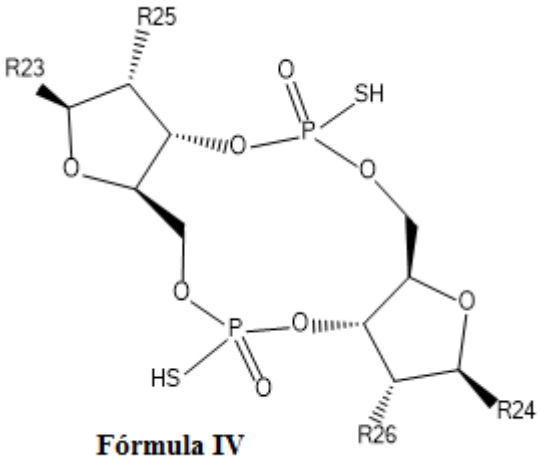
y



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un compuesto mono-F-CDN de la Formula IV:



Fórmula IV

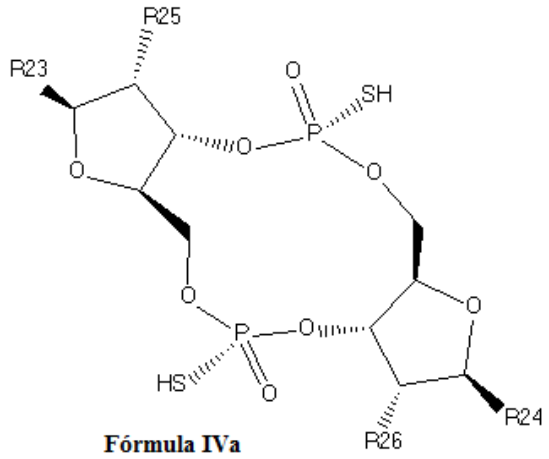
,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

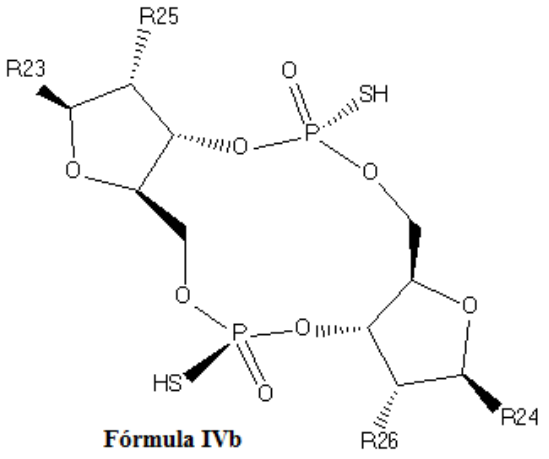
R23 y R24 son independientemente una guanina o adenina unida a la estructura a través de la posición N9; y

uno de R25 y R26 es OH y el otro de R25 y R26 es F.

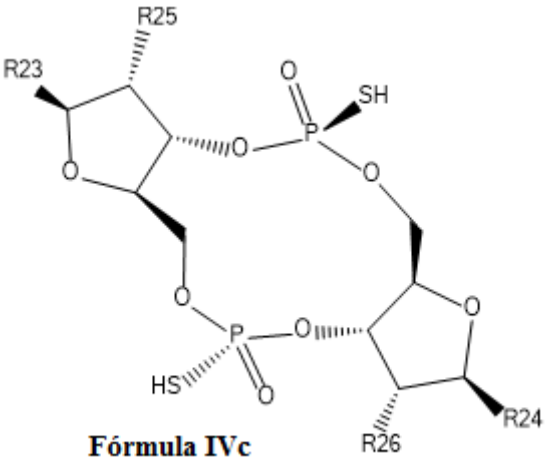
En una primera modalidad del quinto aspecto, el compuesto de la Fórmula IV es un compuesto de la Fórmula IVa, un compuesto de la Fórmula IVb o un compuesto de la Fórmula IVc:



Fórmula IVa,



Fórmula IVb o



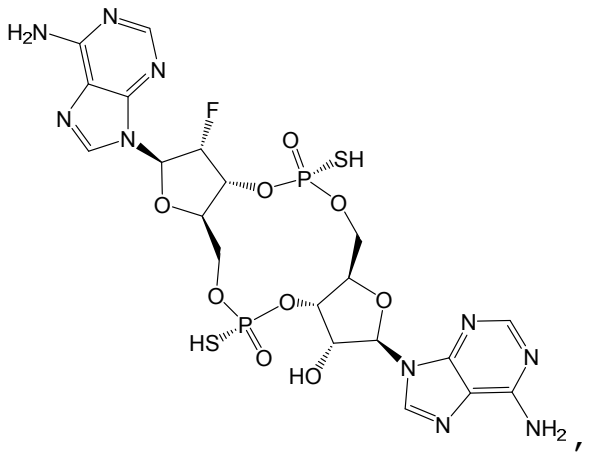
Fórmula IVc,

un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde R23, R24, R25 y R26 son como se definen para la Fórmula IV.

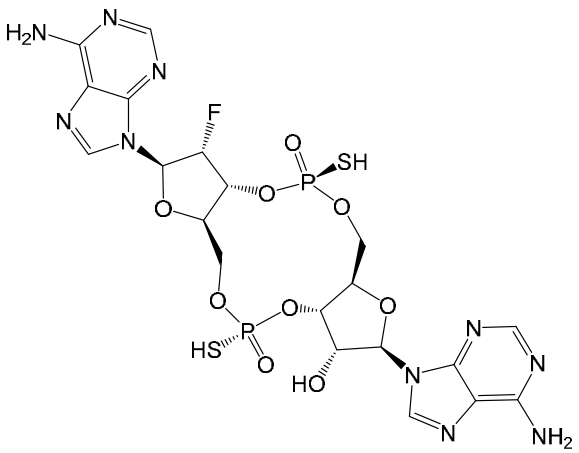
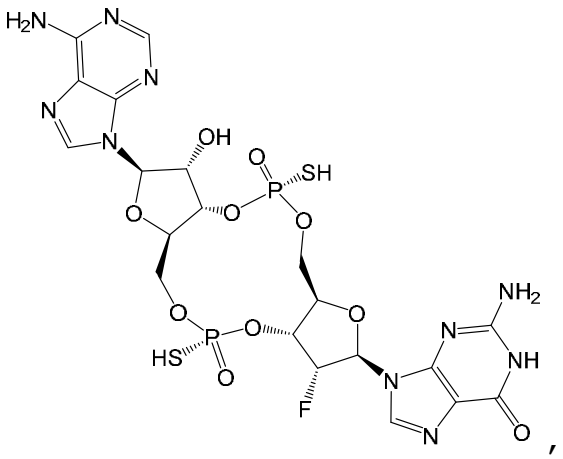
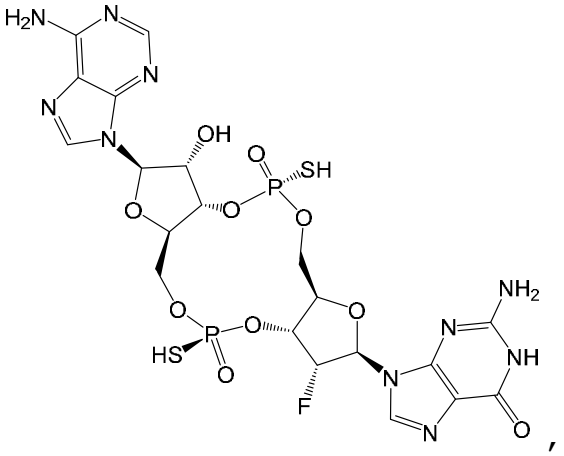
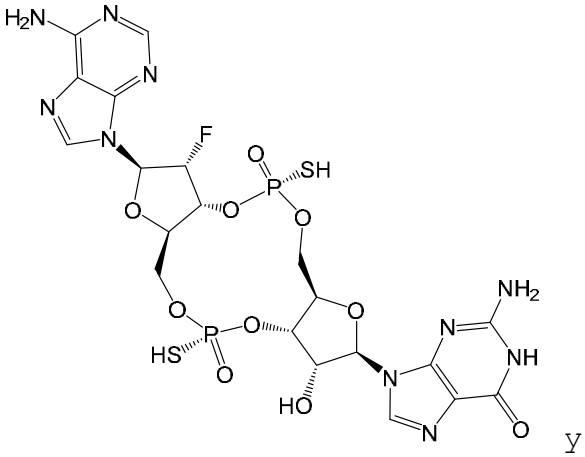
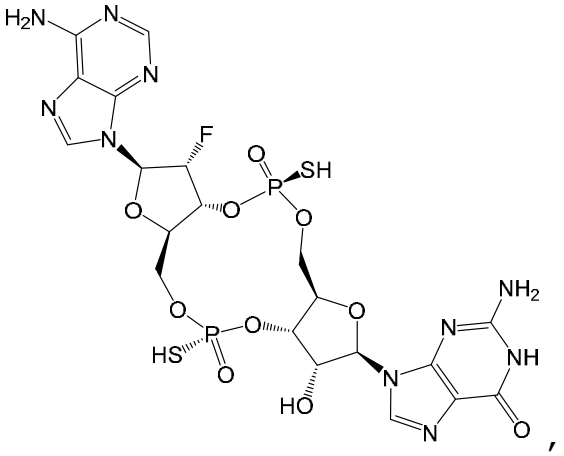
En una segunda modalidad del quinto aspecto o primera modalidad de este, R23 y R24 son independientemente adenina o guanina siempre que R23 y R24 no sean ambos guanina. En algunas modalidades, R23 y R24 son ambos adenina. En algunas modalidades, uno de R23 y R24 es adenina y el otro de R23 y R24 es guanina.

En algunas modalidades del quinto aspecto, o la primera o segunda modalidad de este, el compuesto es un compuesto de la fórmula IVa.

En algunas modalidades del quinto aspecto, el compuesto mono-F-CDN se selecciona del grupo que consiste en:

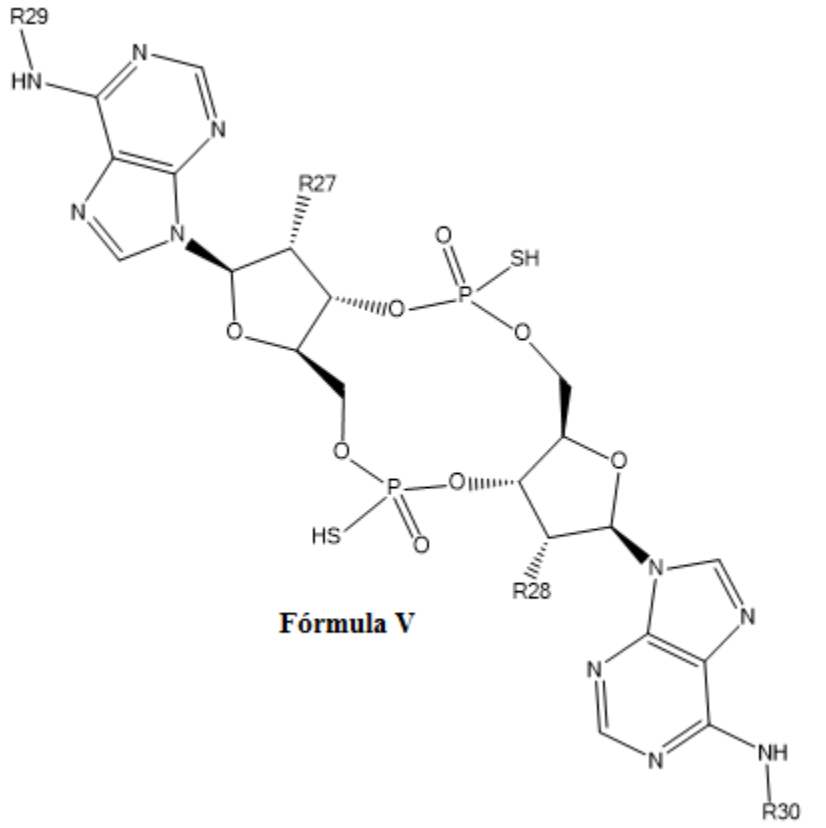


,


,

,

,

y

,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un compuesto di-adenina mono- o di -F cíclico de la Formula V:



Fórmula V

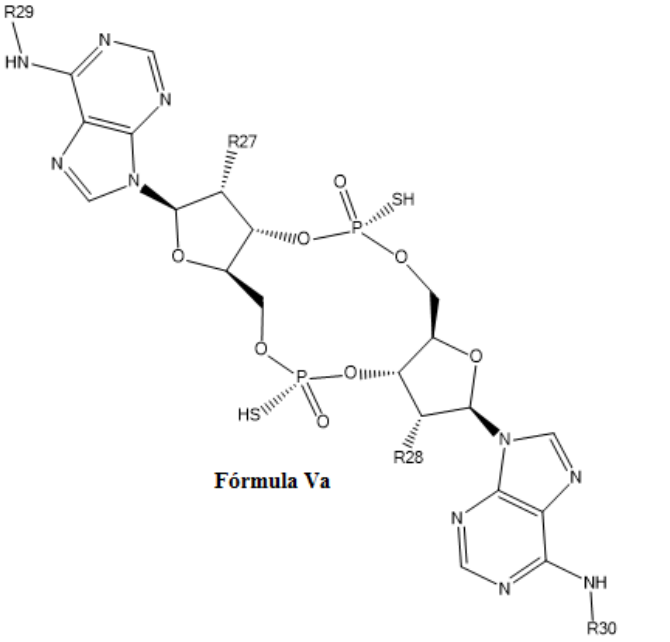
,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

R27 y R28 son, independientemente, OH o F, siempre que al menos uno de R27 y R28 sea F; y

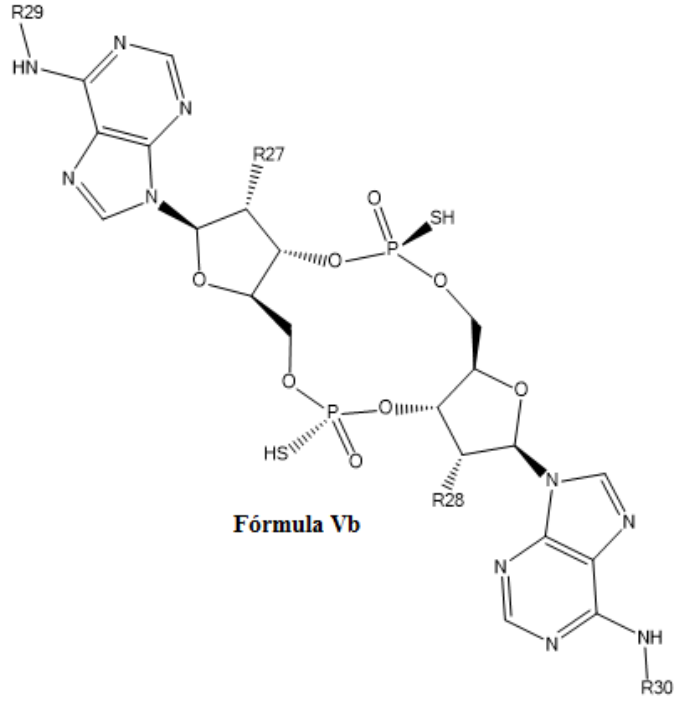
R29 y R30 son independientemente H o benzoílo.

En una primera modalidad del sexto aspecto, el compuesto de la Fórmula V es un compuesto de la Fórmula Va, o un compuesto de la Fórmula Vb:



Fórmula Va

o



Fórmula Vb

,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente

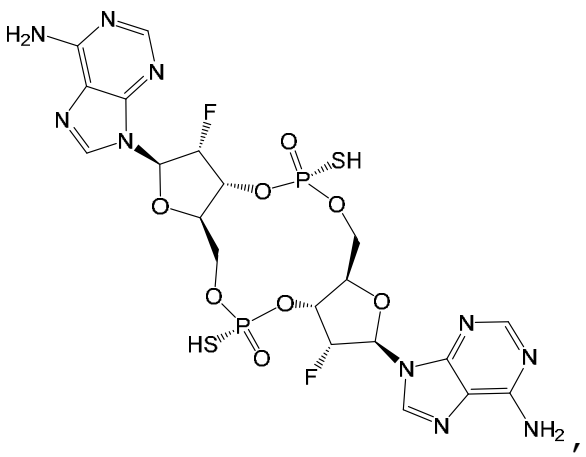
aceptable de este, en donde R27, R28, R29 y R30 son como se definen para la Fórmula V.

En una segunda modalidad del sexto aspecto o primera modalidad de este, R29 y R30 son ambos H. En algunas modalidades, R29 y R30 son ambos benzoílo. En algunas modalidades, uno de R29 y R30 es benzoílo y el otro de R29 y R30 es H.

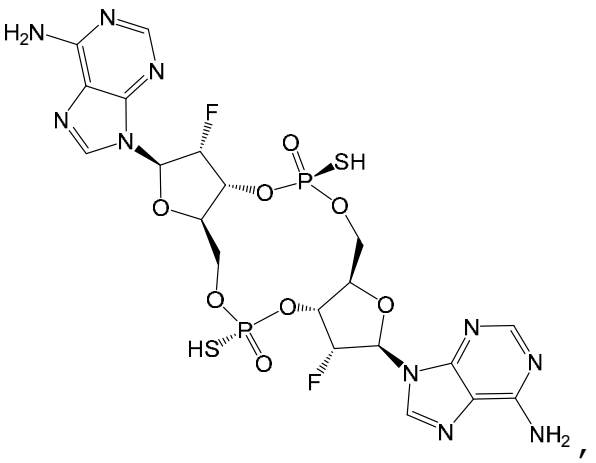
En algunas modalidades del sexto aspecto, y la primera o segunda modalidad de este, R27 y R28 son ambos F. En algunas modalidades, uno de R27 y R28 es F y el otro de R27 y R28 es OH.

En algunas modalidades del sexto aspecto, R27 y R28 son ambos F, y R29 y R30 son ambos H. En algunas modalidades, el compuesto es un compuesto de la fórmula Va, R27 y R28 son ambos F, y R29 y R30 son ambos H.

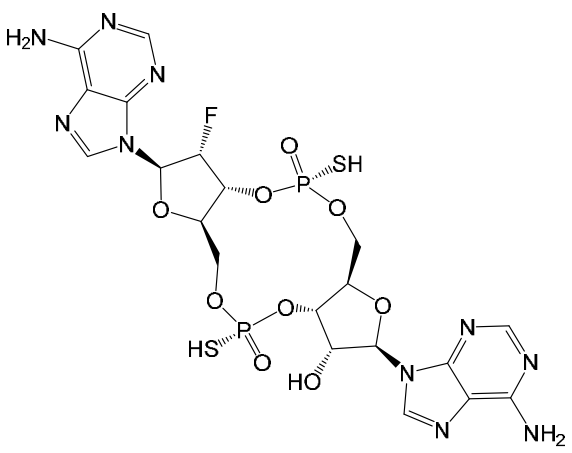
En algunas modalidades del sexto aspecto, el compuesto di-adenina mono- o di-F ciclico se selecciona del grupo que consiste en:



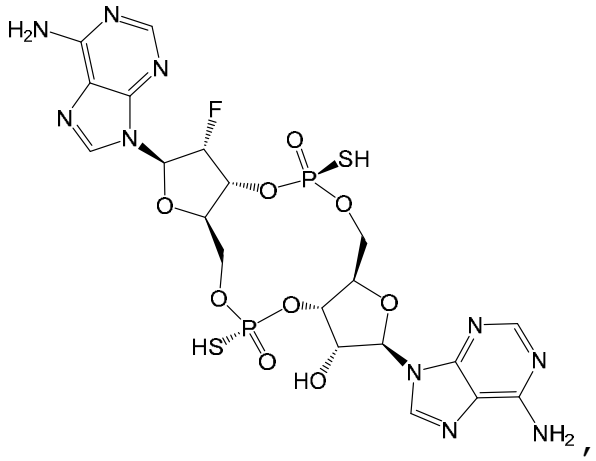
,



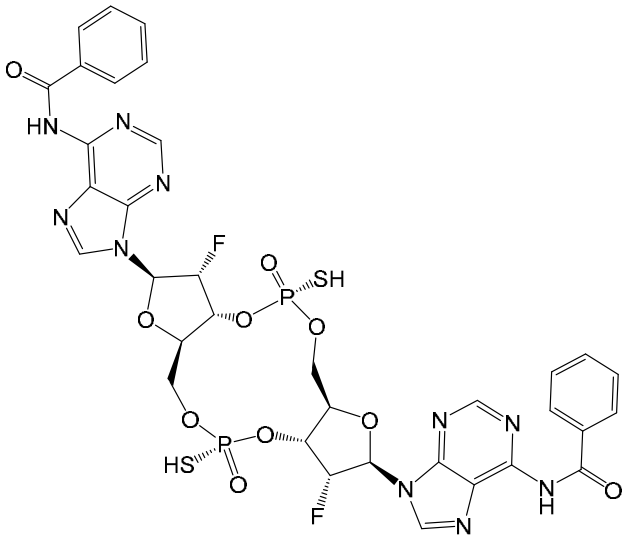
,



,



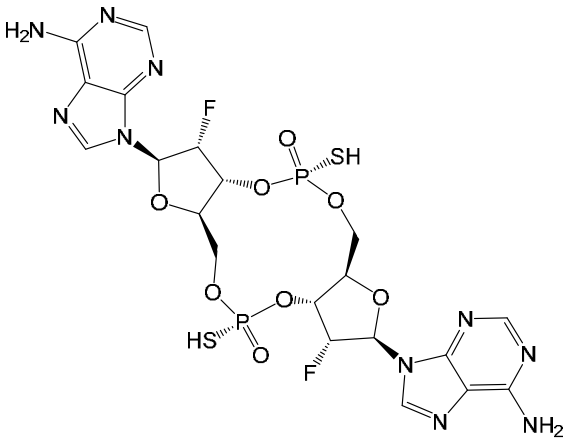
,



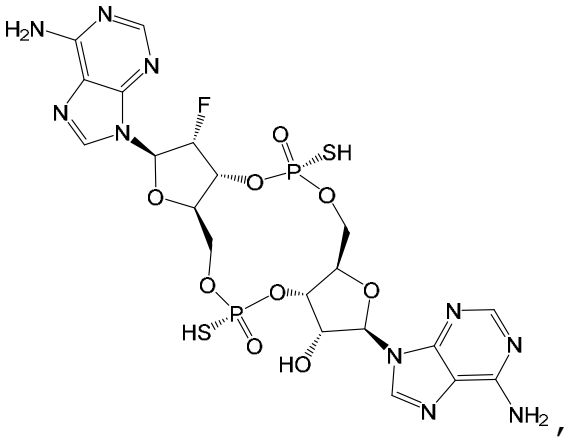
y ,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas modalidades del sexto aspecto, el compuesto di-adenina mono- o di-F ciclico de se selecciona del grupo que consiste en:



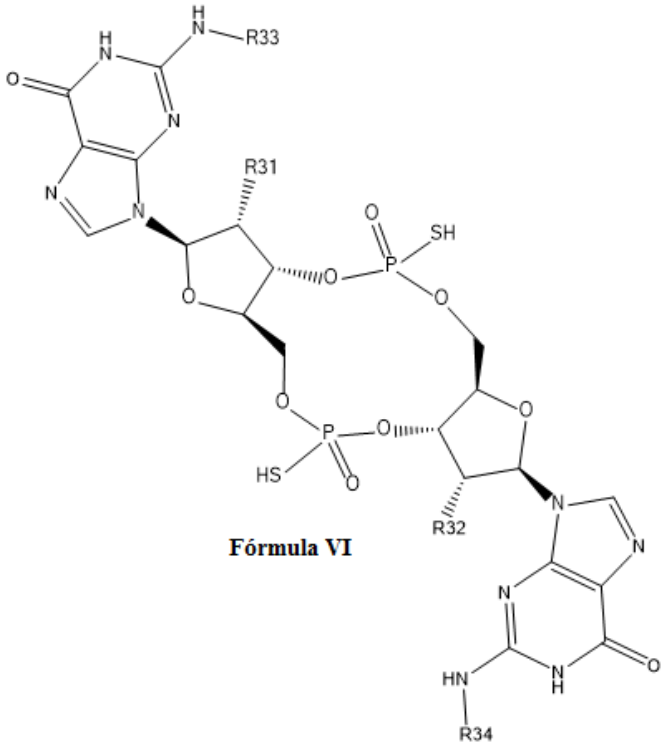
y



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un compuesto di-guanina mono- o di-F cíclico de la Formula VI:



Fórmula VI

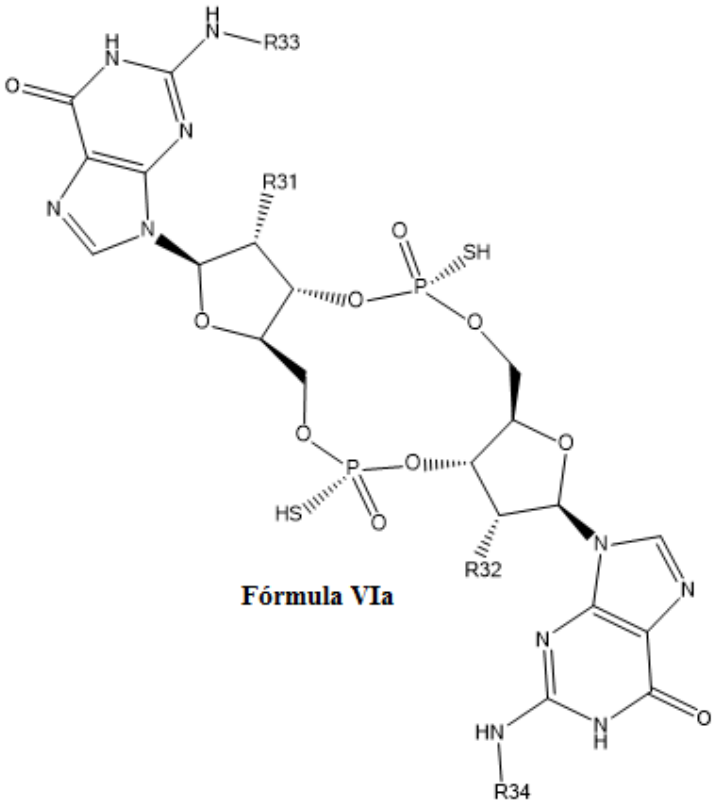
,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde:

R31 y R32 son, independientemente, OH o F, siempre que al menos uno de R31 y R32 sea F;

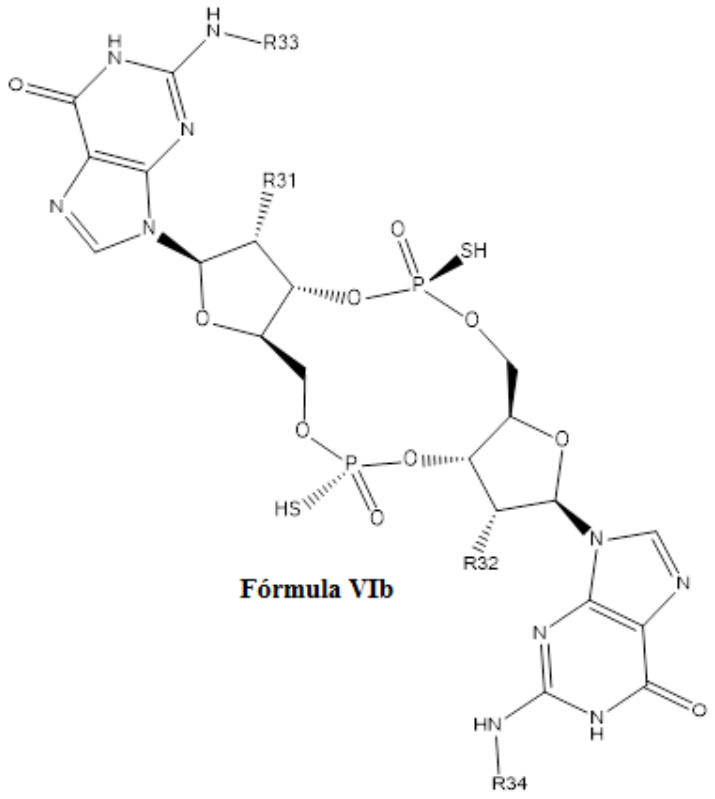
R33 y R34 son independientemente H o butirilo.

En una primera modalidad del séptimo aspecto, el compuesto de la Fórmula VI es un compuesto de la Fórmula VIa, o un compuesto de la Fórmula VIb:



Fórmula VIa

o



Fórmula VIb

, o

un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde R31, R32, R33 y R34 son como se definen para la Fórmula VI.

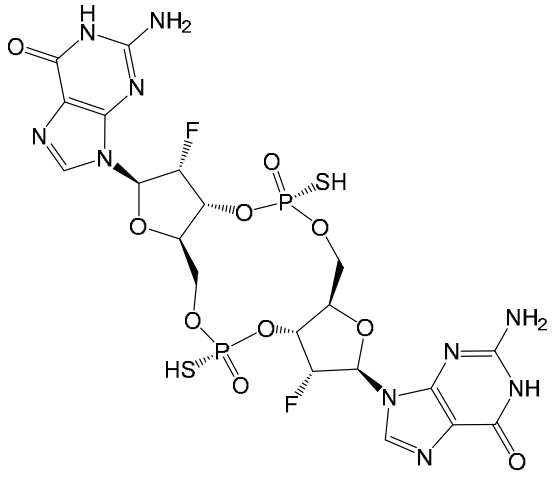
En una segunda modalidad del séptimo aspecto o primera modalidad de este, R33 y R34 son ambos H. En algunas modalidades, R33 y R34 son ambos butirilo. En algunas modalidades, uno de R33 y R34 es butirilo y el otro de R33 y R34 es H.

En algunas modalidades del séptimo aspecto, y la primera o segunda modalidad de este, R31 y R32 son ambos F. En algunas

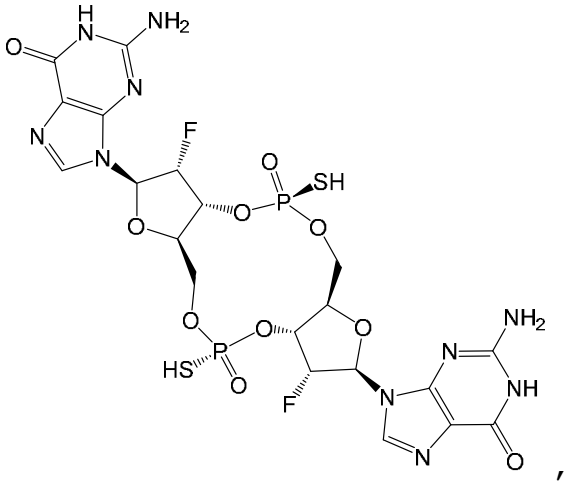
modalidades, uno de R31 y R32 es F y el otro de R31 y R32 es OH.

En algunas modalidades del sexto aspecto, R31 y R32 son ambos F, y R33 y R34 son ambos H. En algunas modalidades, el compuesto es un compuesto de la fórmula VIa, R31 y R32 son ambos F, y R33 y R34 son ambos H.

En algunas modalidades del séptimo aspecto, el compuesto di-guanina mono- o di-F ciclico se selecciona del grupo que consiste en:



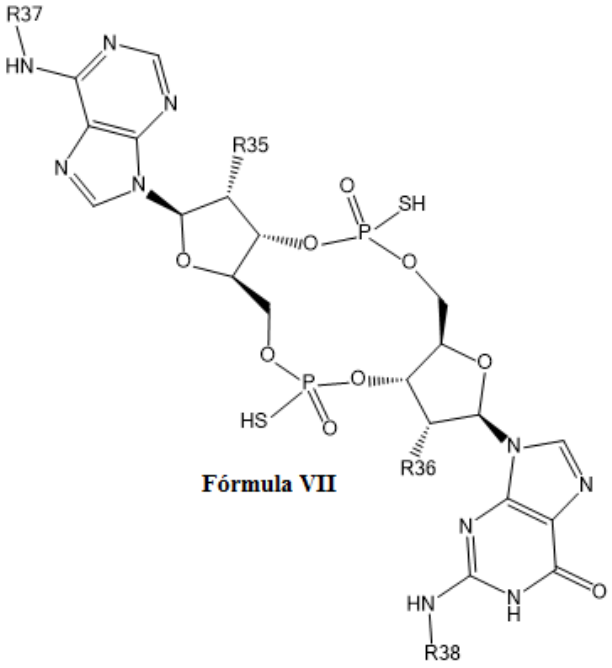
y



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un compuesto dinucleótido mono- o di-F cíclico de guanina y adenina de la Fórmula VII:



Fórmula VII

,

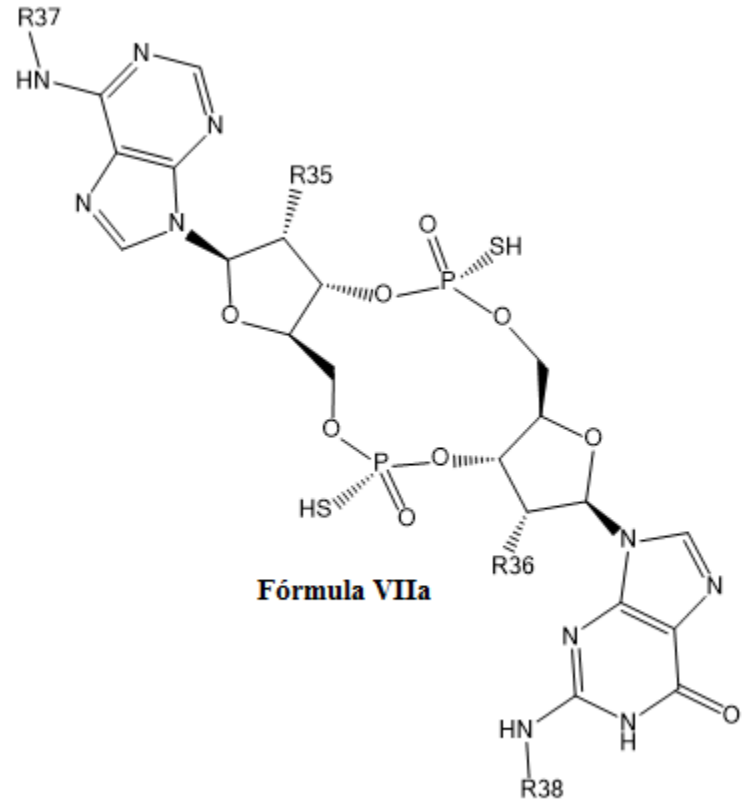
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

R35 y R36 son, independientemente, OH o F, siempre que al menos uno de R35 y R36 sea F;

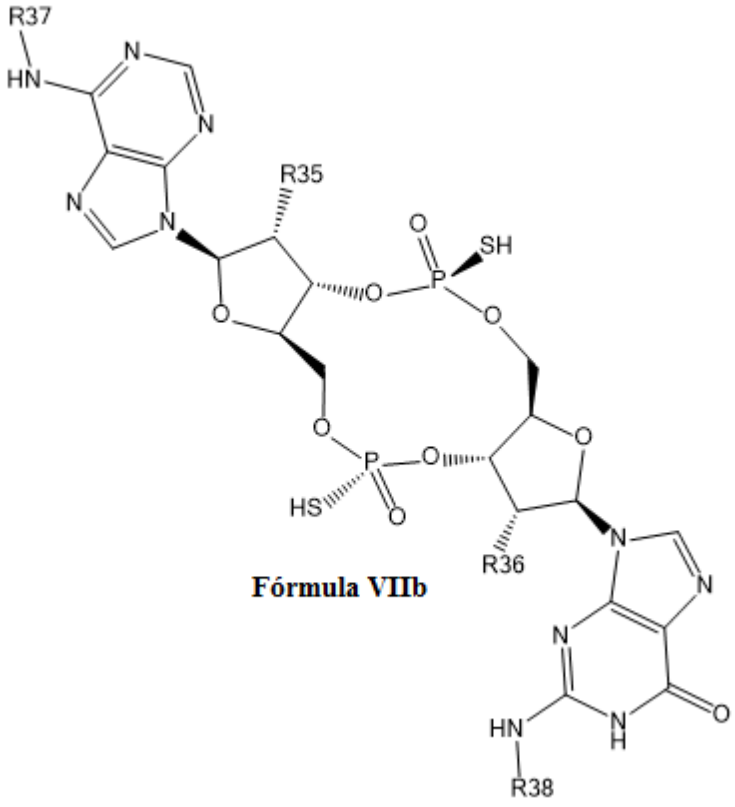
R37 es H o benzoílo; y

R38 es H o butirilo.

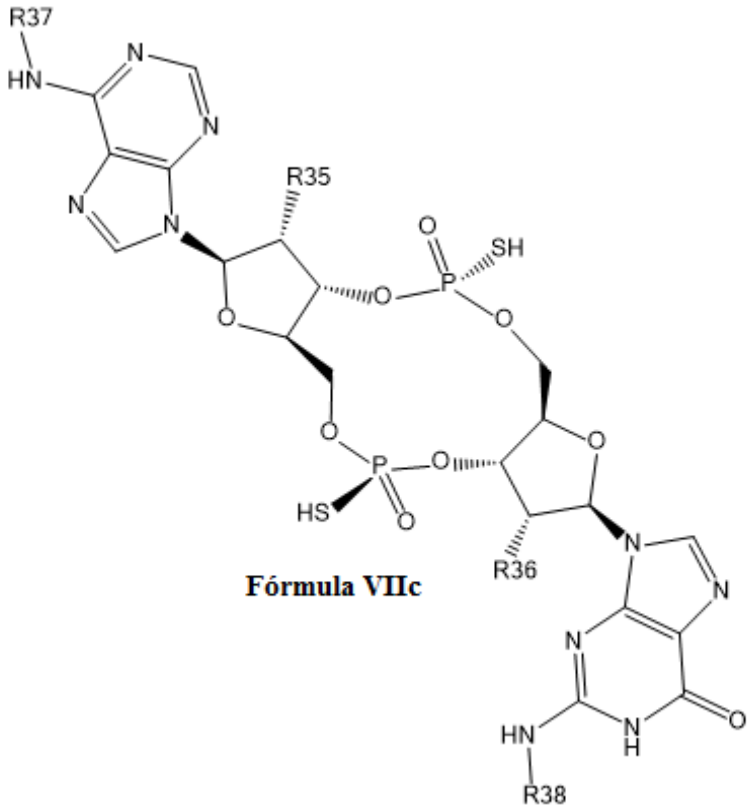
En una primera modalidad del octavo aspecto, el compuesto de la Fórmula VII es un compuesto de la Fórmula VIIa, un compuesto de la Fórmula VIIb o un compuesto de la Fórmula VIIc:



Fórmula VIIa



Fórmula VIIb



Fórmula VIIc

,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R35, R36, R37 y R38 son como se definen para la Fórmula VII.

En una segunda modalidad del octavo aspecto o primera modalidad de este, R37 y R38 son ambos H. En algunas modalidades, R37 es benzoílo y R38 es butirilo. En algunas modalidades, R37 es H y R38 es butirilo. En algunas modalidades, R37 es benzoílo y R38 es H.

En algunas modalidades del octavo aspecto, y la primera o segunda modalidad de este, R35 y R36 son ambos F. En algunas

modalidades, uno de R35 y R36 es F y el otro de R35 y R36 es OH. En algunas modalidades R35 y R36 son ambos F y el compuesto es un compuesto de la Formula VIIa.

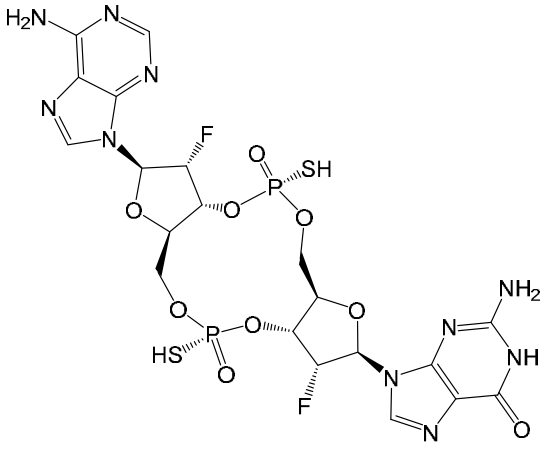
En algunas modalidades del octavo aspecto y primera modalidad de este, R35 y R36 son ambos F y R37 y R38 son ambos H. En algunas modalidades, R35 y R36 son ambos F, R37 es H y R38 es butirilo. En algunas modalidades, R35 y R36 son ambos F, R37 es benzoílo y R38 es H. En algunas modalidades, R35 y R36 son ambos F, R37 es benzoílo y R38 es butirilo. En algunas modalidades, R35 y R36 son ambos F, R37 y R38 son ambos H, y el compuesto es un compuesto de la fórmula VIIa.

En algunas modalidades del octavo aspecto y primera modalidad de este, R35 es F, R36 es OH y R37 y R38 son ambos H. En algunas modalidades, R35 es F, R36 es OH, R37 es H y R38 es butirilo. En algunas modalidades, R35 es F, R36 es OH, R37 es benzoílo y R38 es H. En algunas modalidades, R35 es F, R36 es OH, R37 es benzoílo y R38 es butirilo. En algunas modalidades, R35 es F, R36 es OH, R37 y R38 son ambos H, y el compuesto es un compuesto de la fórmula VIIa.

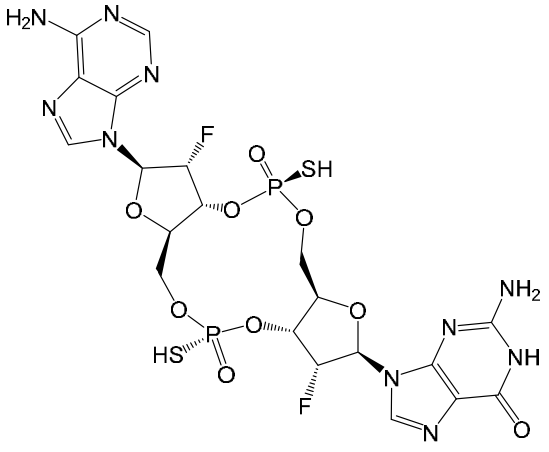
En algunas modalidades del octavo aspecto y primera modalidad de este, R35 es OH, R36 es F y R37 y R38 son ambos H. En algunas modalidades, R35 es OH, R36 es F, R37 es H y R38 es butirilo. En algunas modalidades, R35 es OH, R36 es F, R37 es benzoílo y R38 es H. En algunas modalidades, R35 es OH, R36 es F, R37 es

benzoílo y R38 es butirilo. En algunas modalidades, R35 es OH, R36 es F, R37 y R38 son ambos H, y el compuesto es un compuesto de la fórmula VIIa.

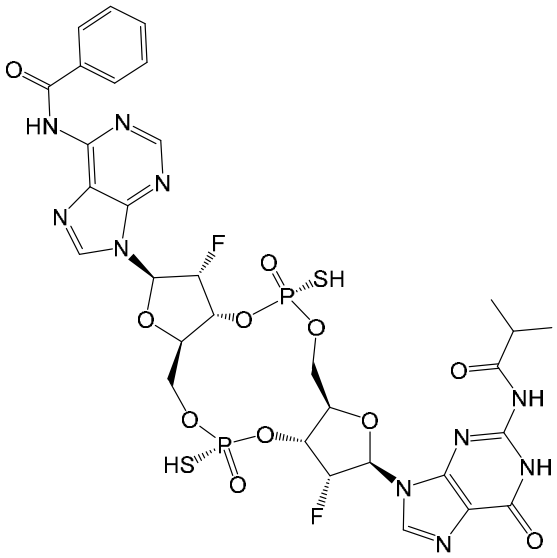
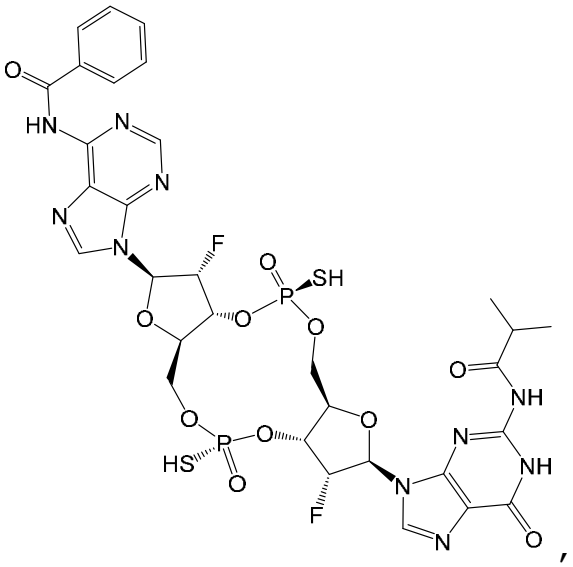
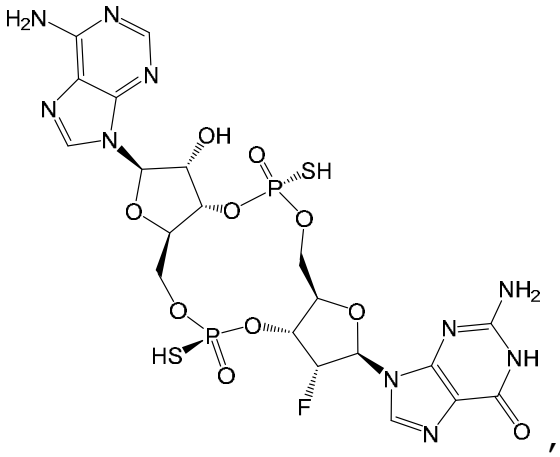
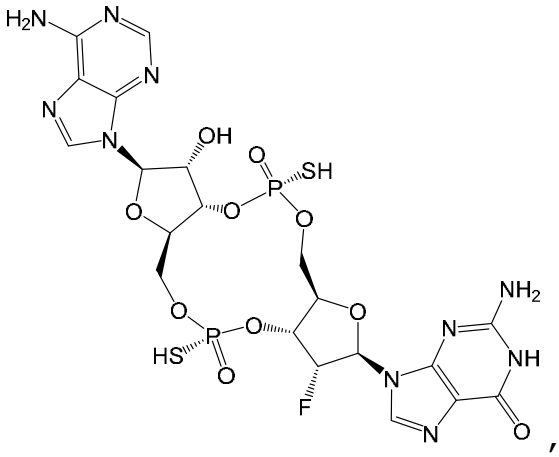
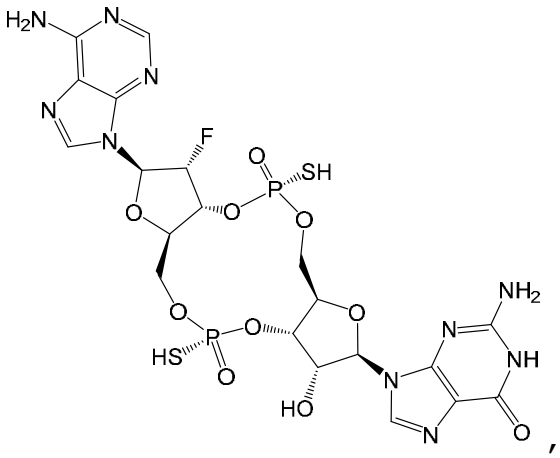
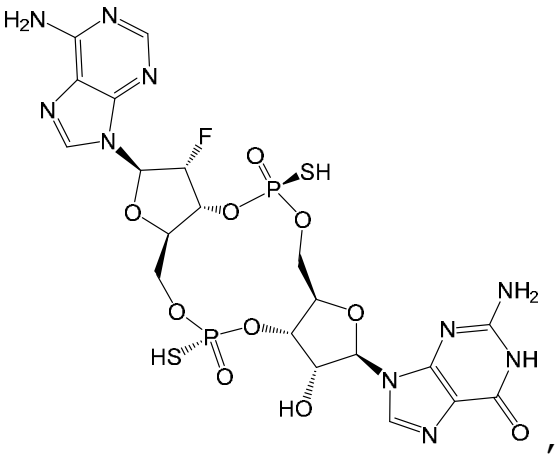
En algunas modalidades del octavo aspecto, el compuesto dinucleótido mono- o di-F cíclico de guanina y adenina se selecciona del grupo que consiste en:



,

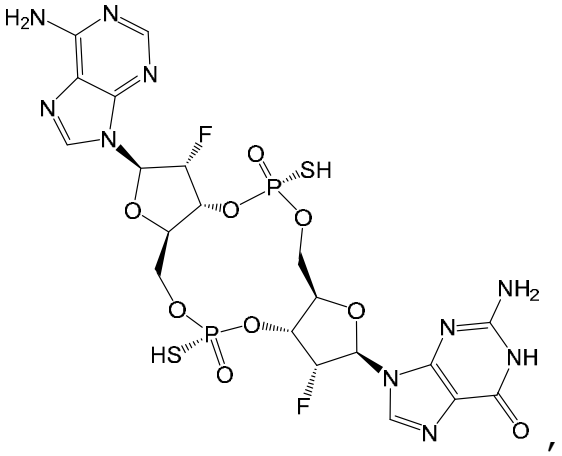


,

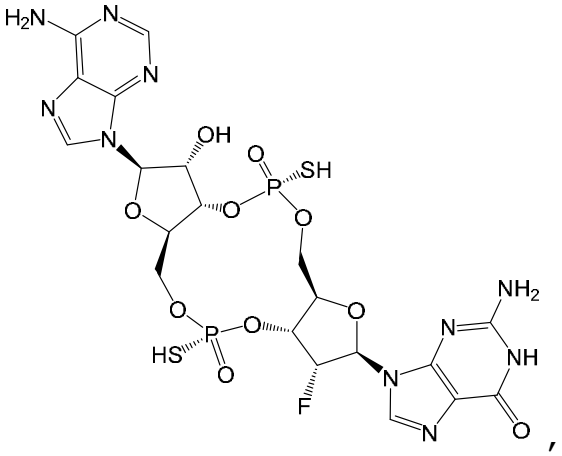

,

,

,

,

, y

,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

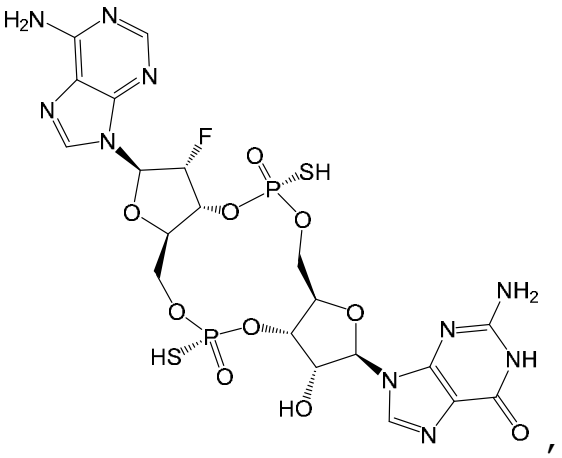
En algunas modalidades del octavo aspecto, el compuesto dinucleótido mono- o di-F cíclico de guanina y adenina se selecciona del grupo que consiste en:



,



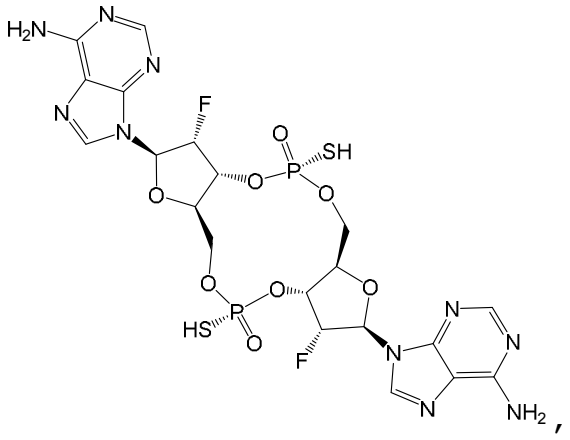
,



y ,

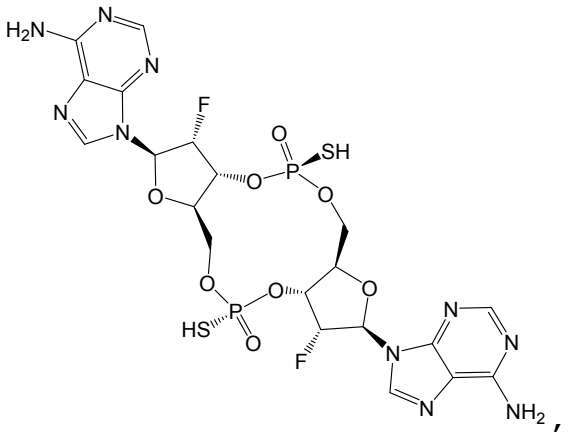
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un noveno aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A), que tiene la estructura:



o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

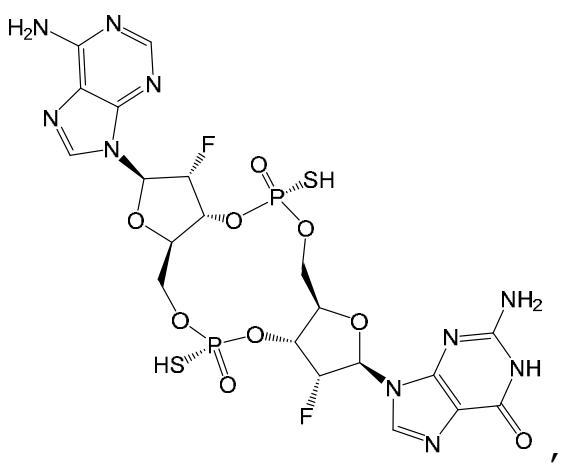
En un décimo aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RS-(2'F-A)(2'F-A), que tiene la estructura:



o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato

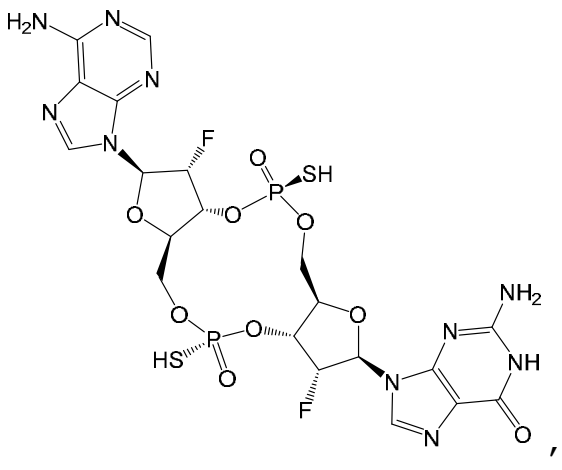
farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un undécimo aspecto, se proporciona un compuesto 3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-A), que tiene la estructura:



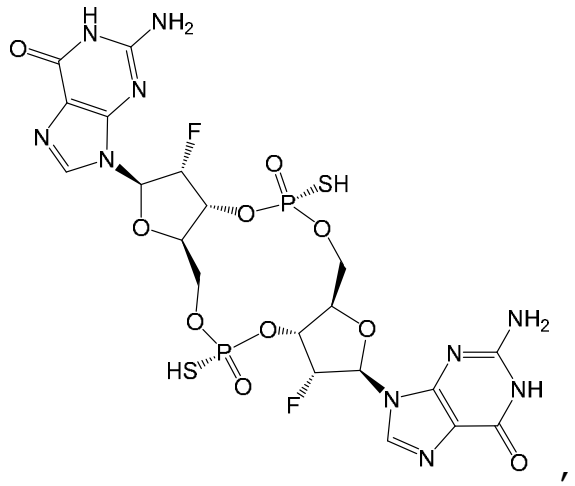
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un duodécimo aspecto, se proporciona un compuesto 3’3’-RS-(2’F-G)(2’F-A), que tiene la estructura:



o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

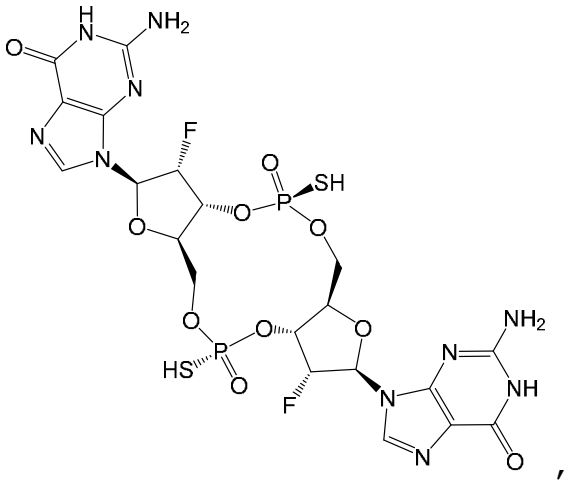
En un decimotercer aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-G), que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

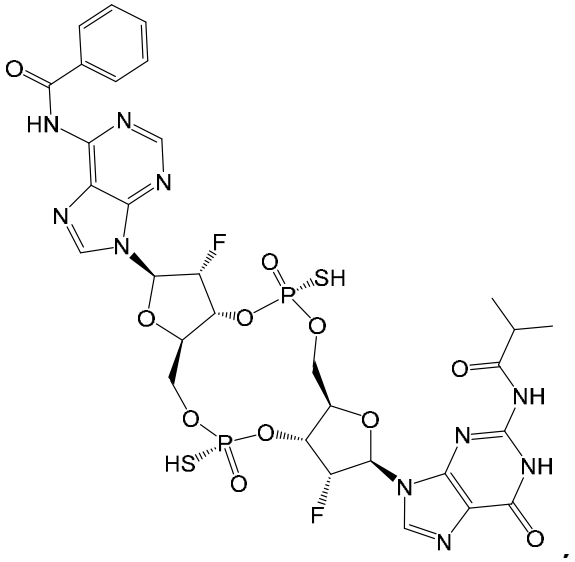
En un decimocuarto aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RS-(2'F-G)(2'F-G), que tiene la estructura:



,

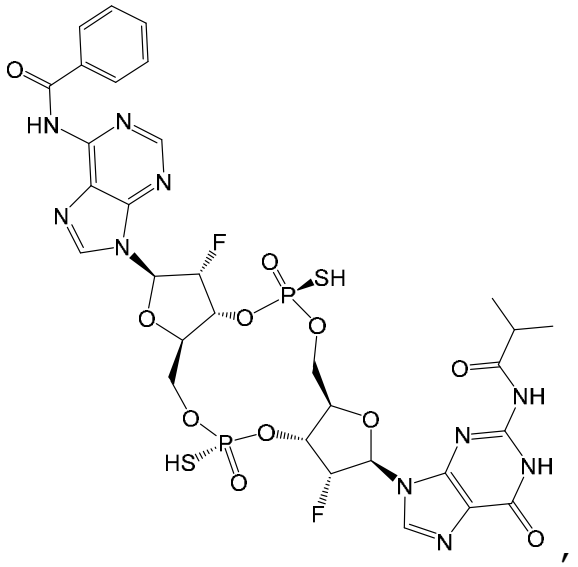
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un decimoquinto aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RR-(2'F-iBuG)(2'F-BzA), que tiene la estructura:



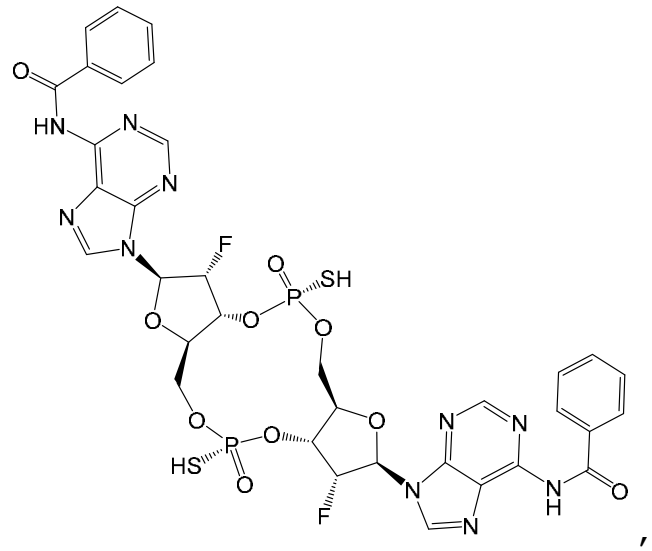
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un decimosexto aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RS-(2'F-iBuG)(2'F-BzA), que tiene la estructura:



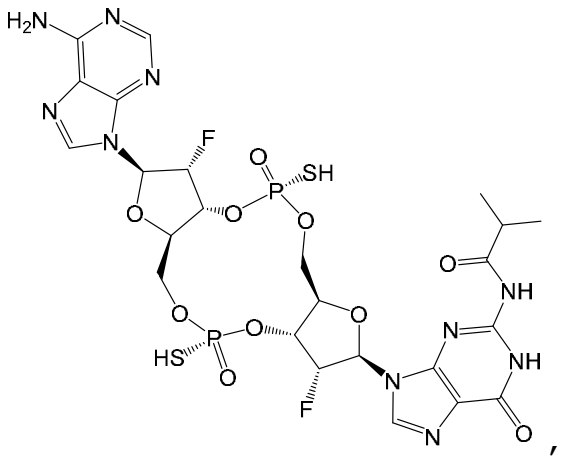
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un decimoséptimo aspecto, se proporciona un compuesto 3’3’-RR-(2’F-BzA)(2’F-BzA), que tiene la estructura:



o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

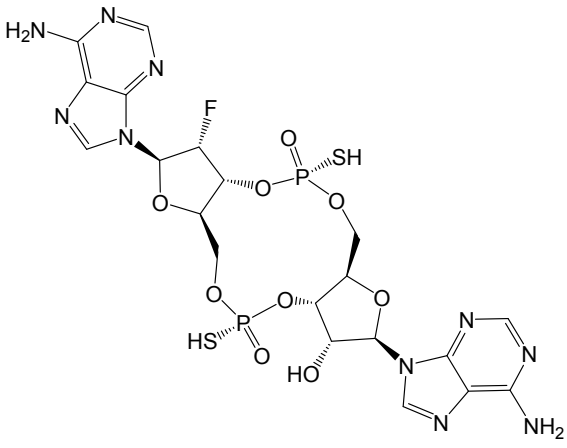
En un decimoctavo aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RR-(2'F-iBuG)(2'F-A), que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

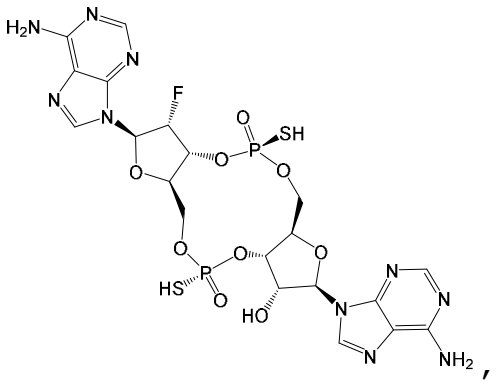
En un decimonoveno aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RR-(A)(2'F-A), que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

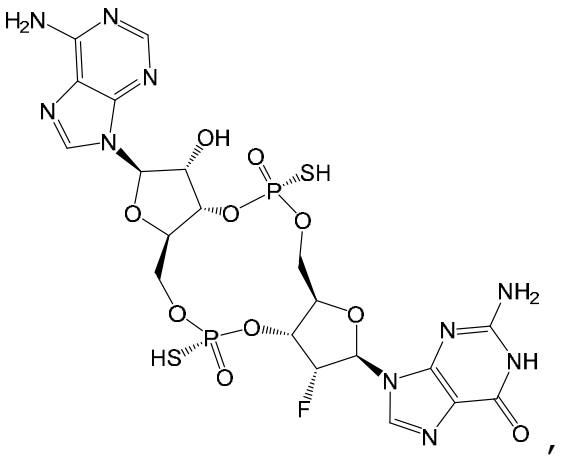
En un vigésimo aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RS-(A)(2'F-A), que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

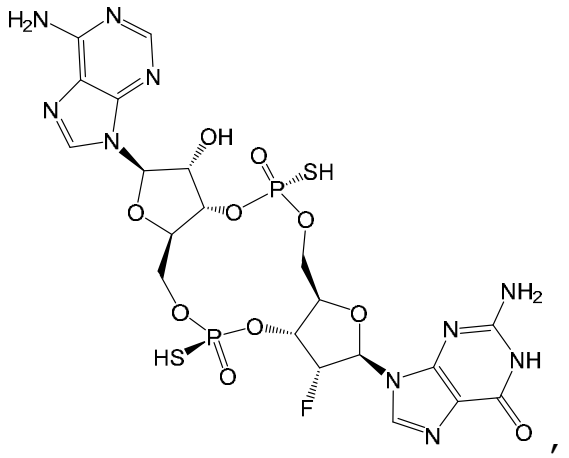
En un vigesimoprimer aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RR-(2'F-G)(A), que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

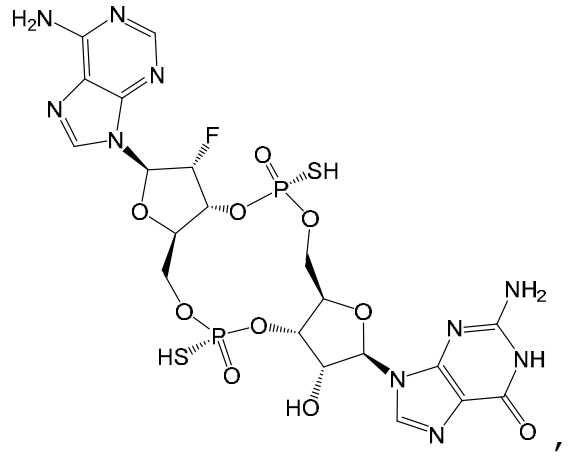
En un vigesimosegundo aspecto, se proporciona un compuesto 3’3’-SR-(2’F-G)(A), que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

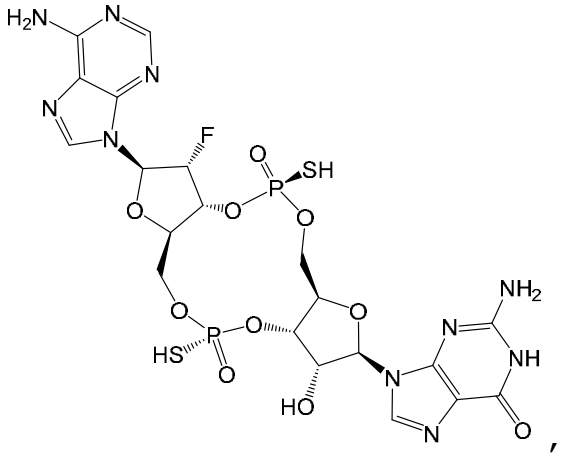
En un vigesimotercer aspecto, se proporciona un compuesto 3’3’-RR-(G)(2’F-A), que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

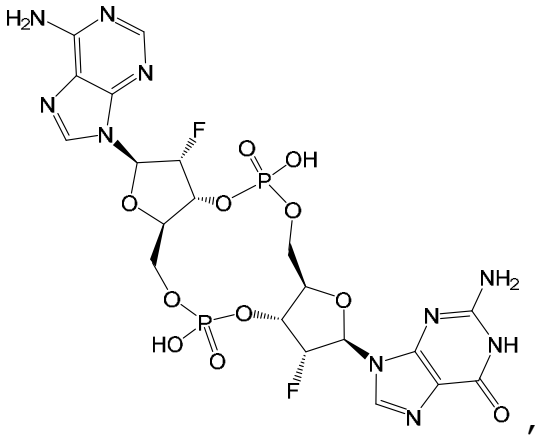
En un vigesimocuarto aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RS-(G)(2'F-A), que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

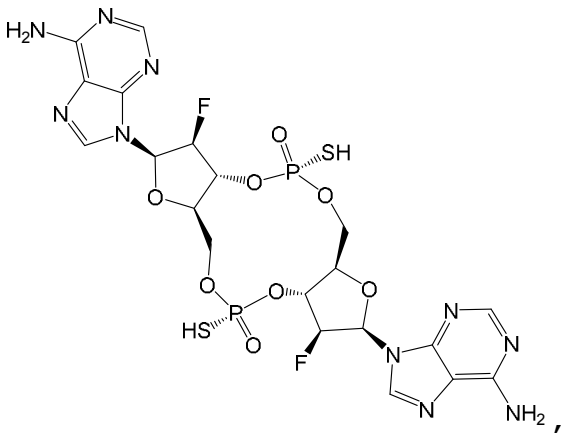
En un vigesimoquinto aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-(2'F-G)(2'F-A), que tiene la estructura:



,

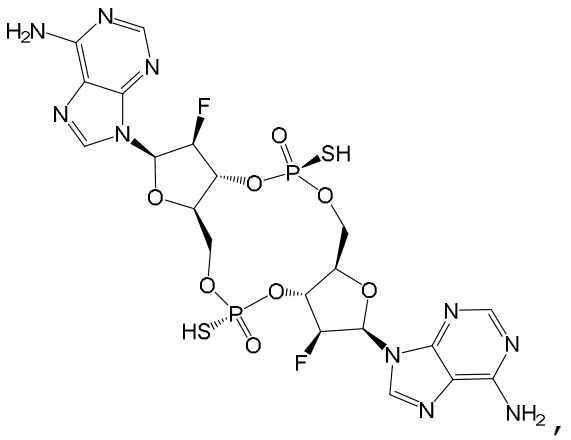
o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un vigesimosexto aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RR-(2'βF-A)(2'βF-A), que tiene la estructura:



o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En un vigesimoséptimo aspecto, se proporciona un compuesto 3'3'-RS-(2'βF-A)(2'βF-A), que tiene la estructura:



o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

En cualquiera de los compuestos mono- o di-F-CDN de cualquiera de los aspectos precedentes y modalidades de estos, la estructura es preferiblemente un tiofosfato en cada uno de los enlazadores de fosfato (por ejemplo, R5 y R6 de la Fórmula I son ambos SH), más preferiblemente donde la estereoquímica en cada fósforo es R, y el compuesto es sustancialmente puro.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes y modalidades de estos, los compuestos mono- o di-F-CDN incluyen profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables o hidratos farmacéuticamente aceptables de cualquier profármaco de estos, e incluyendo cualesquiera solvatos farmacéuticamente aceptables o hidratos farmacéuticamente aceptables de cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables de estos. En algunas modalidades, los compuestos mono- o di-F-CDN incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, hidratos farmacéuticamente aceptables o sales farmacéuticamente aceptables de estos. En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN es una sal

farmacéuticamente aceptable, o un solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN es una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes y modalidades de estos, los compuestos mono- o di-F-CDN incluyen sales farmacéuticamente aceptables de estos. En algunas modalidades, la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en las sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, aluminio, amonio, dietilamina, isopropilamina, olamina, benzatina, benetamina, trometamina (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol), morfolina, epolamina, piperidina, piperazina, picolina, diciclohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, 2-hidroxietilamina, tri-(2-hidroxietil)amina, cloroprocaína, colina, deanol, imidazol, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), procaína, dibencilpiperidina, dehidroabietilamina, glucamina, colidina, quinina, quinolona, erbumina, lisina y arginina.

En una modalidad de cualquiera de los aspectos precedentes o modalidades de estos, los compuestos mono- o di-F-CDN se proporcionan como la sal disódica de estos. En algunas modalidades, los compuestos mono- o di-F-CDN se proporcionan

como la sal disódica de estos, o un solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de estos.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes y modalidades de estos, el compuesto mono- o di-F-CDN es más activo en un ensayo celular que mide la inducción de la producción de IFN-β dependiente de STING humano en comparación con uno o más compuestos de referencia. En algunas modalidades, uno o más compuestos de referencia se seleccionan del grupo que consiste en 3'3 '- (G)(G) (es decir, [G(3 ', 5')p-G (3 ', 5')p] cíclico), 3'3 '-(A)(A) (es decir, [A(3 ', 5')p-A(3 ', 5') p] cíclico), 3'3 '-(G)(A) (es decir, [G(3 ', 5')p-A (3 ', 5')p] cíclico), 3'3'-RR-(A)(A) (es decir, ditio -(*R*p,*R*p) -[A(3',5') p-A (3 ', 5')p] cíclico), 3'3'-RR-(G)(G) (es decir, ditio-(*R*p,*R*p)-[G(3 ', 5') p-G (3 ', 5')p] cíclico), y 3'3'-RR-(G)(A) (es decir, ditio -(*R*p,*R*p)-[G (3 ', 5')p-A (3 ', 5') p] cíclico). En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN es un compuesto mono- o di-F-RR-CDN y uno o más compuestos de referencia se seleccionan del grupo que consiste en 3'3'-RR-(A)(A), 3'3'-RR-(G)(G) y 3'3'-RR-(G)(A). En algunas modalidades, el compuesto de referencia es el compuesto de referencia di-OH. En algunas modalidades, el ensayo celular es un ensayo hPBMC, por ejemplo, el ensayo como el que se describe en el Ejemplo 13. En algunas modalidades, el ensayo celular es un ensayo THP1, por ejemplo,

el ensayo como el que se describe en el Ejemplo 14. En una modalidad preferida, el ensayo celular se lleva a cabo sin la adición de un agente que potencia la absorción del compuesto mono- o di-F-CDN o compuesto de referencia mediante las células de ensayo o un agente que potencia la permeabilidad del compuesto mono- o di-F-CDN o compuesto de referencia a las células de ensayo. En algunas modalidades, el ensayo celular es un ensayo celular THP1 realizado sin la adición de un agente que potencia la absorción del compuesto mono- o di-F-CDN o compuesto de referencia mediante las células de ensayo o un agente que potencia la permeabilidad del compuesto mono- o di-F-CDN o compuesto de referencia a las células de ensayo, en el que el compuesto mono- o di-F-CDN tiene una EC50 inferior a 40 µM, inferior a 30 µM, inferior a 20 µM, inferior a 15 µM o inferior a 10 µM. En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN tiene una EC50 inferior a 40 µM, inferior a 30 µM, inferior a 20 µM, inferior a 15 µM o inferior a 10 µM en un ensayo celular que mide la inducción de la producción de IFN-β dependiente de STING humana, en donde el ensayo celular se lleva a cabo sin la adición de un agente que potencia la absorción del compuesto mono- o di-F-CDN mediante las células de ensayo o un agente que potencia la permeabilidad del compuesto mono- o di-F-CDN a las células de ensayo. En una modalidad, el ensayo celular es un ensayo celular THP1 como se

describe en el Ejemplo 14, en donde el ensayo se realiza sin adición de digitonina. En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN tiene una EC50 inferior a la EC50 de uno o más compuestos de referencia seleccionados del grupo que consta de 3'3-(G)(G) (es decir, [G(3 ', 5')p-G(3 ', 5')p] cíclico), 3'3 '-(A)(A) (es decir, [A(3 ', 5')p- A(3 ', 5')p cíclico]), 3'3 '- (G)(A) (es decir, [G(3 ', 5')p-A(3 ', 5') p] cíclico), 3'3'-RR-(A)(A) (es decir, ditio-*(R*p, *R*p) -[A(3 ', 5')p-A(3 ', 5')p] cíclico), 3'3'-RR-(G)(G) (es decir, ditio-*(R*p,*R* p) [G(3 ', 5')p-G(3 ', 5')p] cíclico), y 3'3'-RR-(G)(A) (es decir, ditio-*(R*p, *R*p) [G(3 ', 5')p-A(3 ', 5')p] cíclico) en un ensayo celular que mide la inducción de la producción de IFN-β dependiente de STING humana, preferiblemente donde el ensayo celular se lleva a cabo sin la adición de un agente que potencia la absorción del compuesto mono- o di-F-CDN o compuesto de referencia mediante las células de ensayo o un agente que mejora la permeabilidad del compuesto mono- o di-F-CDN o compuesto de referencia a las células de ensayo. En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN tiene un EC50 inferior a la EC50 de un compuesto de referencia di-OH en un ensayo celular THP1 como se describe en el Ejemplo 14, preferiblemente donde el ensayo se realiza sin la adición de digitonina. En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN tiene una EC50 que es al menos 2 veces, al menos 3

veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces o al menos 8 veces menor que la EC50 del compuesto de referencia di-OH en el ensayo celular THP1 como se describe en el Ejemplo 14, donde el ensayo se realiza sin adición de digitonina.

Como se describe más adelante, una composición de dinucleótido de purina cíclico de acuerdo con la presente invención, donde uno o más compuestos mono- o di-F-CDN presentes en la composición pueden inducir la producción de interferón tipo I dependiente de STING al menos 2 veces más, y más preferiblemente 5 veces o 10 veces más, o más, a concentraciones al menos 10 veces, 50 veces o 100 veces menores que uno o más de bis-3',5' c-di-GMP (es decir, 3'3 '- (G)(G)), bis-3', 5 'c-di-AMP (es decir, 3'3'-(A)(A) o CDA), o bis-3 ', 5' c-GMP-AMP (es decir, 3'3 '- (G)(A) o cGAMP) (que significa que carecen de la sustitución(es) 2'-F). Como se ha señalado en la presente, más preferiblemente, el STING es STING humano. En modalidades preferidas, una composición que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN según la presente invención activa STING humano, pero el correspondiente dinucleótido de purina bis-3', 5' cíclico (que tiene las mismas purinas y que carece de la sustitución(es) 2 '-F) no.

Como también se describe a continuación, es una composición que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN según la presente invención, donde uno o más compuestos mono- o di-F-CDN presentes

en la composición se unen a STING con una afinidad al menos 10 veces, 50 veces o 100 veces mayor que uno o más de bis-3 ', 5' c-di-GMP (es decir, 3'3 '-(G)(G)), bis-3', 5 ' c-di-AMP (es decir, 3'3 '-(A)(A) o CDA), o bis-3', 5 'c-GMP-AMP (es decir, 3'3' - (G)(A) o cGAMP) (que significa que carecen de sustitución(es) 2'-F). Como se ha señalado en la presente, más preferiblemente, el STING es STING humano. En modalidades preferidas, una composición de dinucleótido de purina cíclico según la presente invención se une a STING con una afinidad al menos 10 veces, 50 veces o 100 veces mayor que el dinucleótido de purina bis-(3 ', 5') cíclico correspondiente (que tiene las mismas purinas y que carece de sustitución(es) 2'-F).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes y modalidades de estos, los compuesto mono- o di-F-CDN se unen a al menos un producto de proteína alélica STING humana (incluyendo uno cualquiera de los alelos WT, REF, HAQ, AQ y Q) con una mayor afinidad que uno o más compuestos de referencia seleccionados del grupo que consiste en 3'3 '-(G)(G) (es decir, [G (3 ', 5')p-G(3 ', 5')p] cíclico), 3'3 '-(A)(A) (es decir, [A(3 ', 5')p-A(3 ', 5') p] cíclico), 3'3 '-(G)(A) (es decir, [G(3 ', 5')p-A(3 ', 5')p] cíclico), 3'3'-RR-(A)(A) (es decir, ditio-*(R*p,*R*p) [A(3 ', 5')p-A(3 ', 5')p] cíclico), 3'3'-RR-(G)(G) (es decir, ditio-*(R*p,*R*p) [G(3 ', 5')p-G(3 ', 5')p] cíclico) y 3'3'-RR-(G)(A) (es decir, ditio-*(R*p,*R*p) [G(3

', 5')p-A(3 ', 5')p] cíclico) cuando se mide utilizando al menos una proteína STING humana. En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes y modalidades de estos, el compuesto mono- o di-F-CDN se une a al menos un producto de proteína alélico de STING humana con una afinidad mayor que un compuesto de referencia di-OH. Preferiblemente, esto se mide usando la proteína aislada codificada por el alelo hSTING (WT), hSTING (HAQ) o hSTING (REF) *(Ishikawa, H., y Barber, G.N. (2008). Nature 455, 674-678;* Yi et ál., 2013, PLos One 21 oct 2013, 8 (10):e77846; la secuencia de la proteína del alelo REF es la Secuencia de Referencia NCBI NP_938023) utilizando un método tal como fluorometría de barrido diferencial (DSF), como se describe más adelante y en el Ejemplo 11.

En un vigesimoctavo aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, y un vehículo de administración que mejora la absorción y/o estabilidad del compuesto. En algunas modalidades, el vehículo de administración comprende uno o más agentes seleccionados del

grupo que consiste en adyuvantes, lípidos, liposomas, vesículas multilamelares reticuladas entre bicapa, nanopartículas o micropartículas biodegradables basadas en poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) [PLGA] o basadas en poli anhídrido, y bicapas lipídicas soportadas por partículas nanoporosas.

En un vigesimonoveno aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una primera modalidad del vigesimonoveno aspecto, la composición farmacéutica no incluye un agente que mejora la permeabilidad celular de uno o más compuestos mono- o di-F-CDN.

En una segunda modalidad del vigesimonoveno aspecto, la composición farmacéutica no incluye un agente que potencia la absorción celular de uno o más compuestos mono- o di-F-CDN.

En una tercera modalidad del vigesimonoveno aspecto, la composición farmacéutica comprende además un vehículo de administración que mejora la absorción y/o estabilidad celular

del compuesto. En algunas modalidades, el vehículo de administración comprende uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en adyuvantes, lípidos, liposomas, vesículas multilamelares reticuladas entre bicapas, nanopartículas o micropartículas biodegradables basadas en poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) [PLGA] o basadas en poli anhídrido, y bicapas lipídicas soportadas por partículas nanoporosas.

En algunas modalidades del vigesimoctavo aspecto y modalidades de este o vigesimonoveno aspecto y primera, segunda o tercera modalidad de este, la composición farmacéutica comprende además uno o más componentes farmacéuticamente activos adicionales seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de punto de control inmunológico (por ejemplo, CTLA-4, PD-1, Tim-3, Vista, BTLA, antagonistas de la vía LAG-3 y TIGIT; agentes que bloquean la vía PD-1; inhibidores de PD-L1; que incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos anti-PD-1 nivolumab, pembrolizumab o pidilizumab; inhibidor PD-1 de AMP-224; anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab; y anticuerpos anti-PD-L1 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, o avelumab); un agonista de TLR (por ejemplo, CpG o monofosforil lípido A); bacterias inactivadasa o atenuadasa que inducen la inmunidad innata (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* inactivada o atenuada); una composición que media la activación inmunitaria innata a través de receptores tipo Toll (TLR), a través de receptores tipo

(NOD)- como receptores (NLR), a través de receptores tipo (RIG)-I basados en genes inducibles de ácido retinoico (RLR), a través de receptores de lectina tipo C (CLR), o a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP); y un agente quimioterapéutico. En algunas modalidades, el inhibidor de punto de control inmunológico se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de la vía CTLA-4, un antagonista de la vía PD-1, un antagonista de la vía Tim-3, un antagonista de la vía Vista, un antagonista de la vía BTLA, un antagonista de la vía LAG-3, y un antagonista de la vía TIGIT. En algunas modalidades, el inhibidor de punto de control inmunológico es un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-TIM-3, un anticuerpo anti-BTLA o un anticuerpo anti-LAG-3. En algunas modalidades, el inhibidor de punto de control inmunológico se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, AMP-224, ipilimumab, BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, y avelumab. En algunas modalidades, el agonista de TLR es CpG o monofosforil lípido A.

En algunas modalidades del vigesimoctavo aspecto o vigesimonoveno aspecto y cualquiera de las modalidades precedentes de estos, la composición farmacéutica comprende además una célula tumoral inactivada que expresa y secreta una o más citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento

y/o la maduración de células dendríticas, o que se expresa y secreta una o más proteínas de choque térmico, incluyendo proteínas de fusión gp96-Ig. En algunas modalidades, una o más citocinas se seleccionan del grupo que consiste en el ligando GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70 y FLT-3. En algunas modalidades, la célula tumoral se inactiva mediante tratamiento con radiación. En algunas modalidades, una o más citocinas se seleccionan del grupo que consiste en el ligando GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70 y FLT-3, y la célula tumoral se inactiva mediante tratamiento con radiación. En algunas modalidades, la célula tumoral inactivada expresa y secreta una proteína de fusión gp96-Ig.

En algunas modalidades del vigesimoctavo aspecto o vigesimonoveno aspecto y cualquiera de las modalidades precentes de estos, la composición farmacéutica comprende además uno o más antígenos seleccionados a los efectos de inducir una respuesta inmunitaria frente a dicho(s) uno o más antígenos cuando la composición se administra a un individuo. En algunas modalidades, el antígeno es un antígeno de proteína recombinante. En algunas modalidades, el antígeno es un antígeno de proteína recombinante relacionado con una enfermedad infecciosa, una neoplasia maligna, o un alérgeno. En algunas modalidades, uno o más antígenos es uno o más antígenos de la Tabla 1.

En algunas modalidades del vigesimoctavo aspecto o vigesimonoveno aspecto y cualquiera de las modalidades precedentes de estos, las composiciones farmacéuticas se formulan como emulsiones acuosas o de aceite en agua.

En un trigésimo aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un individuo que padece un cáncer, en donde el método comprende la administración al individuo que lo necesita de una cantidad eficaz de uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos segundo a vigesimoséptimo y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualquiera de los profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estos como se describió en los aspectos vigesimoctavo y vigesimonoveno y cualesquiera de las modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente. En algunas modalidades, uno o más compuestos mono- o di-F-CDN o composición de estos se administran de manera parenteral o no parenteral. En algunas modalidades, la administración es subcutánea, intramuscular, intradérmica, mucosa, vaginal, cervical, peri-tumoral, intra-tumoral, o directamente dentro de los ganglios linfáticos que secretan hacia el tumor. En algunas modalidades, la administración es a través de la mucosa, preferiblemente oral.

En una primera modalidad del trigésimo aspecto, el individuo que recibe dicho tratamiento puede estar padeciendo un cáncer seleccionado del grupo que consta de un cáncer colorrectal, un cáncer escamoso aero-digestivo, un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer de hígado, una cáncer de estómago, un cáncer de vejiga, un cáncer de tiroides, un cáncer adrenal, un cáncer gastrointestinal, un cáncer de orofaringe, un cáncer de esófago, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de ovario, un cáncer de útero, un cáncer de cuello uterino, un cáncer endometrial, un cáncer de mama, un melanoma, un cáncer de próstata, un carcinoma pancreático, un carcinoma renal, un sarcoma, una leucemia, un linfoma y un mieloma múltiple.

En una segunda modalidad del trigésimo aspecto y de la primera modalidad de este, el método para el tratamiento de un individuo que padece un cáncer comprende además administrar una o más terapias adicionales contra el cáncer. En algunas modalidades, una o más terapias adicionales contra el cáncer comprenden la terapia de radiación, cirugía, quimioterapia, o una inmunoterapia (por ejemplo, de modo no taxativo, un inmunomodulador, un inhibidor de punto de control inmunológico, una inmunoterapia celular, o una vacuna contra el cáncer). En algunas modalidades, una o más terapias adicionales contra el cáncer comprenden una célula tumoral inactivada que expresa y secreta una o más citocinas o una o más proteínas de choque

térmico. En algunas modalidades, la citocina se selecciona del grupo que consiste en ligando GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70 y FLT-3. En algunas modalidades, la proteína de choque térmico es una proteína gp96-Ig. En algunas modalidades, el método comprende la administración de una o más terapias adicionales contra el cáncer seleccionadas del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico; un inhibidor de punto de control inmunológico; un agonista de TLR; una vacuna seleccionada para estimular una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos del cáncer, un anticuerpo terapéutico que induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; una línea celular inmunomoduladora; una bacteria inactivada o atenuada que induce la inmunidad innata; un antígeno seleccionado con el fin de inducir una respuesta inmunitaria, y una composición que media la activación inmunitaria innata a través de receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo (NOD) (NLRs), receptores tipo (RIG)-I basados en genes inducibles de ácido retinoico (RLR), receptores de lectina tipo C (CLR) o patrones moleculares asociados a patógenos ("PAMP"). En algunas modalidades, el inhibidor de punto de control inmunológico es un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-TIM-3, un anticuerpo anti-BTLA o un anticuerpo anti-LAG-3. En algunas modalidades, el agonista de TLR es CpG o monofosforil lípido A. En algunas modalidades, el

anticuerpo terapéutico que induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos es rituximab, ibritumomab, tositumomab, cetuximab, trastuzumab, brentuximab vedotina, alemtuzumab, oncolim, ibilimumab, vitaxina, o bevacizumab.

En algunas modalidades del trigésimo aspecto y la primera y segunda modalidades de este, el individuo padece un cáncer que expresa un antígeno de cáncer, y el método para el tratamiento de dicho individuo comprende además administrarle al individuo una terapia primaria para eliminar o matar las células cancerosas que expresan el antígeno canceroso, donde la administración de la terapia primaria se realiza simultáneamente con, antes o después de la administración del compuesto mono- o di-F-CDN o composición de este. En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN o la composición de este se administra como una terapia neoadyuvante a la terapia primaria. En modalidades preferidas, el compuesto mono- o di-F-CDN o la composición de este se administra luego de la terapia primaria. En algunas modalidades, la terapia primaria comprende la cirugía para eliminar las células cancerosas del mamífero, la radioterapia para destruir las células cancerosas del mamífero, o tanto cirugía como radioterapia.

En un trigesimoprimer aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad en un individuo, que comprende administrarle al individuo que lo necesite i) una

cantidad eficaz de uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estos como se describió en los aspectos vigesimoctavo y vigesimonoveno y cualquier modalidad de estos como se describió anteriormente en la presente; y ii) una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos terapéuticos que inducen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, rechazo agudo de un trasplante de órganos, diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, restenosis y asma alérgica. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma (por ejemplo, linfoma de células B), cáncer de mama, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, melanoma, carcinoma pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, cáncer de vejiga, cáncer de próstata y otros tumores sólidos. En algunas modalidades, el anticuerpo terapéutico se selecciona del grupo que consiste en muromonab-CD3, infliximab, daclizumab, omalizumab, abciximab, rituximab, ibritumomab, tositumomab, cetuximab, trastuzumab, brentuximab

vedotina, alemtuzumab, oncolim, ibilimumab, vitaxina, y bevacizumab.

En un trigesimotercer aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de trastornos en los que el desplazamiento de imnunidad Th1 a Th2 otorga un beneficio clínico, donde el método comprende la administración al individuo que lo necesita de uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describió en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualesquiera modalidades de estos,como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estos como se describió en los aspectos vigesimoctavo y vigesimonoveno y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente. La inmunidad mediada por células (CMI) está asociada con linfocitos T CD4 + TH1 que producen citocinas IL-2, interferón (IFN)-γ y factor de necrosis tumoral (TNF)-α. Por el contrario, la inmunidad humoral está asociada con linfocitos T CD4+ TH2 que producen IL-4, IL-6 e IL-10. La desviación inmunitaria hacia las respuestas TH1 comúnmente produce la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos y monocitos. En general, las respuestas Th1 son más eficaces contra los patógenos intracelulares (virus y bacterias

que estan dentro de las células hospedadoras) y tumores, mientras que las respuestas Th2 son más eficaces contra las bacterias extracelulares, parásitos incluyendo helmintos y toxinas. Además, se espera que la activación de la inmunidad innata normalice el equilibrio en el sistema inmunitario de T-colaboradores de tipo 1 y 2 (Th1/Th2) y suprima la reacción excesiva de las respuestas de tipo Th2 que causan alergias dependientes de inmunoglobulina (Ig) E y asma alérgica.

Los compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estos como se describió en el vigesimoctavo y vigesimonoveno aspectos y cualquier modalidad de estos como se describió anteriormente en la presente, se pueden administrar a individuos que lo necesiten, como se describe en los métodos del trigésimo al trigesimosegundo aspecto y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, mediante diversas vías parenterales y no parenterales en formulaciones que contienen excipientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, portadores, adyuvantes, vehículos y similares). Las vías no parenterales preferidas incluyen las vías mucosas (por ejemplo,

oral, vaginal, nasal, cervical, etc.). Las vías parenterales preferidas incluyen, de modo no taxativo, una o más de administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, intratecal y epidural. Preferiblemente, la administración es a través de vías subcutánea, intra-tumoral o peri-tumoral, más preferiblemente administración subcutánea.

Los compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estoscomo se describió en el vigesimoctavo y vigesimonoveno aspectos y cualesquiera modalidades de estos como se describe en la presente pueden administrarse conjuntamente a individuos que lo necesiten, como se describe en los métodos del trigésimo al trigesimosegundo aspecto y cualquier modalidad de estos como se describió anteriormente en la presente, con uno o más componentes farmacéuticamente activos adicionales, tales como adyuvantes, lípidos, vesículas multilamelares reticuladas entre bicapas, nanopartículas o micropartículas basadas en poli(ácido D, L-láctico-co-glicólico) [PLGA] o basadas en poli anhídrido, y bicapas lipídicas sostenidas por partículas nanoporosas,

inhibidores de punto de control inmunológico (por ejemplo, antagonistas de la vía CTLA-4, PD-1, Tim-3, Vista, BTLA, TIGIT LAG-3 y; agentes que bloquean la vía PD-1; inhibidores de PD-L1; incluyendo, de modo no taxativo, anticuerpos anti-PD-1 nivolumab, pembrolizumab o pidilizumab; inhibidor de PD-1 AMP-224; anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab; y anticuerpos anti-PD-L1 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, o avelumab), bacterias inactivadas o atenuadas que inducen inmunidad innata (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* inactivada o atenuada), composiciones que median la activación inmunitaria innata a través de receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo (NOD) (NLRs), receptores tipo (RIG)-I basados en genes inducibles de ácido retinoico (RLR), receptores de lectina tipo C (CLR), o patrones moleculares asociados a patógenos ("PAMP") o agentes quimioterapéuticos.

En un trigesimotercer aspecto, la invención proporciona uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualquier modalidad de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estoscomo se describe en el vigesimoctavo y vigesimonoveno aspectos y cualesquiera modalidades de estos como se describió

anteriormente en la presente, para su uso como adyuvantes junto con una vacuna terapéutica o profiláctica. En algunas modalidades, se selecciona la vacuna para estimular una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos predeterminados. En algunas modalidades, la vacuna comprende uno o más antígenos que incluyen un antígeno de proteína recombinante relacionado con una enfermedad infecciosa, una neoplasia maligna o un alérgeno. En algunas modalidades, uno o más compuestos mono- o di-F-CDN o composición de estos se utiliza simultáneamente con, antes o después de la vacuna. En algunas modalidades, uno o más compuestos mono- o di-F-CDN o composiciones de estosse formulan en la misma composición que la vacuna.

En una primera modalidad del trigesimotercer aspecto, la vacuna comprende una bacteria inactivada o atenuada o virus que comprende uno o más antígenos de interés, uno o más antígenos purificados, vectores de administración virales o bacterianos vivos modificados recombinantemente para expresar y/o secretar uno o más antígenos, vectores de célula que presentan antígenon (APC) que comprenden células que se cargan con uno o más antígenos o se transfectan con una composición que comprende un ácido nucleico que codifica uno o más antígenos, vehículos de administración de antígeno liposómicos, o vectores de ácidos nucleicos no unidos que codifican uno o más antígenos. En algunas modalidades, la vacuna es una vacuna anti-bacteriana,

anti-viral, o anti-cáncerosa terapéutica o profiláctica. En algunas modalidades, uno o más antígenos son uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en un antígeno viral, un antígeno bacteriano y un antígeno de cáncer.

En algunas modalidades del trigesimotercer aspecto y la primera modalidad de este, la vacuna comprende una célula tumoral inactivada que expresa y secreta una o más citocinas. En algunas modalidades, la citocina se selecciona del grupo que consiste en el ligando GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70 y FLT-3.

En algunas modalidades del trigesimotercer aspecto y la primera modalidad de este, la vacuna comprende una célula tumoral inactivada que expresa y secreta una o más proteinas de choque térmico. En algunas modalidades, la proteína de choque térmico es la proteína de fusión gp96-Ig.

En un trigesimocuarto aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un individuo que padece una enfermedad infecciona crónica, donde el método comprende la administración al individuo que lo necesita de una cantidad eficaz de uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estos como se describió

en los aspectos vigesimoctavo y vigesimonoveno y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente. En algunas modalidades, uno o más compuestos mono- o di-F-CDN o composición de estos se administran junto con otro agente para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa crónica. En algunas modalidades, la enfermedad infecciosa crónica se selecciona del grupo que consiste en la infección por VHB, la infección por VHC, la infección por VPH, la infección por HSV y cáncer hepatocelular.

En un trigesimoquinto aspecto, la invención proporciona uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualquier modalidad de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estoscomo se describió en el vigesimoctavo y vigesimonoveno aspecto y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o indicación como se describe en cualquiera de los aspectos del trigésimo al trigesimocuarto y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente. En una modalidad preferida, uno o más compuestos mono- o di-F-CDN son para uso en el tratamiento de un cáncer.

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer colorrectal, un cáncer escamoso aero-digestivo, un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer de hígado, una cáncer de estómago, un cáncer de vejiga, un cáncer de tiroides, un cáncer adrenal, un cáncer gastrointestinal, un cáncer de orofaringe, un cáncer de esófago, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de ovario, un cáncer de útero, un cáncer de cuello uterino, un cáncer endometrial, un cáncer de mama, un melanoma, un cáncer de próstata, un carcinoma pancreático, un carcinoma renal, un sarcoma, una leucemia, un linfoma y un mieloma múltiple.

En un trigesimosexto aspecto, la invención proporciona uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualquier modalidad de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estoscomo se describe en el vigesimoctavo y vigesimonoveno aspectos y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o indicación como se describe en cualquiera de los aspectos del trigésimo al trigesimocuarto y cualesquiera modalidades de

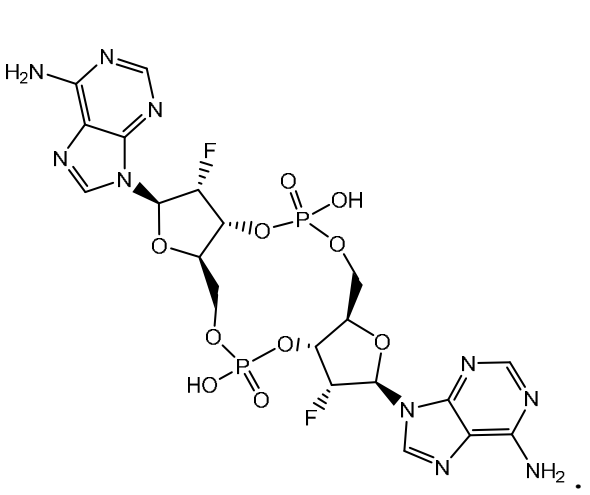
estos como se describió anteriormente en la presente. En una modalidad preferida, uno o más compuestos mono- o di-F-CDN son para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer colorrectal, un cáncer escamoso aero-digestivo, un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer de hígado, una cáncer de estómago, un cáncer de vejiga, un cáncer de tiroides, un cáncer adrenal, un cáncer gastrointestinal, un cáncer de orofaringe, un cáncer de esófago, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de ovario, un cáncer de útero, un cáncer de cuello uterino, un cáncer endometrial, un cáncer de mama, un melanoma, un cáncer de próstata, un carcinoma pancreático, un carcinoma renal, un sarcoma, una leucemia, un linfoma y un mieloma múltiple.

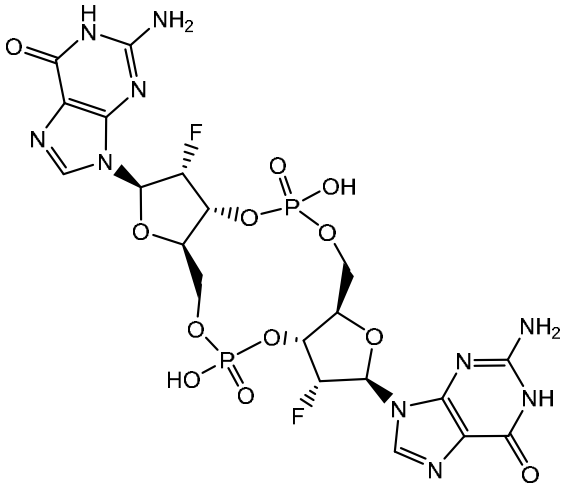
En un trigesimoséptimo aspecto, la invención proporciona un kit que incluye uno o más compuestos mono- o di-F-CDN, como se describe en los aspectos del segundo al vigesimoséptimo y cualquier modalidad de estos como se describió anteriormente en la presente, incluyendo cualesquiera profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, o hidratos farmacéuticamente aceptables de estos, o composiciones de estos como se describe en el vigesimoctavo y vigesimonoveno aspectos y cualesquiera modalidades de estos como se describió anteriormente en la presente. En algunas

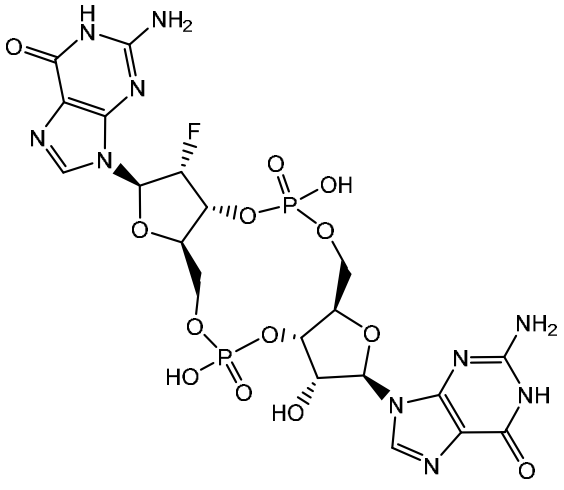
modalidades, uno o más compuestos mono- o di-F-CDN o composiciones de estos se envasan, por ejemplo, en un vial, botella o recipiente similar, que se puede empacar adicionalmente, por ejemplo, dentro de una caja, sobre, o recipiente similar. En algunas modalidades, uno o más compuestos mono- o di-F-CDN o composiciones de estos han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos o una agencia reguladora similar para la administración a un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En una modalidad, dicho kit incluye instrucciones escritas para el uso y/u otra indicación de que uno o más compuestos mono- o di-F-CDN o composiciones de estos son adecuados o aprobados para la administración a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, para una enfermedad o afección adecuada. En algunas modalidades, el compuesto o composición se empaqueta en forma de dosis unitaria o dosis única, por ejemplo, cápsulas, pastillas de dosis única, , o similares.

En algunas modalidades de las composiciones farmacéuticas del vigesimoctavo y vigesimonoveno aspecto y cualquier modalidad de estos como se describió anteriormente en la presente, y de los métodos para el tratamiento de enfermedades o indicaciones como se describe en cualquier aspecto del trigésimo al trigesimocuarto y cualquier modalidad de estos como se describió anteriormente, y los compuestos para su uso en el

tratamiento de enfermedades como se describe en el trigesimoquinto aspecto, o para su uso en la preparación de un medicamento como se describe en el trigesimosexto aspecto, como se describió anteriormente en la presente, el compuesto es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:







y

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1A-B representa los datos analíticos del NMR (1A) y LC (1B) para 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) (ditio-(*R*p, *R*p)- [2F-G(3', 5') p-2F-A(3',5')p] cíclico).

La Figura 2 representa la unión de mono- o di-F CDN a la proteína STING REF humana.

La Figura 3 representa la unión de mono- o di-F CDN a la proteína STING WT humana.

La Figura 4 representa la secuencia de proteínas de hSTING (REF).

La Figura 5A-B representa el aumento en la inducción del reportero de luciferasa IFNβ mediante hSTING(WT) en células HEK293T en un rango de dosis (5A) y a 6.25 µM CDN (5B).

La Figura 6A-B representa el aumento en la inducción del reportero de luciferasa IFNβ mediante hSTING (REF) en células HEK293T en un rango de dosis (6A) y a 6.25 µM CDN (6B).

La Figura 7A-B representa la expresión de IFNß relativa mediante hPBMC $STING^{WT/WT}$ en un rango de dosis (7A) y a 6.25 µM CDN (7B).

La Figura 8A-B representa la expresión de IFNß relativa mediante hPBMC $STING^{REF/REF}$ en un rango de dosis (8A) y a 6.25 µM CDN (8B).

La Figura 9A-B representa la expresión normalizada de IFNß en hPBMC con hSTING (WT) (9A) o REF hSTING (REF) (9B) tratadas con CDN.

La Figura 10A-B representa la expresión normalizada de TNFα en hPBMC con hSTING (WT) (10A) o REF hSTING (REF) (10B) tratadas con CDN.

La Figura 11A-B muestra la expresión normalizada de IL-6 en hPBMC con hSTING (WT) (11A) o REF hSTING (REF) (11B) tratadas con CDN.

La Figura 12A-B muestra la expresión normalizada de IFNγ en hPBMC con hSTING (WT) (12A) o REF hSTING (REF) (12B) tratadas con CDN.

La Figura 13A-B muestra la expresión normalizada de IL-12p40 en hPBMC con hSTING (WT) (13A) o REF hSTING (REF) (13B) tratadas con CDN.

La Figura 14A-B representa el volumen del tumor (14A) y el porcentaje de linfocitos T $CD8^+$ SIY^+ (14B) en un modelo de melanoma de ratón B16-SIY, después de la inyección intra-tumoral de CDN.

La Figura 15A-B representa el volumen del tumor en un modelo de ratón de melanoma B16 (15A) o de carcinoma de colon MC38 (15B), después de la inyección intra-tumoral de CDN.

La Figura 16A-B representa la respuesta de linfocitos T $CD4^+$ (15A) o la respuesta de linfocitos T $CD8^+$ (15B) específica al antígeno HIVgag p55 en los ratones a los que se les inyectó la proteína CDN y HIVgag p55.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la producción y el uso de estimuladores inmunitarios de di-nucleótidos cíclicos mono- o di-fluoro bis-3',5' sustituidos (mono- o di-F-CDN) que activan las DC a través de un receptor citoplasmático conocido como STING (Estimulador de Genes de Interferón). En particular, los CDN de la presente invención se proporcionan en forma de una composición que comprende uno o más mono- o di-F-CDN y, más preferiblemente, uno o más ditio Rp,Rp di-F-CDN.

Las estructuras microbianas conservadas conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP) son detectadas por los Receptores de Reconocimiento de Patrones de células hospedadoras (PRR con especificidad de línea germinal codificada), desencadenando una cascada de señalización corriente abajo que genera la inducción de citocinas y quimiocinas, y el inicio de una respuesta inmunitaria adaptativa específica (Iwasaki y Medzhitov, Science 327, 291-5, 2010). Cómo el sistema inmunitario innato se une a PAMP que se presentan a partir de un agente infeccioso da forma al desarrollo de una respuesta adaptativa adecuada para evitar que el patógeno invasor provoque una enfermedad.

Un objetivo en el diseño de moduladores y adyuvantes inmunitarios es seleccionar PAMP definidos o moléculas

sintéticas que activen PRR designados e inicien una respuesta deseada. Los adyuvantes tales como monofosforil lípido A (MPL) y CpG son PAMP derivados de microbios reconocidos por los receptores tipo Toll (TLR), una clase de PRR que presentan señalización a través de moléculas adaptadoras MyD88 y TRIF y median la inducción de citocinas proinflamatorias dependientes de NF-kB (Pandey et ál., Cold Spring Harb Perspect Biol 2015; 7: a016246). MPL (agonista de TLR-4) y CpG (agonista de TLR-9) son los adyuvantes más avanzados clínicamente, y son componentes de las vacunas que están aprobadas o pendientes de aprobación por la FDA (Einstein et ál., Human Vaccines, 5: 705-19, 2009; Ahmed et ál., Nature Immunol. 12: 509-17, 2011). Mientras que los TLR presentes en la superficie celular (por ejemplo, TLR-4) y endosomas (por ejemplo, TLR-9) detectan patógenos extracelulares y vacuolares, el ciclo de crecimiento productivo de múltiples patógenos incluyendo virus y bacterias intracelulares se produce en el citosol. La compartimentación de PRR extracelulares, vacuolares y citosólicos ha llevado a la hipótesis de que el sistema inmunitario innato puede detectar microbios patógenos que se replican de forma productiva mediante la supervisión del citosol (Vance et ál., Cell Host & Microbe 6: 10-21, 2009). Esto proporciona un fundamento para el uso de los agonistas que activan PRR que comprenden la vía de vigilancia citosólica y puede ser una

estrategia eficaz para el diseño de vacunas eficaces para provocar la inmunidad celular, un correlato inmunitario de protección contra patógenos intracelulares y el beneficio terapéutico en el cáncer.

Los interferones tipo I (IFN-α, IFN-β) son las citocinas trazables inducidas por las dos vías distintas de señalización citosólica independiente de TLR. En la primera vía, las diversas formas de ARN de cadena simple y de cadena doble (ds) son detectadas por ARN helicasas, incluyendo el gen inducible de ácido retinoico I (RIG-I) y el gen asociado a diferenciación de melanoma 5 (MDA-5), y a través de la proteína adaptadora del estimulador promotor de IFN-β 1 (IPS-1) median la fosforilación del factor de transcripción IRF-3, lo que lleva a la inducción de IFN-β (Ireton y Gale, Viruses 3: 906-19, 2011). Los ratones con deficiencia de IPS-$1^{-/-}$ tienen una mayor susceptibilidad a la infección por los virus de ARN. Los sensores que presentan señalización a través de la vía de IPS-1 se dirigen directamente a la inactivación mediante varias proteínas virales, lo que demuestra un requisito de esta vía de defensa citosólica hospedadora para controlar la infección por virus productivo. Los dsARN sintéticos, tales como ácido poliinosínico: policitidílico (poli (I:C) y poli ICLC, un análogo que se formula con poli L lisina para resistir la digestión de RNasa, es un agonista para las vías MDA5 y TLR3,

es un potente inductor de IFN-β, y está siendo evaluado en varios entornos clínicos diversos (Caskey et ál., J. Exp. Med. 208: 2357-77, 2011).

El STING (Estimulador de genes de interferón) es un mediador central de la segunda vía citosólica que desencadena interferón tipo 1, en respuesta a la detección de ADN citosólico de cadena doble (ds) a partir de patógenos infecciosos o células hospedadoras aberrantes (Patrones Moleculares Asociadas al Peligro, DAMP) (Barber, Immunol. Rev 243: 99-108, 2011). Conocido de forma alternativa como TMEM173, MITA, ERIS, y MPYS, STING fue descubierto mediante métodos de clonación de expresión de ADNc como un factor de defensa de la célula hospedadora independiente de MyD88 expresada en macrófagos, se descubrió que las células dendríticas (DC) y los fibroblastos inducen la expresión de citocinas pro-inflamatorias dependientes de IFN-β y NF-kB en respuesta a la detección de ADN citoplásmico, en respuesta a la infección por el virus del herpes simple (Ishikawa y Barber, Nature 455: 674-79, 2008).

Los dinucleótidos cíclicos (CDN) se han estudiado como segundos mensajeros ubicuos de molecula pequeña sintetizados por bacterias que regulan diversos procesos incluyendo la motilidad y la formación de biopelículas (Romling et ál., Micrb. Mol. Biol. Rev., 77: 1-52, 2013). Los CDN son también un ligando para STING (Burdette et ál., Nature 478: 515-18, 2011). En

respuesta a la unión de CDN, STING activa la señalización a través del eje TBK-1/IRF-3 y del eje NF-□κB e induce la expresión de IFN-β y otros genes co-regulados (Burdette y Vance, Nat Immunol. 14: 19-26, 2013; McWhirter et ál., J. Exp. Med. 206: 1899-1911, 2009). El (c)-di-AMP cíclico es secretado por las bombas de eflujo de resistencia a múltiples fármacos de la bacteria intracelular *Listeria monocytogenes* en el citosol de céluas que presentan antígeno hospedador infectado, y se correlaciona con la protección mediada por linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en el modelo de listeriosis de ratón (Woodward et ál., Science 328, 1703-1705, 2010; Crimmins et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 105: 10191-10196, 2008). La inducción de IFN-β en los macrófagos infectados por Lm depende de la activación de la vía de señalización de STING y el nivel de IFN de tipo I inducida por c-di-AMP en los macrófagos de ratones originales $MyD88^{-/-}$ $Trif^{-/-}$ o C57BL/6 es idéntico (Leber et ál, PLoS Pathog 4 (1): e6 doi:10.1371, 2008; Witte et ál, mBio 4: e00282-13, 2012). Por el contrario, el IFN-β no es inducido por CDN en los macrófagos derivados de ratones goldenticket (gt) que codifican una proteína STING mutante no funcional (Sauer et ál., Infect. Immun. 79: 688-94, 2011). La bacteria extracelular, *Vibrio cholera,* produce una molécula híbrida c-GMP-AMP (cGAMP), que también induce la vía STING (Davies et ál, Cell 149: 358-70, 2012). La activación de la

inmunidad innata con estos segundos mensajeros ubicuos sugiere que la detección de CDN puede ser fundamental para la defensa del hospedador contra la infección bacteriana.

Mientras que STING fue descubierto como el sensor fundamental para inducir la producción de IFN-β en respuesta a la infección con el virus de herpes simple, inicialmente no se conocia cómo se detecta el ADN de este patógeno viral en el citoplasma. Este dilema se resolvió con el descubrimiento de sintasa GMP-AMP cíclica (cGAS), una transferasa de nucleotidilo de célula hospedadora que se une directamente a dsADN, y en respuesta sintetiza un segundo mensajero, GMP-AMP cíclico (cGAMP), que activa la vía de STING e induce la expresión de IFN-β (Sun et ál., Science 339: 786-91, 2013; Wu et ál., Science 339: 826-30, 2013). Las células sin un cGAS funcional son incapaces de expresar IFN-β en respuesta a la estimulación con ADN citosólico. Más tarde se demostró que las células que expresan un alelo STING particular, no eran sensibles a la estimulación por CDN, pero sí eran sensibles a la estimulación con dsADN de una manera dependiente de cGAS e independiente de TLR9 (MyD88) (Diner et. ál., 2013). Esta observación era incompatible con un mecanismo definido por cGAS que sintetiza ligandos de CDN que activan STING en respuesta a la detección de dsADN citosólico. Esta supuesta paradoja fue resuelta por varios investigadores independientes, que demostraron que cGAS

produce un CDN no canónico (c-GMP-AMP; cGAMP) que activa los alelos STING que no son sensibles a CDN canónicos (Civril et ál., Nature 498: 332-37, 2013, Diner et ál., 2013, Gao et ál., 2013, Ablasser et ál., Nature 498: 380–84, 2013, Kranzusch et ál., Cell Reports 3: 1362-68, 2013, Zhang et ál., Mol. Cell. 51: 226-35, 2013). Por lo tanto, cGAMP funciona como un segundo mensajero que se une a STING y lo activa. A diferencia de los segundos mensajeros de CDN producidos por las bacterias, en los que los dos nucleósidos de purina se unen mediante un puente de fosfato con enlaces bis-(3 ', 5'), el puente de fosfato internucleotídico en el GMP-AMP cíclico sintetizado por cGAS se une mediante enlaces no canónicos 2', 5' y 3',5' (alternativamente denominados enlaces "mixtos" o ML), representados como c[G 2', 5')pA (3',5')p]. Estas moléculas 2', 5'-3', 5' se unen a STING con afinidad nM, algunos hasta 300 veces mejor que c-di-GMP bacteriana. Por lo tanto, se ha sugerido que las moléculas 2', 5'-3', 5' representan ligandos fisiológicos mucho más potentes en términos de sireccionamiento a STING. Zhang et ál, 2013.; véase también, Xiao y Fitzgerald, Mol. Cell 51: 135-39, 2013). Las diferencias en las estructuras de los puentes de fosfato internucleotídico entre CDN producidos por bacterias [enlaces canónicos bis-(3',5')] y mediante cGAS de célula hospedadora (enlaces no canónicos 2', 5' y 3', 5') indica que el receptor STING evolucionó para

distinguir entre los CDN producidos por bacterias o por cGAS de células hospedadoras.

El STING humano tiene polimorfismos conocidos, incluyendo los alelos que codifican histidina en la posición 232, que son refractarios a los CDN canónicos, pero no a CDN no canónicos (Diner et ál., 2013, Jin et ál., 2011). Los polimorfismos de nucleótido único en el gen hSTING han demostrado que afectan la capacidad de respuesta a los CDN canónicos derivados de bacterias (Diner et ál, 2013; Gao et ál, 2013; Conlon et ál, 2013). Se han identificado cinco haplotipos de hSTING (alelos WT, REF, HAQ, AQ y Q), que varían en las posiciones de aminoácidos 71, 230, 232 y 293 (Jin et ál., 2011; Yi et ál., 2013). Las células que expresan hSTING responden mal a la estimulación con CDN bacterianos cGAMP, c-di-AMP y c-di-GMP que tienen enlaces bis-(3', 5'), pero son sensibles al producto cGAS producido endógenamente, ML cGAMP (Diner et ál., 2013). Sorprendentemente, los CDN ligados a bis-3', 5' mono- o di-fluoro sustituidos de la presente invención, en particular, los di-F-CDN, estimulan el alelo hSTING REF en comparación con el ML cGAMP producido endógenamente. Ejemplos de dinucleótidos de purina cíclicos se describen en detalle en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.° 7,709458 y 7,592,326;

WO2007/054279, WO2014/093936 y WO2014/189805; y Yan et ál., Bioorg. Med. Chem Lett. 18: 5631 (2008).

Las moléculas de CDN naturales son sensibles a la degradación mediante las fosfodiesterasas que están presentes en las células hospedadoras, por ejemplo, en células que presentan antígenos, que absorben formulaciones de vacunas que contienen dichas moléculas de CDN naturales. La potencia de un adyuvante definido puede disminuirse mediante dicha degradación, debido a que el adyuvante sería incapaz de unirse a y activar su PRR definido diana. La potencia baja del adyuvante se podría medir, por ejemplo, mediante una menor cantidad de expresión inducida de una molécula trazable de la inmunidad innata (por ejemplo, IFN-β), correlacionada con una potencia menor de la vacuna, tal como se define mediante la magnitud de una respuesta inmunitaria específica del antígeno medida.

En la presente invención, se proporcionan CDN mono- o di-fluoro sustancialmente puros, y particularmente se proporcionan derivados de ditio-difosfato de CDNs mono- o di-fluoro. El proceso de síntesis para dichos derivados de ditio-difosfato de moléculas c-di-AMP, c-GAMP y c-di-GMP genera una mezcla de diastereómeros, incluyendo las moléculas de ditio-difosfato Rp,Rp, Sp,Sp, SpRp, y Rp,Sp. Estas especies individuales pueden separarse, y muestran diferencias sustanciales en sus

características farmacéuticas, donde se prefiere el diastereómero Rp,Rp.

Definiciones

"Administración", como se usa en la presente con respecto a un ser humano, mamífero, sujeto mamífero, animal, sujeto veterinario, sujeto placebo, sujeto de investigación, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere, sin limitaciones, al contacto de una ligando exógeno, reactivo, placebo, molécula pequeña, agente farmacéutico, agente terapéutico, agente de diagnóstico, o composición con el sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico, y similares. "Administración" se puede referir, *por ejemplo.,* a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación, placebo y experimentales. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. "Administración" también abarca tratamientos in vitro y ex vivo, *por ejemplo,* de una célula, mediante un reactivo, diagnóstico, composición de unión, o mediante otra célula. Por "administran juntos" o "administrado de forma conjunta" no se pretende dar a entender que dos o más agentes se pueden administrar como una sola composición. Aunque la administración como una sola composición es contemplada por

la presente invención, tales agentes pueden ser suministrados a un solo sujeto como administraciones separadas, que pueden realizarse en el mismo o diferente momento, y que pueden realizarse por la misma vía o diferentes vías de administración. Por "administrado simultáneamente" se quiere decir que dos o más agentes se pueden administrar esencialmente en el mismo momento, aunque no se administren necesariamente como una composición única o por la misma vía de administración.

Un "agonista", con respecto a un ligando y receptor, comprende una molécula, combinación de moléculas, un complejo, o una combinación de reactivos, que estimula el receptor. Por ejemplo, un agonista del receptor de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) puede abarcar GM-CSF, una muteína o derivado de GM-CSF, un péptido mimético de GM-CSF, una molécula pequeña que imita la función biológica de GM-CSF, o un anticuerpo que estimula el receptor de GM-CSF. Un "antagonista", con respecto a un ligando y receptor, comprende una molécula, combinación de moléculas, o un complejo, que inhibe, contrarresta, disminuye, y/o desensibiliza el receptor. "Antagonista" abarca cualquier reactivo que inhibe una actividad constitutiva del receptor. Una actividad constitutiva es una que se manifiesta en ausencia de una interacción ligando/receptor. "Antagonista" también

abarca cualquier reactivo que inhibe o previene una actividad estimulada (o regulada) de un receptor. A modo de ejemplo, un antagonista del receptor GM-CSF incluye, sin que ello implique ninguna limitación, un anticuerpo que se une al ligando (GM-CSF) y evita su unión al receptor, o un anticuerpo que se une al receptor e impide que el ligando se una al receptor, o donde el anticuerpo bloquea el receptor en una conformación inactiva.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente, se refiere a un péptido o polipéptido derivado de, modelado después de o sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de estos, capaz de unirse específicamente a un antígeno o epítopo. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology, 3ª edición, W. E. Paul, ed, Raven Press, Nueva York (1993).; Wilson (1994; J. Immunol Métodos 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem Biophys. Methods 25: 85-97. El término anticuerpo incluye partes de unión al antígeno, es decir, "sitios de unión al antígeno," (por ejemplo, fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de complementariedad (CDR)) que conservan la capacidad de unirse al antígeno, incluyendo (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CHl; (ii) un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente de disulfuro en la

región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CHl; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et ál., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Los anticuerpos de cadena simple también están incluidos como referencia en el término "anticuerpo".

El término "compuesto de referencia di-OH "como se usa en la presente, se refiere a un compuesto CDN conocido que carece de cualquier susbstituyente 2' y/o 2'' fluoro de los compuestos mono o di-F-CDN como se describe en la presente, en lugar de tener un sustituyente -OH en estas posiciones. Preferiblemente, el compuesto de referencia di-OH conocido para los compuestos mono- o di-F-CDN como se describe en la presente tiene las mismas bases que el compuesto mono- o di-F-CDN, y tiene el mismo enlace de fosfodiéster (por ejemplo, fosfodiéster o el análogo de tiofosfato). Por ejemplo, el compuesto de referencia di-OH para 3’3’-RR-(2’F-A)(2’F-A), 3’3’-RR-(2’F-A)(A), 3’3’-RR-(A)(2’F-A), y 3’3’-RR-(2’βF-A)(2’βF-A) es 3’3’-RR-(A)(A); el compuesto de referencia di-OH para 3’3’-RR-(G)(2’F-A), 3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-A), y 3’3’-RR-(2’F-G)(A) es 3’3’-RR-(G)(A); y el compuesto de referencia di-OH para 3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-G)

es 3’3’-RR-(G)(G). Los compuestos de referencia di-OH 3’3’-RR-(A)(A), 3’3’-RR-(G)(A) y 3’3’-RR-(G)(G) se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 2014/093936.

"Un agente que mejora la permeabilidad" o "un agente que mejora la absorción", como se usa en la presente, con relación a la permeabilidad o absorción celular de un compuesto mediante las células, es un agente que mejora la permeabilidad de una célula a un compuesto o mejora la absorción de un compuesto mediante la célula, ya sea *in vitro* o *in vivo.* Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente, o compuesto di-OH de referencia se pueden comparar en un ensayo basado en células *in vitro,* en donde el ensayo puede realizarse con o sin un agente, tal como digitonina, que permite que el compuesto sea absorbido por la célula. Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente son sorprendentemente activos en tales ensayos basados en células sin la necesidad de un agente tal que mejore la permeabilidad de la célula o mejore la absorción del compuesto mediante la célula, por ejemplo, en el ensayo de células THP-1 como se describe en la presente. Las composiciones que comprenden los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden formular sin un agente que mejore la permeabilidad de la célula o mejore la absorción del compuesto mediante la célula, por ejemplo, sin un vehículo de administración que mejore la permeabilidad de

la célula o mejore la absorción celular. Tales aditivos o vehículos de administración incluyen, sin limitación, adyuvantes lipídicos o similares a lípidos, liposomas, vesículas multilamelares reticuladas entre bicapas, nanoporadores, nanopartículas y similares, tales como nanopartículas que comprenden poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), y/o sus copolímeros tales como nanopartículas o micropartículas biodegradables basadas en poli(ácidoD,L-láctico-co-glicólico) [PLGA] o poli-anhidrido. Por "sustancialmente purificado" con respecto a los CDN de la invención se quiere decir que una especie especificada representa al menos el 50 %, más a menudo representa al menos el 60 %, por lo general representa al menos el 70 %, más comúnmente representa al menos el 75 % , más comúnmente representa al menos el 80 %, por lo general representa al menos el 85 %, más generalmente representa al menos el 90 %, más generalmente representa al menos el 95 % y convencionalmente representa al menos el 98 % en peso, o mas, de la actividad de CDN presente en una composición. Los pesos de agua, amortiguadores, sales, detergentes, reductores, inhibidores de proteasa, estabilizadores (incluyendo una proteína añadida, tal como albúmina), y excipientes generalmente no se utilizan en la determinación de la pureza.

"Específicamente" o "selectivamente" se une, cuando se hace referencia a un ligando/receptor, ácido nucleico/ácido nucleico complementario, anticuerpo/antígeno, u otro par de unión (por ejemplo, una citocina a un receptor de citocinas) (cada uno en general conocido en la presente como una "biomolécula diana" o un "objetivo") indica una reacción de unión que está relacionada con la presencia de la diana en una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos. Unión específica puede significar, por ejemplo, que el compuesto de unión, ligando de ácido nucleico, anticuerpo, o composición de unión derivada del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, del método contemplado se une a su diana con una afinidad que es a menudo al menos 25 % mayor, más a menudo al menos 50 % mayor, más a menudo al menos 100 % (2-veces) mayor, normalmente al menos diez veces mayor, más normalmente al menos 20 veces mayor, y más normalmente al menos 100 veces mayor que la afinidad con una molécula no objetivo.

"Ligando" se refiere a una molécula pequeña, ácido nucleico, péptido, polipéptido, sacárido, polisacárido, glicano, glicoproteína, glicolípido, o combinaciones de estos que se unen a una biomolécula diana. Mientras que tales ligandos pueden ser agonistas o antagonistas de un receptor, un ligando también abarca un agente de unión que no es un agonista o antagonista, y no tiene propiedades agonistas o antagonistas.

La unión específica de un ligando por su diana análogo a menudo se expresa en términos de una "Afinidad". En modalidades preferidas, los ligandos de la presente invención se unen con afinidades de entre aproximadamente 10^4 M^{-1} y aproximadamente 10^8 M^{-1}. La afinidad se calcula como $K_d = k_{off}/k_{on}$ (k_{off} es la constante de velocidad de disociación, K_{on} es la constante de velocidad de asociación y K_d es la constante de equilibrio). La afinidad puede determinarse en equilibrio mediante la medición de la fracción unida (r) del ligando etiquetado a diversas concentraciones (c). Los datos se representan mediante la ecuación de Scatchard: r/c = K (n-r): donde r = moles de ligando unido/mol del receptor en equilibrio; c= concentración de ligando libre en equilibrio; K= constante de asociación de equilibrio; y n = número de sitios de unión de ligando por molécula de receptor. Mediante análisis gráfico, r/c se representa en el eje Y frente a r en el eje X, produciendo así una representación de Scatchard. La medición de afinidad mediante análisis de Scatchard es bien conocida en la técnica. *Véase, por ejemplo,* van Erp et ál., *J. Immunoassay 12:* 425-43, 1991; Nelson y Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.* 27: 65-8, 1988). En una alternativa, la afinidad se puede medir por calorimetría de titulación isotérmica (ITC). En un experimento de ITC típico, una solución de ligando es titulado en una solución de su diana análogo. El calor liberado tras su

interacción (ΔH) se controla a través del tiempo. A medida que se titulan cantidades sucesivas del ligando en la célula ITC, la cantidad de calor absorbido o liberado está en proporción directa a la cantidad de unión. A medida que el sistema alcanza la saturación, la señal de calor disminuye hasta que sólo se observan calores de dilución. Una curva de unión se obtiene a partir de un gráfico de calores de cada inyección contra la relación del ligando y auxiliar de unión en la célula. La curva de unión se analiza con el modelo de unión apropiado para determinar K_B, n y ΔH. Téngase en cuenta que $K_B = 1/K_d$.

El término "profármaco" tal como se utiliza en la presente hace referencia a una modificación de compuestos contemplados, en donde el compuesto modificado exhibe menos actividad farmacológica (en comparación con el compuesto modificado) y en donde el compuesto modificado se convierte dentro del cuerpo (por ejemplo, en una célula diana o órgano diana) nuevamente en la forma no modificada a través de reacciones enzimáticas o no enzimáticas. En determinadas modalidades, el hidroxilo en una ribosa comprende un grupo saliente profármaco. Los profármacos pueden modificar las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas de los fármacos. Los profármacos tradicionales se clasifican como fármacos que son activados mediante una transformación in vivo para formar el fármaco activo. Las razones para el desarrollo de profármacos

comúnmente son escasa solubilidad acuosa, inestabilidad química, baja biodisponibilidad oral, falta de penetración de la barrera hematoencefálica, y metabolismo de primer paso elevado asociado con el fármaco precursor. Las fracciones de profármacos adecuadas se describen en, por ejemplo, "Prodrugs and Targeted Delivery", J. Rautico, Ed., John Wiley & Sons, 2011. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, grupos salientes eliminados por esterasas celulares, un éster de ácido graso de C6 a C18, un éster de miristoílo, un éster de pentanoílo, un éster de hexanoílo, y un éster de heptanoílo. Por ejemplo, los compuestos mono-2'F-CDN como se describen en la presente pueden incluir la sustitución en el 2 'hidroxilo restante, para formar tales ésteres.

El término "sujeto" o "individuo" como se usa en la presente, se refiere a un organismo humano o no humano. Por lo tanto, los métodos y composiciones descritos en la presente son aplicables tanto a enfermedades humanas como veterinarias. En determinadas modalidades, los sujetos son "pacientes", es decir, humanos vivos que están recibiendo atención médica para una enfermedad o afección. Esto incluye personas que no tienen una enfermedad definida que están siendo investigados en busca de signos de patología. Se prefieren los sujetos que tienen un diagnóstico existente de un cáncer particular al cual se dirigen las composiciones y los métodos de la presente

invención. Los cánceres preferidos para el tratamiento con las composiciones descritas en la presente incluyen, de modo no taxativo, cáncer de próstata, carcinoma renal, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y cáncer de mama.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad de un reactivo o composición farmacéutica que es suficiente para mostrar un beneficio al paciente, es decir, causar una disminución, prevención, o mejora de los síntomas de la afección a tratar. Cuando el agente o composición farmacéutica comprende un agente de diagnóstico, una "cantidad eficaz en términos de diagnóstico" se define como una cantidad que es suficiente para producir una señal, imagen u otro parámetro de diagnóstico. Las cantidades eficaces de la formulación farmacéutica variarán de acuerdo con factores tales como el grado de susceptibilidad del individuo, la edad, sexo y peso del individuo, y respuestas idiosincrásicas del individuo. Una "cantidad eficaz" incluye, sin limitación, una cantidad que puede mejorar, revertit, mitigar, prevenir o diagnosticar un síntoma o signo de una afección médica o trastorno o un proceso causal de estos. A menos que se determine de otro modo, de forma explícita o por el contexto, una

"cantidad eficaz" no se limita a una cantidad mínima suficiente para mejorar una afección.

"Tratamiento" o "tratar" (con respecto a una afección o enfermedad) es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen, y preferiblemente, resultados clínicos. A los efectos de la presente invención, los resultados beneficiosos o deseados con respecto a una enfermedad incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: prevención de una enfermedad, mejora de una afección asociada con una enfermedad, cura de una enfermedad, disminución de la gravedad de una enfermedad, retraso del avance de una enfermedad, alivio de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, aumento de la calidad de vida de alguien que padece una enfermedad, y/o prolongación de supervivencia. Del mismo modo, a los efectos de la presente invención, los resultados beneficiosos o deseados con respecto a una afección incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: prevención de una afección, mejora de una afección, cura de una afección, disminución de la gravedad de una afección, retraso del avance de una afección, alivio de uno o más síntomas asociados con una afección, aumento de la calidad de vida de alguien que padece una afección, y/o prolongación de supervivencia. Por ejemplo, en modalidades donde las composiciones descritas en la presente se utilizan

para el tratamiento del cáncer, los resultados beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: reducción de la proliferación (o destrucción) de células neoplásicas o cancerosas, reducción de metástasis de células neoplásicas encontradas en el cáncer, reducción del tamaño de un tumor, disminución de los síntomas resultantes de cáncer, aumento de la calidad de vida de quienes padecen cáncer, disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retraso del avance del cáncer, y/o prolongación de la supervivencia de pacientes que padecen cáncer. Dependiendo del contexto, el "tratamiento" de un sujeto puede implicar que el sujeto necesita tratamiento, por ejemplo, en la situación en la cual el sujeto comprende un trastorno que se espera que mejore mediante la administración de un reactivo.

"Vacuna" abarca vacunas preventivas. Vacuna también abarca vacunas terapéuticas, por ejemplo, una vacuna administrada a un mamífero que comprende una afección o trastorno asociado con el antígeno o epítopo proporcionado por la vacuna.

Dinucleótidos de Purina Cíclicos

Las procariotas, así como también las células eucariotas, utilizan varias moléculas pequeñas para la señalización celular y comunicación intra e intercelular. Los nucleótidos cíclicos

como cGMP, cAMP, etc. son conocidos por tener actividad de inicio y reguladora en las células pro- y eucariotas. A diferencia de las células eucariotas, las células procariotas también utilizan dinucleótidos de purina cíclicos como moléculas reguladoras. En las procariotas, la condensación de dos moléculas GTP es catalizada mediante la enzima diguanilato ciclasa (DGC) para proporcionar c-diGMP, que representa un regulador importante en las bacterias.

Trabajos recientes sugieren que diGMP cíclico o análogos de estostambién pueden estimular o aumentar la respuesta inmunitaria o inflamatoria en un paciente o pueden aumentar la respuesta inmunitaria a una vacuna, al servir como un adyuvante en mamíferos. La detección citosólica del ADN derivado de patógenos requiere la señalización a través de la cinasa de unión a TANK 1 (TBK1) y su factor de transcripción corriente abajo, factor regulador de IFN 3 (IRF3). Una proteína transmembrana llamada STING (estimulador de genes de IFN; también conocido como MITA, ERIS, MPYS y TMEM173) funciona como el receptor de señalización para estos dinucleótidos de purina cíclicos, que causan la estimulación del eje de señalización TBK1-IRF3 y una respuesta de interferón tipo I dependiente de STING. Véase, por ejemplo, Fig. 1. Burdette et ál., Nature 478:515-18, 2011 demostraron que STING se une directamente a

monofosfato de diguanilato cíclico, pero no a otros nucleótidos o ácidos nucleicos no relacionados.

Los dinucleótidos de purina cíclicos para su uso como precursores para obtener los CDN de la presente invención se describen en detalle en, por ejemplo, Gao et ál., Cell (2013) 153: doi: 10.1016/j.cell.2013.04.046; Patentes de Estados Unidos N.° 7,709458 y 7,592,326; WO2007/054279, WO2014/093936 y WO2014/189805; y Yan et ál., Bioorg. Med. Chem Lett. 18: 5631 (2008). Estos CDN pueden ser modificados mediante técnicas de química orgánica estándar con el fin de producir los CDN de la presente invención.

Los compuestos mono- o di-F-CDN de la presente invención como se describen en la presente son agonistas potentes de STING, y demuestran la mejora inesperada sobre compuestos de CDN no fluoro sustituidos conocidos, tales como RR-(A)(A), o el producto cGAS producido endógenamente, ML cGAMP. Los compuestos mono- o di-F-CDN de la presente invención se comparan con compuestos conocidos que difieren en la sustitución de la posición 2' y 2'', por ejemplo, un compuesto de referencia di-OH, tales como 3'3'-(A)(A), 3'3'-(G)(A), 3'3'-RR-(A)(A) o 3'3'-RR- (G)(A). Las propiedades de los compuestos mono- o di-F-CDN se demuestran en los Ejemplos 11-17 a continuación, donde los compuestos demuestran una mejora sobre el compuesto de referencia di-OH por tener uno o más de

i) un cambio T_m superior en un ensayo DSF como se describe en el Ejemplo 11 para una o más de hSTING (WT), hSTING (HAQ) o hSTING (REF); ii) una expresión relativa más alta de la transcripción de IFN-β en un ensayo de hPBMC como se describe en el Ejemplo 13 para uno o más de hSTING (WT), hSTING (HAQ) o hSTING (REF); o iii) una EC50 inferior en un ensayo de células THP1 como se describe en el Ejemplo 14, donde preferiblemente el ensayo THP1 se lleva a cabo en ausencia de digitonina. En algunas modalidades, los compuestos mono- o di-F-CDN demuestran una mejora sobre el compuesto de referencia di-OH por tener dos o más de i) un cambio T_m superior en un ensayo DSF como se describe en el Ejemplo 14 para uno o más de hSTING (WT), hSTING (HAQ) o hSTING (REF); ii) una expresión relativa más alta de la transcripción de IFN-β en un ensayo de hPBMC como se describe en el Ejemplo 13 para uno o más de hSTING (WT), hSTING (HAQ) o hSTING (REF); o iii) una EC50 inferior en un ensayo de células THP1 como se describe en el Ejemplo 14, donde preferiblemente el ensayo THP1 se lleva a cabo en ausencia de digitonina. En algunas modalidades, los compuestos mono- o di-F-CDN demuestran una mejora sobre el compuesto de referencia di-OH ya que tienen cada uno de i) un cambio T_m superior en un ensayo DSF como se describe en el Ejemplo 11 para uno o más de hSTING (WT), hSTING (HAQ) o hSTING (REF); ii) una expresión relativa más alta de la transcripción de IFN-β en un ensayo de hPBMC como se describe

en el Ejemplo 13 para uno o más de hSTING (WT), hSTING (HAQ) o hSTING (REF); o iii) una EC50 inferior en un ensayo de células THP1 como se describe en el Ejemplo 14, donde preferiblemente el ensayo THP1 se lleva a cabo en ausencia de digitonina. En algunas modalidades de los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente, el compuesto mono- o di-F-CDN tiene una expresión relativamente más alta de al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, o al menos 1000 veces de transcripción de IFN-β en un ensayo de hPBMC como se describe en el Ejemplo 13 para el alelo hSTING REF en comparación con 3'3'-RR-(A)(A). En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN tiene una EC50 en el ensayo de THP1 descrito en el Ejemplo 14 sin adición de digitonina que es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, o al menos 8 veces menor que la EC50 de un compuesto de referencia di-OH. En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN tiene una EC50 en el ensayo de células THP1 sin adición de un agente que mejora la permeabilidad del compuesto a la célula o un agente que potencia la absorción del compuesto mediante la célula que es de menos de 40 µM, menos de 30 µM, menos de 20 µM, menos de 15 µM, o menos de 10 µM. En algunas modalidades, el compuesto mono- o di-F-CDN tiene una EC50 en el ensayo THP1 descrito en

el Ejemplo 14 sin adición de digitonina que es de menos de 40 µM, menos de 30 µM, menos de 20 µM, menos de 15 µM, o menos de 10 µM.

Los dinucleótidos de purina cíclicos preferidos son los análogos de fosforotioato, conocidos en la presente como "tiofosfatos". Los fosforotioatos son una variante de los nucleótidos normales en los que uno de los oxígenos no puenteados es reemplazado por un azufre. La sulfuración del enlace de internucleotído reduce drásticamente la acción de endo-y exonucleasas, incluyendo 5' a 3' y 3 'a 5' de ADN POL 1 exonucleasa, nucleasas S1 y P1, RNasas, nucleasas del suero y la fosfodiesterasa de veneno de serpiente. Además, el potencial para cruzar la bicapa lipídica aumenta.

Un enlace de fosforotioato es intrínsecamente quiral. El experto en la técnica reconocerá que los fosfatos en esta estructura pueden existir en formas R o S. Por lo tanto, las formas Rp,Rp, Sp,Sp, Sp,Rp, y Rp,Sp son posibles para los compuestos de la Formula I y todas las subformulas de esta. Como se señaló anteriormente, los dinucleótidos de purina cíclicos de la presente invención comprenden formas 2'-F sustituidas de CDN y, en particular, tiofosfatos de CDN. Por lo tanto, las formas Rp,Rp, Sp,Sp, Sp,Rp y Rp,Sp 2'-F sustituidas pueden igualmente obtenerse. Las pPurinas preferidas incluyen, pero no se limitan a, adenina, guanina,

inosina, hipoxantina, xantina, isoguanina, etc. El mono- o di-F-CDN de la presente invención son preferiblemente los análogos de fosforotioato, incluyendo estereoisómeros Sp,Sp, Rp,Rp, SpRp, or Rp,Sp sustancialmente puros de estos, y más preferiblemente, estereoisómeros Rp, Rp sustancialmente puros de estos.

El término "alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarburo saturado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, n-hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. Los grupos alquilo incluyen comúnmente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más comúnmente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono lo más preferido. El término "alquilo inferior", tal como se usa en la presente, incluye de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo como se usan en la presente pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

El término "alquenilo", como se usa en la presente, se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinte cuatro átomos de carbono y que tiene al menos un enlace doble carbono-carbono. Ejemplos de grupos alquenilo incluyen, sin limitación, etenilo, propenilo,

butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, dienos tales como 1,3-butadieno y similares. Los grupos alquenilo incluyen comúnmente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más comúnmente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono lo más preferido. Los grupos alquenilo como se usan en la presente opcionalmente incluyen uno o más grupos sustituyentes adicionales.

El término "alquinilo", como se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinte cuatro átomos de carbono y que tiene al menos un enlace triple carbono-carbono. Ejemplos de grupos alquinilo incluyen, sin limitación, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, y similares. Los grupos alquinilo incluyen comúnmente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más comúnmente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono lo más preferido. Los grupos alquinilo como se usan en la presente opcionalmente incluyen uno o más grupos sustituyentes adicionales.

El término "acilo", como se usa en la presente, se refiere a un radical formado por la eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general -C(O)-X donde X es comúnmente alifático, alicíclico o aromático. Ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfinilos aromáticos, sulfinilos

alifáticos, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos y similares. Los grupos acilo como se usan en la presente pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

El término "alicíclico" se refiere a un sistema de anillo cíclico en donde el anillo es alifático. El sistema de anillo puede comprender uno o más anillos en donde al menos un anillo es alifático. Los alicíclicos preferidos incluyen anillos que tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 átomos de carbono en el anillo. Alicíclico como se usa en la presente puede incluir opcionalmente otros grupos sustituyentes.

El término "alifático", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un radical de hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono en el que la saturación entre cualesquiera dos átomos de carbono es un enlace sencillo, doble o triple. Un grupo alifático contiene preferentemente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más comúnmente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono , siendo de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono lo más preferido. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático puede interrumpirse con uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Dichos grupos alifáticos interrumpidos por heteroátomos incluyen, sin limitación, polialcoxilos, tales como polialquilenglicoles, poliaminas y

poliiminas. Los grupos alifáticos como se usan en la presente pueden incluir opcionalmente otros grupos sustituyentes.

El término "alcoxilo", como se usa en la presente, se refiere a un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno en donde el átomo de oxígeno se utiliza para unir el grupo alcoxilo a una molécula precursora. Ejemplos de grupos alcoxilo incluyen, sin limitación, metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, n-butoxilo, sec-butoxilo, terc-butoxilo, n-pentoxilo, neopentoxilo, n-hexoxilo y similares. Los grupos alcoxilo como se utilizan en la presente pueden incluir opcionalmente otros grupos sustituyentes.

El término "aminoalquilo", como se usa en la presente, se refiere a un radical de alquilo C\-Cn amino sustituido. La porción alquilo del radical forma un enlace covalente con una molécula precursora. El grupo amino puede estar situado en cualquier posición y el grupo aminoalquilo puede ser sustituido con un grupo sustituyente adicional en las porciones alquilo y/o amino.

Los términos "aralquilo" y "arilalquilo", como se usan en la presente, se refieren a un grupo aromático que está unido covalentemente a un radical alquilo C\-Cn. La porción de radical alquilo del grupo aralquilo (o arilalquilo) resultante forma un enlace covalente con una molécula precursora. Los ejemplos incluyen, sin limitación, bencilo, fenetilo y

similares. Los grupos aralquilo tal como se utilizan en la presente pueden incluir opcionalmente otros grupos sustituyentes unidos a los grupos alquilo, arilo o ambos que forman el grupo radical.

Los términos "arilo" y "aromático", como se usan en la presente,se refieren a radicales del sistema de anillo carbocíclico mono- o policíclico que tienen uno o más anillos aromáticos. Ejemplos de grupos arilo incluyen, sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares. Los sistemas de anillo arilo preferidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Los grupos arilo como se usan en la presente pueden incluir opcionalmente otros grupos sustituyentes.

Los términos "halo" y "halógeno", tal como se utilizan en la presente, se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

Los términos "heteroarilo" y "heteroaromático", como se usan en la presente, se refieren a un radical que comprenden un sistema de anillo aromático mono- o poli-cíclico, sistema de anillo o sistema de anillo fusionado en donde al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. Heteroarilo también pretende incluir sistemas de anillo fusionados, que incluyen sistemas donde uno o más de los anillos fusionados no contienen heteroátomos. Los grupos

heteroarilo incluyen comúnmente un átomo de anillo seleccionado de azufre, nitrógeno u oxígeno. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazol, oxadiazol, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, quinoxalinilo y similares. Los radicales heteroarilo pueden estar unidos a una molécula precursora directamente o a través de una fracción de unión tal como un grupo alifático o heteroátomo. Los grupos heteroarilo como se utilizan en la presente pueden incluir opcionalmente otros grupos sustituyentes.

El término "heteroarilalquilo", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un grupo heteroarilo como se definió anteriormente que incluye además un radical de alquilo C_1-C_{12} unido covalentemente. La porción de radical alquilo del grupo heteroarilalquilo resultante es capaz de formar un enlace covalente con una molécula precursora. Ejemplos incluyen, sin limitación, piridinilmetilo, pirimidiniletilo, naftiridinilpropilo y similares. Los grupos heteroarilalquilo como se usan en la presente memoria pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales en una o ambas porciones de heteroarilo o alquilo.

Como se señaló anteriormente, los compuestos mono- o di-F CDN también incluyen formas de profármacos de los CDN y en particular tiofosfatos CDN. Los profármacos pueden modificar las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas de los fármacos. Los profármacos tradicionales se clasifican como fármacos que son activados mediante una transformación in vivo para formar el fármaco activo. Las razones para el desarrollo de profármacos comúnmente son escasa solubilidad acuosa, inestabilidad química, baja biodisponibilidad oral, falta de penetración de la barrera hematoencefálica, y metabolismo de primer paso elevado asociado con el fármaco precursor. Las fracciones de profármacos adecuadas se describen en, por ejemplo, "Prodrugs and Targeted Delivery", J. Rautico, Ed., John Wiley & Sons, 2011.

El término "sustancialmente puro" como se usa en la presente con respecto a los dinucleótidos de purina cíclicos ditio-fosfato se refiere a una forma Rp, Rp o Rp,Sp que es al menos 75 % pura en relación con otras estereoquímicas posibles en los centros de fósforo quirales indicados en los compuestos mono o di-F-RR-CDN como se describe en la presente, tales como compuestos de la fórmula II. A modo de ejemplo, un "3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) sustancialmente puro" sería al menos 75 % puro con relación a las formas Rp,Sp y Sp,Sp, es decir, con respecto

a 3'3 '-RS(2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-SS-(2'F-A)(2'F-A). En modalidades preferidas, un dinucleótido de purina cíclico sustancialmente puro es al menos 85 % puro, al menos 90 % puro, al menos 95 % puro, al menos 97 % puro, y al menos 99 % puro. Mientras que una preparación de dinucleótido de purina cíclico sustancialmente pura de la invención es "estereoquímicamente pura", esto no pretende indicar que todos los CDN dentro de la preparación que tienen una estereoquímica particular en estos centros quirales son, por lo demás, idénticos. Por ejemplo, una preparación de dinucleótido de purina cíclico sustancialmente pura puede contener una combinación de 3'3 '-RR-(2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) y todavía ser una preparación de dinucleótido de purina cíclico sustancialmente pura. Tal preparación también puede incluir otros componentes como se describe más adelante que son ventajosos para el tratamiento del paciente, siempre que todos los CDN dentro de la preparación tengan una estereoquímica particular, en estos centros quirales.

Los compuestos mono- o di-F-CDN y composiciones de estos descritos en la presente se pueden administrar a un hospedador, ya sea solos o junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para inducir, modificar, o estimular una respuesta inmunitaria apropiada. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, la respuesta

inmunitaria específica, la respuesta inmunitaria no específica, tanto la respuesta específica como no específica, la respuesta innata, la respuesta inmunitaria primaria, la inmunidad adaptativa, la respuesta inmunitaria secundaria, la respuesta inmunitaria de memoria, activación de células inmunitarias, la proliferación de células inmunitarias, la diferenciación de células inmunitarias, y la expresión de citocinas. En determinadas modalidades, los compuestos mono- o di-F-CDN y composiciones de estos descritos en la presente se administran junto con una o más composiciones adicionales que incluyen vacunas destinadas a estimular una respuesta inmunitaria en uno o más antígenos predeterminados; adyuvantes; antagonistas de las vías CTLA-4 y PD-1, lípidos, liposomas, agentes quimioterapéuticos, líneas celulares inmunomoduladoras, etc.

Los compuestos mono- o di-F-CDN y composiciones de estos descritos en la presente se pueden administrar antes, después y/o simultáneamente con una composición o modalidad terapéutica o profiláctica adicional. Estos incluyen, sin limitación, la molécula coestimuladora B7, interleucina-2, interferón-γ, GM-CSF, antagonistas de CTLA-4, ligando OX-40/OX-40, ligando CD40/CD40, sargramostim, levamisol, virus vaccinia, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), liposomas, alumbre, adyuvante completo o incompleto de Freund, endotoxinas desintoxicadas, aceites

minerales, sustancias tensioactivas tales como lipolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, y emulsiones de aceite o hidrocarburos. Se prefieren portadores para la inducción de una respuesta inmunitaria de linfocitos T que preferentemente estimulan una respuesta de linfocitos T citolíticos frente a una respuesta de anticuerpo, aunque aquellos que estimulan ambos tipos de respuesta se pueden utilizar también. En los casos en los que el agente es un polipéptido, se pueden administrar el polipéptido en sí o un polinucleótido que codifica el polipéptido. El vehículo puede ser una célula, tal como una célula presentadora de antígeno (APC) o una célula dendrítica. Las células presentadoras de antígenos incluyen tipos de células tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Otras células profesionales presentadoras de antígeno incluyen monocitos, células de Kupffer de zona marginal, microglia, células de Langerhans, células dendríticas interdigitantes, células dendríticas foliculares, y linfocitos T. También se pueden utilizar células facultativas presentadoras de antígeno. Los ejemplos de células facultativas presentadoras de antígeno incluyen astrocitos, células foliculares, endotelio y fibroblastos. El portador puede ser una célula bacteriana que se transforma para expresar el polipéptido o para suministrar un polinucleotido que se expresa posteriormente en las células del individuo vacunado.

Los adyuvantes, tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, se pueden añadir para aumentar la capacidad de la vacuna para activar, mejorar o prolongar una respuesta inmunitaria. Los materiales adicionales, tales como citocinas, quimiocinas, y secuencias de ácidos nucleicos bacterianos, como CpG, un agonista del receptor tipo toll (TLR) 9, así como agonistas adicionales para TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 8, TLR9 , incluyendo la lipoproteína, LPS, lípido A de monofosforilo, ácido lipoteicoico, imiquimod, resiquimod y, además, agonistas del gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) tales como poli I: C, utilizados por separado o junto con las composiciones descritas también son adyuvantes potenciales. Otros ejemplos representativos de adyuvantes incluyen el adyuvante sintético QS-21 que comprende una saponina homogénea purificada a partir de la corteza de Quillaja saponaria y Corynebacterium parvum (McCune et ál.,, Cancer, 1979; 43:1619). Se entenderá que el adyuvante está sujeto a optimización. En otras palabras, el experto puede realizar experimentación de rutina para determinar el mejor adyuvante a utilizar.

Los métodos para la administración conjunta con un agente terapéutico adicional son bien conocidos en la técnica (Hardman, et ál., (eds.) (2001) Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill,

Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA). En general, la administración conjunta o co-administración indican el tratamiento de un sujeto con dos o más agentes, donde los agentes se pueden administrar simultáneamente o en momentos diferentes. Por ejemplo, tales agentes pueden ser suminsitrados a un único sujeto como administraciones separadas, que pueden realizarse esencialmente al mismo tiempo o en momentos diferentes, y que pueden realizarse por la misma vía o por diferentes vías de administración. Tales agentes pueden ser suministrados a un único sujeto en la misma administración (por ejemplo, misma formulación) de tal manera que se administren al mismo tiempo por la misma vía de administración.

Debido a las propiedades adyuvantes de los compuestos de la presente invención, su uso puede también combinarse con otras modalidades terapéuticas, incluyendo otras vacunas, adyuvantes, antígenos, anticuerpos, y moduladores inmunitarios. Los ejemplos se proporcionan a continuación.

Adjuvantes

Además de los compuestos mono- o di-F-CDN y las composiciones de estos que se describen en la presente, las composiciones o los métodos de la presente invención pueden comprender además una o más sustancias adicionales que, debido a su naturaleza, pueden actuar para estimular o de otra manera utilizar el sistema inmunitario para que responda a los antígenos de cáncer presentes en la(s) célula(s) tumoral(es) específica(s). Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, lípidos, liposomas, bacterias inactivadas que inducen la inmunidad innata (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* inactivada o atenuada), composiciones que median la activación inmunitaria innata a través de receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo (NOD) (NLR), receptores tipo (RIG)-1 basados en genes inducibles de ácido retinoico (RLR), receptores de lectina tipo C (CLR) y/o patrones moleculares asociados a patógenos ("PAMP"). Ejemplos de PAMP incluyen lipoproteínas, lipopolipéptidos, peptidoglicanos, zymosan, lipopolisacárido, porinas de Neisseria, flagelina, profillina, galactoceramida, dipéptido de muramilo. Los peptidoglicanos, lipoproteínas, y ácidos lipoteicoicos son componentes de la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Los lipopolisacáridos son expresados por la mayoría de las bacterias, de las cuales MPL es un ejemplo. Flagelina se refiere al componente estructural de los flagelos bacterianos que es secretado por bacterias patógenas

y comensales. α-galactosilceramida (α-GalCer) es un activador de linfocitos T citolíticos naturales (NKT). El dipéptido de muramilo es un motivo de peptidoglicano bioactivo común a todas las bacterias. Esta lista no pretende ser limitante. Las composiciones adyuvantes preferidas se describen a continuación.

Inhibidores de punto de control inmunitario

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describe en la presente se pueden utilizar junto con un inhibidor de punto de control inmunitario, tal como un inhibidor de punto de control inmunitario seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de la vía CTLA-4, un antagonista de la vía PD-1, un antagonista de la vía Tim-3, un antagonista de la vía Vista, un antagonista de la vía BTLA, un antagonista de la vía LAG-3, o un antagonista de la vía TIGIT. En algunas modalidades, el inhibidor de punto de control inmunitario se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti Tim-3, un anticuerpo anti-Vista, un anticuerpo anti-BTLA, un anticuerpo anti-LAG-3, o un anticuerpo anti-TIGIT.

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con antagonistas de la via CTLA-4. En algunas modalidades, la combinación se utiliza para

tratar un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. CTLA-4 se considera un importante regulador negativo de la respuesta inmunitaria adaptativa. Los linfocitos T activados aumentan CTLA-4, que se une a CD80 y CD86 en células presentadoras de antígeno con mayor afinidad que CD28, inhibiendo así la estimulación de linfocitos T, la expresión de genes IL-2 y la proliferación de linfocitos T. Los efectos antitumorales del bloqueo de CTLA4 se han observado en modelos murinos de carcinoma de colon, cáncer de próstata metastásico, y melanoma metastásico. En algunas modalidades, el antagonista de la vía CTLA-4 es una molécula de anticuerpo anti-CTLA-4 seleccionada del grupo que consiste en tremelimumab e ipilimumab. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo anti-CTLA-4 tal como se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.° 5.811.097.

Ipilimumab (Yervoy ™, un anticuerpo de CTLA-4, también conocido como MDX-010, CAS N.° 477202-00-9) y tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible en Pfizer, anteriormente conocido como ticilimumab, CP-675,206) son anticuerpos monoclonales humanizados que se unen a CTLA4 humano y previenen su interacción con CD80 y CD86. Los estudios de Fase I y II que utilizan ipilimumab y tremelimumab han demostrado actividad clínica en pacientes con cáncer. Otros reguladores inmunitarios negativos que pueden funcionar como diana mediante una

estrategia similar incluyen la muerte celular programada 1 (PD-1), el atenuador de linfocitos B y T, el factor de crecimiento transformante β, la interleucina-10 y el factor de crecimiento endotelial vascular.

En algunas modalidades, los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con un anticuerpo anti CTLA-4 y un anticuerpo anti -PD-1. En una modalidad, la combinación incluye una molécula de anticuerpo anti-PD-1, por ejemplo, como se describe en la presente, y un anticuerpo anti-CTLA-4, por ejemplo, Ipilimumab. Los ejemplos de dosis que se pueden utilizar incluyen una dosis de molécula de anticuerpo anti-PD-1 de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, por ejemplo, 3 mg/kg, y una dosis de un anticuerpo anti-CTLA-4, por ejemplo, ipilimumab, de aproximadamente 3 mg/kg.

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con antagonistas de la via de PD-1. En algunas modalidades, la combinación se utiliza para tratar un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. PD-1 es otro regulador negativo de la respuesta inmunitaria adaptativa que se expresa en linfocitos T activados. PD-1 se une a B7-H1 y B7-DC, y la participación de PD-1 suprime la activación de linfocitos T. Se han demostrado efectos antitumorales con el bloqueo de la vía PD-1. Las moléculas de anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, Nivolumab

(Opdivo™), pembrolizumab (Keytruda™) y pidilizumab) y AMP-224 han sido registradas en la literatura como ejemplos de bloqueadores de la vía PD-1, que pueden ser útiles en la presente invención. En algunas modalidades, el antagonista de la vía PD-1 es una molécula de anticuerpo anti-PD-1 seleccionada del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab o pidilizumab.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab. Los nombres alternativos para nivolumab incluyen MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538, o BMS-936558. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (Número de Registro CAS: 946414-94-4). Nivolumab es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que específicamente bloquea PD1. Nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD1 se describen en Estados Unidos 8,008,449 y WO2006/121168. En una modalidad, el inhibidor de PD-1 es nivolumab, y que tiene una secuencia descrita en la presente (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a esta, por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % idéntica o superior a la secuencia especificada).

La secuencia de aminoácidos de cadena pesada de nivolumab es como sigue:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYA

DSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 2)

La secuencia de aminoácidos de cadena ligera de nivolumab es como sigue:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3)

En otras modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab. Pembrolizumab (también conocido como lambrolizumab, MK-3475, MK03475, SCH-900475 o KEYTRUDA®; Merck) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD-1. Pembrolizumab y otros anticuerpos anti-PD-1 humanizados se describen en Hamid, O. *et ál.* (2013) *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134-44, US 8,354,509 y WO2009/114335. En una modalidad, el inhibidor de PD-1 es pembrolizumab, y que tiene una secuencia descrita en la presente (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a esta, por ejemplo, una secuencia al menos

85 %, 90 %, 95 % idéntica o superior a la secuencia especificada).

La secuencia de aminoácidos de cadena pesada de pembrolizumab es como sigue:

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG 50
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD 100
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK 150
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT 200
YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT 250
LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT 350
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS 400
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK 447
(SEC ID NO: 4)

La secuencia de aminoácidos de cadena ligera de pembrolizumab es como sigue:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL 50
LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL 100
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV 150
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV 200
THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEC ID NO: 5) 218

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es pidilizumab. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal IgG1k humanizado que se une a PD-1. Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humanizados se describen en WO2009/101611.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es AMP 514 (Amplimmune), o un anticuerpo anti-PD-1 como se describe en la patente de Estados Unidos 8,609,089, la patente de Estados Unidos 2010028330 y/o la patente de Estados Unidos 20120114649.

En algunas modalidades, el antagonista de la vía PD-1 es una molécula de anticuerpo anti-PD-1 descrita en la patente de Estados Unidos 2015/0210769, publicada el 30 de julio de 2015, titulada "Antibody Molecules to PD-1 and Uses Thereof ".

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye al menos uno o dos dominios variables de cadena pesada (que incluyen opcionalmente una región constante), al menos uno o dos dominios variables de cadena ligera (que incluyen opcionalmente una región constante), o ambos, que comprende la secuencia de aminoácidos de BAP049-Clon-A, BAP049-Clon-B, BAP049-Clon-C, BAP049-Clon-D, o BAP049-Clon-E; o como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769, o codificado por la secuencia de nucleótidos en la Tabla 1 en allí; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98

%, 99 % o más idéntica) a cualquiera de las secuencias anteriormente mencionadas. La molécula de anticuerpo anti-PD-1, opcionalmente, comprende una secuencia líder a partir de una cadena pesada, una cadena ligera, o ambas, como se muestra en la Tabla 4 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769; o una secuencia sustancialmente idéntica a esta. La descripción de la patente de Estodos Unidos 2015/0210769 se incorpora en la presente como referencia, ya que se refiere a las secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos de la Tabla 4 de esta.

En aún otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye al menos una, dos o tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo descrito en la patente de Estados Unidos 2015/0210769, por ejemplo, un anticuerpo seleccionado de entre cualquiera de BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clon-A, BAP049-Clon-B, BAP049-Clon-C, BAP049-Clon-D, o BAP049-Clon-E; o como se describe en la Tabla 1, o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1 de esta; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80

%, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica) a cualquiera de las secuencias anteriormente mencionadas.

En aún otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye al menos una, dos o tres CDR (o, en conjunto, todas las CDR) de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1 allí. En una modalidad, una o más de las CDR (o, en conjunto, todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con relación a la secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1 allí.

En aún otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye al menos una, dos o tres CDR (o, en conjunto, todas las CDR) de una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1. En una modalidad, una o más de las CDR (o, en conjunto, todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones

o eliminaciones de aminoácidos, con relación a la secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1 allí. En determinadas modalides, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye una sustitución en una CDR de cadena ligera, por ejemplo, una o más sustituciones en una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera. En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye una sustitución en la CDR3 de cadena ligera en la posición 102 de la región variable ligera, por ejemplo, una sustitución de una cisteína a tirosina o un residuo de cisteína a serina, en la posición 102 de la región variable ligera de acuerdo con la Tabla 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 16 o 24 para la secuencia murina o quimérica, no modificada; o cualquiera de las SEQ ID NO: 34, 42, 46, 54, 58, 62, 66, 70, 74 o 78 para una secuencia modificada).

En otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDR (o, en conjunto, todas las CDR) de una región variable de cadena pesada y ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra que se muestra en la Tabla 1 allí. En una modalidad, una o más de las CDR (o, en conjunto, todas

las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con relación a la secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestraque se muestra en la Tabla 1 allí.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye: (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos VHCDR1 de la SEQ ID NO: 4, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 3; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 13, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 14 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 33, cada una como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769; (b) una VH que comprende una secuencia de amino ácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 3, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 10, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 32, cada una

como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769; (c) una VH que comprende una secuencia de aminoácidos VHCDR1 de la SEQ ID NO: 224, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 5 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 3, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 13, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 14 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 33, cada una como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769; (d) una VH que comprende una secuencia de aminoácidos VHCDR1 de la SEQ ID NO: 224, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 3, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 10, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 32, cada una como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769.

En otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD1 comprende (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 224; una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEC ID NO: 3; y (ii) una

región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 13, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 14 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la

SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33, cada una como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0210769.

En algunas modalidades, el antagonista de la vía PD-1 es una inmunoadhesina (por ejemplo, una inmunoadhesina que comprende una parte de unión extracelular o PD-1 de PD-Ll o PD-L2) fusionada a una región constante (por ejemplo, una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina). En algunas modalidades, el inhibidor de PD-1 es AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; por ejemplo, descrito en WO2010/027827 y WO2011/066342), es un receptor soluble de fusión de PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD-1 y B7-H1.

En algunas modalidades, el antagonista de vía de PD-1 es un inhibidor de PD-L1 o PD-L2. En algunas modalidades, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 es un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-L2. En algunas modalidades, el inhibidor de anti-PD-Ll se selecciona de YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C o MDX-1105. En algunas modalidades, el inhibidor de PD-Ll es un anticuerpo anti-PD-Ll MSB0010718C.

MSB0010718C (también conocido como A09-246-2; Merck Serono) es un anticuerpo monoclonal que se une a PD-L1. MSB0010718C y otros anticuerpos anti-PD-L1 humanizados se describen en WO2013/079174, y tienen una secuencia que se describe en esta (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a esta,

por ejemplo, una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % idéntica o superior a la secuencia especificada).

La secuencia de de aminoácidos de cadena pesada (SEQ ID NO: 24 como se describe en WO2013/079174) de MSB0010718C incluye al menos lo siguiente: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYA DKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

La secuencia de aminoácidos de cadena ligera (SEQ ID NO: 25 como se describe en el documento WO2013/079174) de MSB0010718C incluye al menos lo siguiente: QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL (SEC ID NO: 7)

En una modalidad, el inhibidor de PD-1 es YW243.55.S70. El anticuerpo YW243.55.S70 es un anticuerpo anti-PD-Ll como se describe en el documento WO 2010/077634 (secuencias de región variable de cadena pesada y ligera que se muestraque se

muestran en las SEQ ID N.° 20 y 21, respectivamente), y que tienen una secuencia descrita en este (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a esta, *por ejemplo,* una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % idéntica o superior a la secuencia especificada).

En una modalidad, el inhibidor de PD-L1 es MDX-1105. MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-Ll descrito en WO2007/005874, y que tiene una secuencia descrita en esta (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a esta, *por ejemplo.,* una secuencia al menos 85 %, 90 %, 95 % idéntica o superior a la secuencia especificada).

En una modalidad, el inhibidor de PD-L1 es MDPL3280A (Genentech / Roche). MPDL3280A es un anticuerpo monoclonal IgG1 Fc humano optimizado que se une a PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen a PD-L1 se describen en la patente de Estados Unidos N.°: 7,943,743 y en la Publicación de Estados Unidos N.° 20120039906.

En otras modalidades, el inhibidor de PD-L2 es AMP-224. AMP-224 es un receptor soluble de fusión PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD1 y B7-H1 (B7-DCIg; Amplimmune; por ejemplo., descrito en WO2010/027827 y WO2011/066342.

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con antagonistas de la via

de TIM-3. En algunas modalidades, la combinación se utiliza para tratar un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, el antagonista de la vía TIM-3 es un anticuerpo anti-TIM-3. En algunas modalidades, las moléculas de anticuerpo anti-TIM-3 se describen en la patente de Estados Unidos 2015/0218274, publicado el 6 de agosto de 2015, titulado " Antibody Molecules to TIM-3 and Uses Thereof ".

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos uno o dos dominios variables de cadena pesada (que incluyen opcionalmente una región constante), al menos uno o dos dominios variables de cadena ligera (que incluyen opcionalmente una región constante), o ambos, que comprende la secuencia de aminoácidos de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3- hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos 2015/0218274; o codificada por la secuencia de nucleótidos de las Tablas 1-4 de este; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica) a cualquiera

de las secuencias anteriormente mencionadas. La molécula de anticuerpo anti-TIM-3, opcionalmente, comprende una secuencia líder a partir de una cadena pesada, una cadena ligera, o ambas, como se muestra en la patente de Estados Unidos 2015/0218274; o una secuencia sustancialmente idéntica a esta. La descripción de la patente de Estados Unidos 2015/0218274 se incorpora a la presente como referencia, ya que se refiere a las secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos de las Tablas 1-4 de este.

En aún otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos una, dos o tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo descrito en la patente de Estados Unidos 2015/0218274, por ejemplo, un anticuerpo seleccionado de cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3- hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos 2015/0218274; o codificado por la secuencia de nucleótidos de las Tablas 1-4 de este; o una secuencia sustancialmente idéntica (por

ejemplo., al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica) a cualquiera de las secuencias anteriormente mencionadas.

En aún otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos una, dos o tres CDR (o, en conjunto, todas las CDR) de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos2015/0218274, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestraque se muestra en las Tablas 1-4 en este. En una modalidad, una o más de las CDR (o, en conjunto,todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con relación a la secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en las Tablas 1-4 en este, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestraque se muestra en las Tablas 1-4 allí.

En aún otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos una, dos o tres CDR (o, en conjunto, todas las CDR) de una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos 2015/0218274, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestraque se muestra en las Tablas 1-4 en este. En una modalidad, una o

más de las CDR (o, en conjunto, todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con relación a la secuencia de aminoácidos que se muestraque se muestra en las Tablas 1-4 en este, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestraque se muestra en las Tablas 1-4 allí. En determinadas modalides, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye una sustitución en una CDR de cadena ligera, por ejemplo, una o más sustituciones en una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera.

En otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDR (o, en conjunto, todas las CDR) de una región variable de cadena pesada y ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos 2015/0218274, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra en las Tablas 1-4 allí. En una modalidad, una o más de las CDR (o, en conjunto, todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con relación a la secuencia de aminoácidos que se muestra en las Tablas 1-4 allí, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra en las Tablas 1-4 allí.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-TIM-3 incluye: (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 9; una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 5; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 12, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 13 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 14, cada una como se describe en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos 2015/0218274; (b) una VH que comprende una secuencia de amino ácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 3, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 4 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 5, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 8, cada una como se describe en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos 2015/0218274; (c) una VH que comprende una secuencia de amino ácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 9, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 5, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 12, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO:

13 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 14, cada una como se describe en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos 2015/0218274; (d) una VH que comprende una secuencia de amino ácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 3, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 24 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 5, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 8, cada una como se describe en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos 2015/0218274; (e) una VH que comprende una secuencia de amino ácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 9, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 31 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 5, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 12, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 13 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 14, cada una como se describe en las Tablas 1-4 dla patente de Estados Unidos 2015/0218274; o (f) una VH que comprende una secuencia de amino ácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 3, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 30 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 5, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos VLCDR1 de la SEQ ID NO: 6, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO:

7 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 8, cada una como se describe en las Tablas 1-4 de la patente de Estados Unidos 2015/0218274.

En algunas modalidades, el antagonista de la vía TIM-3 es un anticuerpo anti-TIM-3 tal como se describe en la patente de Estados Unidos N.° 8,552,156, WO 2011/155607, EP 2581113 o en la Publicación de Estados Unidos N.° 2014/044728.

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con antagonistas de la via de LAG-3. En algunas modalidades, la combinación se utiliza para tratar un tumor sólido o una neoplasiamaligna hematológica. En algunas modalidades, el antagonista de la vía LAG-3 es un anticuerpo anti-LAG-3. En algunas modalidades, las moléculas de anticuerpo anti-LAG-3 se describen en la patente de Estados Unidos 2015/0259420, publicado el 13 de marzo de 2015, titulado "Antibody Molecules to LAG-3 and Uses Thereof ".

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 incluye al menos uno o dos dominios variables de cadena pesada (que incluyen opcionalmente una región constante), al menos uno o dos dominios variables de cadena ligera (que incluyen opcionalmente una región constante) , o ambos, que comprende la secuencia de aminoácidos de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06,

BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050- hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050 (Ser) *(por ejemplo,* BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04 -Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser , BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser, o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050-Clon-H, BAP050-Clon-I, o BAP050-Clon-J; o como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420, o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1 de este; o una secuencia sustancialmente idéntica *(por ejemplo,* al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica) a cualquiera de las secuencias anteriormente mencionadas. La descripción de la patente de Estados Unidos 2015/0259420 se incorpora en la presente como referencia, ya que se refiere a las secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos de la Tabla 1 de este.

En aún otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 incluy al menos una, dos o tres regiones determinates de complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo

descrito en la presente, *por ejemplo.,* un anticuerpo seleccionado entre cualquiera de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03 , BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050 -hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050 (Ser) *(por ejemplo,* BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050- hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser, o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050- Clon-H, BAP050-Clon-I, o BAP050-Clone-J; o como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420 o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1 de este; o una secuencia sustancialmente idéntica *(por ejemplo,* al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica) a cualquiera de las secuencias anteriormente mencionadas.

En aún otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 incluye al menos una, dos, o tres CDR (o, en conjunto, todas las CDR) de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 1 de

la patente de Estados Unidos 2015/0259420, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Tabla 1 de este. En una modalidad, una o más de las CDR (o, en conjunto, todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con relación a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 1 de este, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Tabla 1 de este.

En aún otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 incluye al menos una, dos, o tres CDR (o, en conjunto, todas las CDR) de una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Tabla 1 de este. En una modalidad, una o más de las CDR (o, en conjunto, todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con relación a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 1 de este, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Tabla 1 de este. En determinadas modalides, la molécula de anticuerpo anti-PD-L1 incluye una sustitución en una CDR de cadena ligera, por ejemplo, una o más sustituciones en una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera.

En otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDR (o, en conjunto, todas las CDR) de una región variable de cadena pesada y ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Tabla 1 de este. En una modalidad, una o más de las CDR (o, en conjunto, todas las CDR) tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios, por ejemplo, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, con relación a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 1 de este, o codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Tabla 1 de este.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 incluye: (i) una región variable de cadena pesada (VH) que incluye una secuencia de aminoácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 286, una secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 3, cada una como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420; y (ii) una región variable de cadena ligera (VL) que incluye una secuencia de aminoácidos de VLCDR1 de la SEQ ID NO: 10, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 12, cada una como se

describe en la Tabla 1 dla patente de Estados Unidos 2015/0259420.

En otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 incluye: (i) una región variable de cadena pesada (VH) que incluye una secuencia de aminoácidos VHCDR1 seleccionada de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 286 y la secuencia de aminoácidos VHCDR2 de la SEQ ID NO: 5 y una secuencia de aminoácidos VHCDR3 de la SEQ ID NO: 3, cada una como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420; y (ii) una región variable de cadena ligera (VL) que incluye una secuencia de aminoácidos de VLCDR1 de la SEQ ID NO: 13, una secuencia de aminoácidos VLCDR2 de la SEQ ID NO: 14 y una secuencia de aminoácidos VLCDR3 de la SEQ ID NO: 15, cada una como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420.

En una modalidad, la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 comprende la secuencia de aminoácidos VHCDR1 de la SEQ ID NO: 1 como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420. En otra modalidad, la molecula de anticuerpo anti-LAG-3 comprende la secuencia de aminoácidos VHCDR1 de la SEQ ID NO: 4, como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420. En aún otra modalidad, la molecula de anticuerpo anti-LAG-3 comprende la secuencia de aminoácidos VHCDR1 de la SEQ ID NO: 286, como se

describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 2015/0259420.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-LAG-3 es BMS-986016. BMS-986016 (también conocido como BMS986016; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo monoclonal que se une a LAG-3. BMS-986016 y otros anticuerpos anti-LAG-3 humanizados se describen en la patente de Estados Unidos 2011/0150892, WO2010/019570 y WO2014/008218.

Agonistas de Receptores de linfocitos T

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con un agonista del receptor de linfocitos T, tal como un agonista CD28, un agonista OX40, un agonista GITR, un agonista CD137, un agonista CD27 o un agonista HVEM.

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con un agonista CD27. Los ejemplos de agonistas CD27 incluyen un anticuerpo agonista anti-CD27, por ejemplo, como se describe en la Publicación PCT N.° WO 2012/004367.

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con un agonista GITR. En algunas modalidades, la combinación se utiliza para tratar un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. Los

ejemplos de agonistas GITR incluyen, *por ejemplo.*, proteínas de fusión GITR y anticuerpos anti-GITR (por ejemplo, anticuerpos anti-GITR bivalentes), tales como, una proteína de fusión GITR descrita en la patente de Estados Unidos N.° 6,111,090, la Patente Europea N.° 0920505B1, la Patente de Estados Unidos N.° 8,586,023, las Publicaciones PCT N.° WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-GITR descrito, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.° 7,025,962, la Patente Europea N.° 1947183B1, la Patente de Estados Unidos N.° 7,812,135, la Patente de Estados Unidos N.° 8,388,967, la Patente de Estados Unidos N.° 8,591,886, la Patente Europea N.° EP 1866339, la Publicación PCT N.° WO 2011/028683, la Patentes de Estados Unidos N.° 8,709,424, la Publicación PCT N.° WO 2013/039954, la Publicación Internacional N.° WO2013/039954, la Publicación de Estados Unidos N.° US2014/0072566, la Publicación Internacional N.° WO2015/026684, la Publicación PCT N.° WO2005/007190, la Publicación PCT N.° WO 2007/133822, la Publicación PCT N.° WO2005/055808, la Publicación PCT N.° WO 99/40196, la Publicación PCT N.° WO 2001/03720, la Publicación PCT N.° WO99/20758, la Patente de Estados Unidos N.° 6.689.607, la Publicación PCT N.° WO2006/083289, la Publicación PCT N.° WO 2005/115451, la Patente de Estados Unidos N.° 7.618.632, la Publicación PCT N.° WO 2011/051726, la Publicación

Internacional N.° WO2004060319 y la Publicación Internacional N.° WO2014012479.

En una modalidad, los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se utilizan junto con un agonista GITR utilizado junto con un inhibidor de PD-1, por ejemplo, como se describe en WO2015/026684.

En otra modalidad, los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se utilizan junto con un agonista GITR utilizado junto con un inhibidor TLR, *por ejemplo,* como se describe en WO2004060319, y en la Publicación Internacional N.° WO2014012479.

Agonistas TLR

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con un agonista del receptor tipo Toll. La expresión "receptor tipo Toll" (o "TLR") tal como se utiliza en la presente se refiere a un miembro de la familia de proteínas de receptores tipo Toll o un fragmento de esta que detecta un producto microbiano y/o inicia una respuesta inmunitaria adaptativa. En una modalidad, un TLR activa una célula dendrítica (DC). Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de receptores de reconocimiento de patrones que se identificaron inicialmente como sensores del sistema inmunitario innato que reconocen patógenos

microbianos. Los TLR comprenden una familia de moléculas conservadas que atraviesan la membrana que contienen un ectodominio de repeticiones ricas en leucina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular TIR (Toll / IL-1R). Los TLR reconocen estructuras distintas en los microbios, a menudo llamados "PAMP" (patrones moleculares asociados patógenos). La unión de ligandos a TLR invoca una cascada de vías de señalización intracelulares que inducen la producción de factores que intervienen en la inflamación y inmunidad.

En humanos, se han identificado diez TLR. Los TLR que se expresan en la superficie de las células incluyen TLR-1, -2, -4, -5, y -6, mientras que TLR-3, -7/8, y -9 se expresan con el compartimento de ER. Los subconjuntos de células dendríticas humanas se pueden identificar sobre la base de distintos patrones de expresión de TLR. A modo de ejemplo, el subconjunto mieloide o "convencional" de DC (mDC) expresa TLR 1-8 cuando es estimulado, y se producen una cascada de marcadores de activación (por ejemplo, CD80, CD86, MHC de clase I y II, CCR7), citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas. Un resultado de esta estimulación y expresión resultante es el cebado de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos del antígeno. Estos DC adquieren una mejor capacidad para absorber antígenos y presentarlos en forma apropiada a los linfocitos T. Por el contrario, el subconjunto plasmocitoide de DC (pDC) expresa

solamente TLR7 y TLR9 tras la activación, con una activación resultante de linfocitos NK, así como linfocitos T. Dado que la muerte de las células tumorales puede afectar negativamente la función de DC, se ha sugerido que la activación de DC con los agonistas de TLR puede ser beneficioso para el aumento de la inmunidad anti-tumoral en un enfoque de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer. También se ha sugerido que el tratamiento exitoso del cáncer de mama utilizando radiación y quimioterapia requiere la activación de TLR4.

Los agonistas TLR conocidos en la técnica y que son útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

Pam3Cys, un agonista de TLR-1/2;

CFA, un agonista de TLR-2;

MALP2, un agonista de TLR-2;

Pam2Cys, un agonista de TLR-2;

FSL-1, un agonista de TLR-2;

Hib-OMPC, un agonista de TLR-2;

ácido polirribosínico:polirribocitídico (Poli I:C), un agonista de TLR-3;

ácido poliadenosina-poliuridílico (poli AU), un agonista de TLR-3;

ácido poliinosínico-policitidílico estabilizado con poli-L-lisina y carboximetilcelulosa (Hiltonol®), un agonista de TLR-3;

lípido de monofosforilo A (MPL), un agonista de TLR-4;

LPS, un agonista de TLR-4;

flagelina bacteriana, un agonista de TLR-5;

sialil-Tn (STn), un carbohidrato asociado a la mucina MUC1 en una cantidadde células de cáncer humano y un agonista de TLR-4;

imiquimod, un agonista de TLR-7;

resiquimod, un agonista TLR-7/8;

loxoribina, un agonista de TLR-7/8; y

dinucleótido CpG no metilado (CpG-ODN), un agonista de TLR-9.

Debido a sus cualidades adyuvantes, los agonistas de TLR se utilizan preferiblemente junto con otras vacunas, adyuvantes y/o inmunomoduladores, y pueden combinarse en varias combinaciones. Por lo tanto, en determinadas modalidades, los compuestos mono- o di-F-CDN que se unen a STING e inducen la activación de TBK1 dependiente de STING y una célula tumoral inactivada que expresa y secreta una o más citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas, como se describe en la presente, pueden administrarse junto con uno o más agonistas de TLR con fines terapéuticos.

Terapia de Anticuerpo

Los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se pueden utilizar junto con anticuerpos terapéuticos. En algunas modalidades, el mecanismo de acción del anticuerpo terapéutico es citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). ADCC es un un mecanismo de defensa inmunitaria mediada por células mediante el cual una célula efectora del sistema inmunitario lisa activamente una célula diana, cuyos antígenos en la superficie de la membrana se han unido a anticuerpos específicos. Es uno de los mecanismos mediante los cuales los anticuerpos, como parte de la respuesta inmunitaria humoral, pueden actuar para limitar y contener la infección. La ADCC clásica es mediada por linfocitos citolíticos naturales (NK); los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos también pueden mediar la ADCC. La ADCC es un mecanismo de acción importante de los anticuerpos monoclonales terapéuticos, incluyendo trastuzumab y rituximab, contra tumores. Los compuestos de la presente invención pueden actuar para potenciar la ADCC.

A continuación, se proporciona una lista de ejemplos de anticuerpos que pueden usarse junto con los compuestos mono- o di-F-CDN de la presente invención.

Muromonab-CD3: Se utiliza para prevenir el rechazo agudo de trasplantes de órganos, por ejemplo, riñón. Las versiones humanizadas son prometedoras para la inhibición de la destrucción autoinmune de las células beta en la diabetes mellitus tipo 1.

Infliximab (Remicade®) y adalimumab (Humira®): Se une al factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). Se utilizan en algunas enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn.

Omalizumab (Xolair®). Se une a IgE evitando así la unión de IgE a los mastocitos. Se utiliza contra el asma alérgica.

Daclizumab (Zenapax®). Se une a una parte del receptor de IL-2 expuesta en la superficie de linfocitos T activados. Se utiliza para prevenir el rechazo agudo de riñones trasplantados.

Rituximab (Rituxan® = nombre comercial). Se une a la molécula CD20 que se encuentra en la mayoría de los linfocitos B y se usa para el tratamiento de linfomas de linfocitos B.

Ibritumomab (nombre comercial = Zevalin®). Este es un anticuerpo monoclonal contra la molécula CD20 en los linfocitos B (y linfomas) conjugados con isótopos. Se suministra al paciente con linfoma complementado con Rituxan.

Tositumomab (Bexxar®). Este es un conjugado de un anticuerpo monoclonal contra CD20 y el isótopo radiactivo yodo-131 (131I).

Cetuximab (Erbitux®). Bloquea HER1, un receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) que se encuentra en algunas células tumorales (algunos cánceres de mama, linfomas).

Trastuzumab (Herceptin®). Bloquea HER2, un receptor del factor de crecimiento sobreexpresado en alrededor del 20 % de los cánceres de mama.

Adcetris®. Un conjugado de un anticuerpo monoclonal que se une a CD30, una molécula de superficie celular expresada por las células de algunos linfomas, pero no encontrada en las células madre normales necesarias para repoblar la médula ósea.

Alemtuzumab (Campath-1H®). Se une a CD52, una molécula encontrada en linfocitos y que agota tanto los linfocitos T como B. Ha producido una remisión completa de leucemia linfocítica crónica y es prometedor en la prevención del rechazo de trasplantes de riñón.

Lym-1 (Oncolym®). Se une al antígeno de histocompatibilidad codificado por HLA-DR que puede ser expresado en niveles elevados en células de linfoma.

Ipilimumab (Yervoy®) que actúa para mejorar la respuesta inmunitaria propia del cuerpo frente a los tumores.

Vitaxin. Se une a una integrina vascular (alfa-v/beta-3) que se encuentra en los vasos sanguíneos de tumores, pero no en los vasos sanguíneos que irrigan los tejidos normales. En ensayos clínicos de fase II, Vitaxin ha mostrado ser prometedor

en alguna medida en la reducción de tumores sólidos, sin efectos secundarios dañinos.

Bevacizumab (Avastin®). Se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que evita que se una a su receptor. Utilizado para el tratamiento de cánceres colorrectales.

Abciximab (ReoPro®). Inhibe la agregación de las plaquetas mediante la unión a los receptores en su superficie, que normalmente están unidos mediante fibrinógeno. Útil en la prevención de la reobstrucción de las arterias coronarias en pacientes que han sido sometidos a angioplastia.

Los anticuerpos terapéuticos adicionales que pueden utilizarse junto con los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente incluyen un inhibidor del receptor de prolactina (PRLR), *por ejemplo,* como se describe en la patente de Estados Unidos 7,867,493, un inhibidor de HER3, *por ejemplo,* como se describe en la Publicación PCT N.° WO 2012/022814, un inhibidor de EGFR2 y/o EGFR4, *por ejemplo,* como se describe en la publicación PCT N.° WO 2014/160160, un inhibidor de M-CSF, *por ejemplo,* como se describe en la publicación PCT N.° WO 2004/045532, un anticuerpo anti-APRIL, *por ejemplo,* como se describe en la patente de Estados Unidos 8.895.705, o un anticuerpo anti-SIRPα o anti-CD47, *por ejemplo,* como se describe en la patente de Estados Unidos 8.728.476 y la patente de Estados Unidos 8.562.997.

En una modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor del receptor de prolactina (PRLR), una molécula de anticuerpo monoclonal humano (Compuesto A26) como se describe en la patente de Estados Unidos 7,867,493), para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de PRLR es un anticuerpo monoclonal humano (Compuesto A26) que se describe en la patente de Estados Unidos 7.867.493. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se utiliza junto con la molécula de anticuerpo monoclonal humano (Compuesto A26) que se describe en la patente de Estados Unidos 7.867.493 para el tratamiento de un trastorno, tal como, un cáncer, un cáncer de próstata, o un cáncer de mama.

En otra modalidd, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de HER3, Compuesto A31, o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2012/022814, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de HER3 es el Compuesto A31 o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2012/022814. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se utiliza junto con el Compuesto A31, o un compuesto descrito en la Publicación PCT WO

2012/022814, para tratar un trastorno tal como un cáncer gástrico, un cáncer de esófago, un cáncer de cabeza y cuello, un carcinoma de células escamosas, un cáncer de estómago, un cáncer de mama (por ejemplo, un cáncer de mama metastásico), o un cáncer digestivo/gastrointestinal. En algunas modalidades, el Compuesto A31 es una molécula de anticuerpo monoclonal humano. En una modalidad, el inhibidor de HER3 o el Compuesto A31 se administra a una dosis de aproximadamente 3, 10, 20 o 40 mg/kg, por ejemplo, una vez por semana (QW). En una modalidad, el compuesto se administra en una dosis de aproximadamente 3-10, 10-20 o 20-40 mg/kg.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de FGFR2 y/o FGFR4, Compuesto A32, o un compuesto descrito en una publicación PCT N.° WO 2014/160160 (por ejemplo, un conjugado de molécula de anticuerpo con fármaco contra un FGFR2 y/o FGFR4, por ejemplo, mAb 12425 como se describe en esta), para tratar un trastorno, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de FGFR2 y/o FGFR4 es el Compuesto A32 o un compuesto descrito en una publicación PCT No. WO 2014/160160. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se utiliza junto con el Compuesto A32, o una combinación adicional con un compuesto como se describe en la

Tabla 2, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un cáncer gástrico, un cáncer de mama, un rabdomiosarcoma, un cáncer de hígado, un cáncer suprarrenal, un cáncer de pulmón, un cáncer de esófago, un cáncer de colon, o un cáncer de endometrio. En algunas modalidades, el Compuesto A32 es un conjugado de molécula de anticuerpo con fármaco contra un FGFR2 y/o FGFR4, por ejemplo, mAb 12425.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de M-CSF, Compuesto A33, o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2004/045532, (*por ejemplo,* una molécula de anticuerpo o fragmento Fab contra M-CSF), para tratar un trastorno, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de M-CSF es el Compuesto A33 o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2004/045532. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con el Compuesto A33, o un compuesto como se describe en la Publicación PCT N.| WO 2004/045532, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, o sinovitis vellonodular pigmentada (PVNS). En algunas modalidades, el Compuesto A33 es una molécula de anticuerpo monoclonal contra M-CSF o un fragmento (por ejemplo, fragmento Fab) de esta. En algunas modalidades, el inhibidor de M-CSF o

el Compuesto A33 se administra a una dosis media de aproximadamente 10 mg/kg.

Agentes de administración

Los liposomas son vesículas formadas a partir de una ("unilamelares") o más ("multilamelares") capas de fosfolípido. Debido al carácter anfipático de los bloques fundamentales de fosfolípidos, los liposomas comúnmente comprenden una capa hidrofílica que presenta una cara externa hidrofílica y que encierra un núcleo hidrofílico. La versatilidad de los liposomas en la incorporación de componentes hidrofílicos/hidrofóbicos, su naturaleza no tóxica, biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad adyuvante, inducción de inmunidad celular, propiedad de liberación sostenida y absorción rápida mediante macrófagos, los convierte en candidatos atractivos para la administración de antígenos.

WO2010/104833, describe preparaciones liposomales adecuadas. Tales formulaciones liposomales, denominadas en la presente VesiVax® (Molecular Express, Inc.), con o sin el/los "polipéptido/s o carbohidrato/s inmunogénico/s" mencionado/s anteriormente, pueden contener uno o más componentes adicionales tales como peptidoglicano, lipopéptido, lipopolisacárido, lípido de monofosforilo A, ácido

lipoteicoico, resiquimod, imiquimod, flagelina, oligonucleótidos que contienen motivos CpG no metilados, beta-galactosilceramida, dipéptido de muramilo, ácido trans retinoico, ARN viral de cadena doble, proteínas de choque térmico, bromuro de dioctadecildimetilamonio, tensioactivos catiónicos, agonistas de receptores tipo Toll, propano de dimiristoiltrimetilamonio, y agonistas de los receptores tipo NOD. Ventajosamente, estas formulaciones liposomales se pueden utilizar para suministrar uno o más compuestos mono- o di-F-CDN y composiciones de estos descritos en la presente de acuerdo con la presente invención.

Por otra parte, mientras que las formulaciones liposómicas descritas anteriormente emplean un "derivado de esteroide" como un ancla para la fijación de un polipéptido o carbohidrato inmunogénico a un liposoma, el esteroide puede simplemente ser proporcionado como un esteroide no conjugado como colesterol.

Los métodos adecuados para preparar liposomas a partir de mezclas de lípidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Basu y Basu, Liposome Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press., 2002; Gregoriadis, Liposome Technology, 3ª Edición, Informa Healthcare, 2006. Los métodos preferidos incluyen métodos de extrusión, homogeneización y sonicación descritos allí. Un ejemplo de método para la preparación de liposomas para su uso

en la presente invención, que comprende el secado de una mezcla de lípidos, seguido de hidratación en un vehículo acuoso y sonicación para formar liposomas, se describe en WO2010/104833. En determinadas modalidades, los liposomas se proporcionan dentro de un intervalo de tamaño promedio particular. El tamaño de los liposomas se puede seleccionar, por ejemplo, por extrusión de un vehículo acuoso que comprende liposomas a través de membranas que tienen un tamaño de poro preseleccionado y que recolectan el material que fluye a través de la membrana. En modalidades preferidas, los liposomas se seleccionan para que sean sustancialmente de entre 50 y 500 nm de diámetro, más preferiblemente sustancialmente entre 50 y 200 nm de diámetro, y más preferiblemente sustancialmente entre 50 y 150 nm de diámetro. El término "sustancialmente", tal como se utiliza en la presente, en este contexto significa que al menos 75 %, más preferiblemente 80 %, y más preferiblemente al menos 90 % de los liposomas están dentro del rango designado. Otros adyuvantes lipídicos y similares a lípidos que pueden ser útiles en la presente invención incluyen emulsiones de aceite en agua (o/w) (véase, por ejemplo, Muderhwa et ál., J. Pharmaceut. Sci. 88: 1332-9, 1999)), VesiVax® TLR (Molecular Express, Inc.), digitonina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.698.432), y lípidos de glucopiranosilo (véase,

por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20100310602).

Las nanopartículas también representan los sistemas de administración de fármacos adecuados para la mayoría de las vías de administración. A través de los años, una variedad de polímeros naturales y sintéticos se han explorado para la preparación de nanopartículas, de los cuales poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros (PLGA) se han investigado ampliamente debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Las nanopartículas y otros nanoportadores actúan como portadores potenciales para varias clases de fármacos tales como agentes anticancerígenos, agentes antihipertensivos, inmunomoduladores, y hormonas; y macromoléculas tales como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, y anticuerpos. Véase, por ejemplo, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 21:387-422, 2004; Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 1:22-30, 2005.

Agentes quimioterapéuticos

En modalidades adicionales de los métodos descritos en la presente, los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se utilizan junto con agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, compuestos farmacéuticos de moléculas pequeñas). Por lo tanto, los métodos adicionales implican la

administración al sujeto de una cantidad eficaz de uno o más agentes quimioterapéuticos como un tratamiento adicional o un tratamiento de combinación. En determinadas modalidades, uno o más agentes quimioterapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en acetato de abiraterona, altretamina, anhidrovinblastina, auristatina, bexaroteno, bicalutamida, BMS 184476, sulfonamida de 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-metoxifenil)benceno, bleomicina, N,N-dimetil-L-valil-L-valil-N-metil-L-valil-L-proli-1-Lprolina-t-butilamida, caquectina, cemadotina, clorambucilo, ciclofosfamida, 3',4'-dideshidro-4' desoxi-8'-norvin-caleucoblastina, docetaxol, doxetaxel, ciclofosfamida, carboplatino, carmustina, cisplatino, criptoficina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, daunorubicina, decitabina dolastatina, doxorrubicina (adriamicina), etopósido, 5-fluorouracilo, finasterida, flutamida, hidroxiurea e hidroxiureataxanos, ifosfamida, liarozol, lonidamina, lomustina (CCNU), enzalutamida, mecloretamina (mostaza nitrogenada), melfalán, isetionato de mivobulina, rizoxina, sertenef, estreptozocina, mitomicina, metotrexato, taxanos, nilutamida, onapristona, paclitaxel, prednimustina, procarbazina, RPR109881, fosfato estramustina, tamoxifeno, tasonermina, taxol, tretinoína, vinblastina, vincristina, sulfato de vindesina y vinflunina.

En modalidades adicionales de los métodos descritos en la presente, los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se utilizan junto con agentes quimioterapéuticos y/o agentes adicionales para el tratamiento de las indicaciones como se describe en los métodos de la presente. En algunas modalidades, los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente se utilizan junto con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en sotrastaurina, nilotinib, 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-N-etil-4-(4-(morfolinometil)fenil)isoxazol-3-carboxamida, dactolisib, 8-(6-metoxi-piridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-fenil)-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, 3-(2,6-dicloro-3,5-dimetoxifenil)-1-(6-((4-(4-etilpiperazin-1-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-1-metilurea, buparlisib, 8-(2,6-difluoro-3,5-dimetoxifenil)-N-(4-((dimetilamino)metil)-1H-imidazol-2-il)quinoxalina-5-carboxamida, (S)-N1-(4-metil-5-(2-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)piridin-4-il)tiazol-2-il)pirrolidina-1,2-dicarboxamida, (S)-1-(4-clorofenil)-7-isopropoxi-6-metoxi-2-(4-(metil(((1r,4S)-4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil)metil)amino)fenil)-1,2-dihidroisoquinolin-3(4H)-ona, deferasirox, letrozol, (4S,5R)-3-(2'-amino-2-morfolino-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-(hidroximetil)-5-metiloxazolidin-2-ona, (S)-5-(5-cloro-1-

metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)-1-isopropil-5,6-dihidropirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona, 4-((2-(((1R, 2R)-2-hidroxiciclohexil)amino)benzo[d]tiazol-6-il)oxi)-N-metilpicolinamida, mesilato de imatinib, 2-fluoro-N-metil-4-(7-(quinolin-6-ilmetil)imidazo[1,2-b][1,2,4]triazin-2-il)benzamida, ruxolitinib, panobinostat, osilodrostat, (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-(4-(4-fluorobenzoil)tiazol-2-il)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-2-(metilamino)propanamida, (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-(4-(4-fluorobenzoil)tiazol-2-il)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-2-(metilamino)propanamida, fosfato de sonidegib, ceritinib, 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida, N-(4-((1R,3S,5S)-3-amino-5-metilciclohexil)piridin-3-il)-6-(2,6-difluorofenil)-5-fluoropicolinamida, 2-(2',3-dimetil-[2,4'-bipiridin]-5-il)-N-(5-(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida, encorafenib, 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-((1R,6S)-9-metil-4-oxo-3,9-diazabiciclo[4.2.1]nonan-3-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida, binimetinib, midostaurina, everolimus, 1-metil-5-((2-(5-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il)piridin-4-il)oxi)-N-(4-(trifluorometil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-2-amina, pasireotida diaspartato, dovitinib, (R,E)-N-(7-cloro-1-(1-(4-

(dimetilamino)but-2-enoil)azepan-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2-metilisonicotinamida, N^6-(2-isopropoxi-5-metil-4-(1-metilpiperidin-4-il)fenil)-N^4-(2-(isopropilsulfonil)fenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, 1,1-dióxido de 3-(4-(4-((5-cloro-4-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)amino)-5-fluoro-2-metilfenil)piperidin-1-il)tietano, 5-cloro-N^2-(2-fluoro-5-metil-4-(1-(tetrahidro-2H-piran-4-il)piperidin-4-il)fenil)-N^4-(5-metil-1H-pirazol-3-il)pirimidina-2,4-diamina, 5-cloro-N2-(4-(1-etilpiperidin-4-il)-2-fluoro-5-metilfenil)-N^4-(5-metil-1H-pirazol-3-il)pirimidina-2,4-diamina, valspodar, y succinato de vatalanib.

En una modalidd, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de PKC, Sotrataurin (Compuesto A1), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2005/039549, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de PKC es Sotrastaurin (Compuesto A1) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2005/039549. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con Sotrastaurin (Compuesto A1), o un compuesto como se describe en la Publicación PCT N.° WO 2005/039549, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un melanoma, un linfoma

no-Hodgkin, una enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de trasplantes, un trastorno oftálmico, o psoriasis. En determinadas modalidades, Sotrastaurin (Compuesto A1) se administra a una dosis de aproximadamente 20 a 600 mg, por ejemplo, aproximadamente 200 a aproximadamente 600 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 450 mg, aproximadamente 100 mg a 400 mg, aproximadamente 150 mg a 350 mg o aproximadamente 200 mg a 300 mg, por ejemplo, aproximadamente 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg o 600 mg. El cronograma de dosificación puede variar de, por ejemplo, día por medio a diariamente, dos veces o tres veces al día.

En una modalidd, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de BCR-ABL, TASIGNA (Compuesto A2, **nilotinib**), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2004/005281, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de PKC es TASIGNA, o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2004/005281. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con TASIGNA (Compuesto A2), o un compuesto como se describe en la Publicación PCT N.° WO 2004/005281, para tratar un trastorno tal como una leucemia linfocítica, enfermedad de Parkinson, un cáncer neurológico, un melanoma, un cáncer

digestivo/gastrointestinal, un cáncer colorrectal, una leucemia mieloide, un cáncer de cabeza y cuello, o hipertensión pulmonar. En una modalidad, el inhibidor de BCR-ABL o TASIGNA se administra a una dosis de aproximadamente 300 mg (por ejemplo, dos veces al día, por ejemplo, para Ph+ CML-CP de diagnóstico reciente), o aproximadamente 400 mg, por ejemplo, dos veces al día, por ejemplo, para Ph+ CML-CP y CML-AP resistente o intolerante). El inhibidor de BCR-ABL o un Compuesto A2 se administra a una dosis de aproximadamente 300-400 mg.

En otra modalidad, la combinación *por ejemplo.,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de HSP90, tal como 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-N-etil-4-(4-(morfolinometil)feenil)isoxazol-3-carboxamida (Compuesto A3), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/060937 o WO 2004/072051, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de HSP90 es 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-N-etil-4-(4-(morfolinometil)fenil)isoxazol-3-carboxamida (Compuesto A3), o un compuesto divulgado en la Publicación PCT N.° WO 2010/060937 o WO 2004/072051. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-N-etil-4-(4-

(morfolinometil)fenil)isoxazol-3-carboxamida (Compuesto A3), o un compuesto como se describe en la Publicación PCT N.° WO 2010/060937 o WO 2004/072051, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un mieloma múltiple, un cáncer pulmonar no microcítico, un linfoma, un cáncer gástrico, un cáncer de mama, un cáncer digestivo/gastrointestinal, un cáncer pancreático, un cáncer colorrectal, un tumor sólido, o un trastorno de hematopoyesis.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo.,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de PI3K y/o mTOR, Dactolisib (Compuesto A4) u 8-(6-metoxi-piridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-fenil)-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (Compuesto A41), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2006/122806, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un desorden descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de PI3K y/o mTOR es Dactolisib (Compuesto A4), 8-(6-Metoxi-piridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-fenil)-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (Compuesto A41), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2006/122806. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con Dactolisib (Compuesto A4), 8-(6-metoxi-piridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-

fenil)-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (Compuesto A41), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2006/122806, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un cáncer de próstata, una leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica), un cáncer de mama, un cáncer de cerebro, una cáncer de vejiga, un cáncer pancreático, un cáncer renal, un tumor sólido, o un cáncer de hígado.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de FGFR, 3-(2,6-dicloro-3,5-dimetoxifenil)-1-(6-((4-(4-etilpiperazin-1-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-1-metilurea (Compuesto A5) o un compuesto descrito en la patente estadounidense 8,552,002, para tratar un trastorno, *por ejemplo.,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de FGFR es 3-(2,6-dicloro-3,5-dimetoxifenil)-1-(6-((4-(4-etilpiperazin-1-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-1-metilurea (Compuesto A5) o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 8.552.002. En una modalidad, el compuesto mono- or di-F-CDN se usa junto con el Compuesto A5, o un compuesto como se describe en la patente de Estados Unidos 8.552.002, para tratar un trastorno, tal como un cáncer digestivo/gastrointestinal, un cáncer hematológico, o un tumor sólido. En una modalidad, el inhibidor de FGFR o 3-(2,6-dicloro-3,5-dimetoxifenil)-1-(6-

((4-(4-etilpiperazin-1-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-1-metilurea (Compuesto A5) se administra a una dosis de aproximadamente 100-125 mg (por ejemplo, por día), por ejemplo, aproximadamente 100 mg o aproximadamente 125 mg.

En otra modalidd, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de PI3K, Buparlisib (Compuesto A6), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/084786, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de la PI3K es Buparlisib (Compuesto A6) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/084786. En una modalidad, el compuesto mono- or di-F-CDN se usa junto con Buparlisib (Compuesto A6), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/084786, para tratar un trastorno, tal como un cáncer de próstata, cáncer pulmonar no microcítico, un cáncer endócrino, una leucemia, un cáncer de ovario, un melanoma, un cáncer de vejiga, un cáncer de mama, un cáncer del sistema reproductivo femenino, un cáncer digestivo/gastrointestinal, un cáncer colorrectal, un glioblastoma multiforme, un tumor sólido, un linfoma no Hodgkin, un trastorno de hematopoyesis, o un cáncer de cabeza y cuello. En una modalidad, el inhibidor de PI3K o Buparlisib

(Compuesto A6) se administra a una dosis de aproximadamente 100 mg (por ejemplo, por día).

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de FGFR, 8-(2,6-difluoro-3,5-dimetoxifenil)-N-(4-((dimetilamino)metil)-1H-imidazol-2-il)quinoxalina-5-carboxamida (Compuesto A7) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2009/141386, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de FGFR es 8-(2,6-difluoro-3,5-dimetoxifenil)-N-(4-((dimetilamino)metil)-1H-imidazol-2-il)quinoxalina-5-carboxamida (Compuesto A7) o un compuesto descrito en la publicación PCT N.° WO 2009/141386. En una modalidad, el inhibidor de FGFR es 8-(2,6-difluoro-3,5-dimetoxifenil)-N-(4-((dimetilamino)metil)-1H-imidazol-2-il)quinoxalina-5-carboxamida (Compuesto A7). En una modaldiad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con 8-(2,6-difluoro-3,5-dimetoxifenil)-N-(4-((dimetilamino)metil)-1H-imidazol-2-il)quinoxalina-5-carboxamida (Compuesto A7), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2009/141386, para tratar un trastorno tal como un cáncer caracterizado por angiogénesis. En una modalidad, el inhibidor de FGFR u 8-(2,6-difluoro-3,5-dimetoxifenil)-N-(4-((dimetilamino)metil)-1H-imidazol-2-il)quinoxalina-5-carboxamida (Compuesto A7) se

administra a una dosis de, por ejemplo, desde 3 aproximadamente mg a aproximadamente 5 g, más preferiblemente desde aproximadamente 10 mg a 1.5 g por persona por día, opcionalmente dividida en 1 a 3 dosis únicas que pueden, por ejemplo, ser del mismo tamaño.

En otra modalidd, la combinación, *por ejemplo.,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de PI3K, (S)-N1-(4-metil-5-(2-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)piridin-4-il)tiazol-2-il)pirrolidina-1,2-dicarboxamida (Compuesto A8), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/029082, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de PI3K es (S)-N1-(4-metil-5-(2-(1, 1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)piridin-4-il)tiazol-2-il)pirrolidina-1,2-dicarboxamida (Compuesto A8) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/029082. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con (S)-N1-(4-metil-5-(2-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)piridin-4-il)tiazol-2-il)pirrolidina-1,2-dicarboxamida (Compuesto A8), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/029082, para tratar un trastorno, tal como un cáncer gástrico, un cáncer de mama, un cáncer de páncreas, un cáncer digestivo/gastrointestinal, un tumor sólido, y un cáncer de

cabeza y cuello. En una modalidad, el inhibidor de PI3K o (S)-N1-(4-metil-5-(2-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)piridin-4-il)tiazol-2-il)pirrolidina-1,2-dicarboxamida (Compuesto A8) se administra a una dosis de aproximadamente 150-300, 200-300, 200-400 o 300-400 mg (por ejemplo, por día), por ejemplo, aproximadamente 200, 300 o 400 mg.

En otra modalidd, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de citocromo P450 (*por ejemplo,* un inhibidor de CYP17), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/149755, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor del citocromo P450 (por ejemplo, el inhibidor de CYP17) es un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/149755. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/149755, para tratar el cáncer de próstata.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de HDM2, (S)-1-(4-clorofenil)-7-isopropoxi-6-metoxi-2-(4-(metil(((1r,4S)-4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil)metil)amino)fenil)-1,2-dihidroisoquinolin-3(4H)-ona (Compuesto A10) o un

compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2011/076786, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de HDM2 es (S)-1-(4-clorofenil)-7-isopropoxi-6-metoxi-2-(4-(metil(((1r,4S)-4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil)metil)amino)fenil)-1,2-dihidroisoquinolin-3(4H)-ona (Compuesto A10) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2011/076786. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con (S)-1-(4-clorofenil)-7-isopropoxi-6-metoxi-2-(4-(metil(((1r,4S)-4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil)metil)amino)fenil)-1,2-dihidroisoquinolin-3(4H)-ona (Compuesto A10), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2011/076786, para tratar un trastorno, tal como un tumor sólido. En una modalidad, el inhibidor de HDM2 o (S)-1-(4-clorofenil)-7-isopropoxi-6-metoxi-2-(4-(metil(((1r,4S)-4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil)metil)amino)fenil)-1,2-dihidroisoquinolin-3(4H)-ona (Compuesto A10) se administra a una dosis de aproximadamente 400 a 700 mg, por ejemplo, administrada tres veces a la semana, durante 2 semanas y con una semana de descanso. En algunas modalidades, la dosis es de aproximadamente 400, 500, 600 o 700 mg; aproximadamente 400-500, 500-600 o 600-700 mg, por ejemplo, administrada tres veces por semana.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un agente quelante de hierro, Deferasirox (también conocido como EXJADE; Compuesto A11), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 1997/049395, para tratar un trastorno, *por ejemplo.,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el agente quelante de hierro es Deferasirox, o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 1997/049395. En una modalidad, el agente quelante de hierro es Deferasirox (Compuesto A11). En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con Deferasirox (Compuesto A11), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 1997/049395, para tratar la sobrecarga de hierro, hemocromatosis o mielodisplasia.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo.,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se usa junto con un inhibidor de aromatasa, Letrozol (también conocido como FEMARA; Compuesto A12) o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 4.978.672, para tratar un trastorno, *por ejemplo.,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de aromatasa es letrozol (Compuesto A12) o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 4.978.672. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con letrozol

(Compuesto A12), o un compuesto descrito en la patente estadounidense 4.978.672, para tratar un trastorno, tal como un cáncer, un leiomiosarcoma, un cáncer de endometrio, un cáncer de mama, un cáncer del sistema reproductivo femenino o una deficiencia hormonal.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de PI3K, *por ejemplo,* un inhibidor de pan-PI3K,(4S,5R)-3-(2'-amino-2-morfolino-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-(hidroximetil)-5-metiloxazolidin-2-ona (Compuesto A13) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2013/124826 para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de PI3K es (4S,5R)-3-(2'-amino-2-morfolino-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-(hidroximetil)-5-metiloxazolidin-2-ona (Compuesto A13) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2013/124826. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con (4S,5R)-3-(2'-amino-2-morfolino-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-(hidroximetil)-5-metiloxazolidin-2-ona (Compuesto A13), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2013/124826, para tratar un trastorno, tal como un cáncer o un tumor sólido avanzado.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de p53 y/o una interacción de p53/Mdm2, (S)-5-(5-cloro-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)-1-isopropil-5,6-dihidropirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona (Compuesto A14), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2013/111105 para el tratamiento de un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de p53 y/o de la interacción p53/Mdm2 es (S)-5-(5-cloro-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)-1-isopropil-5,6-dihidropirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona (Compuesto A14) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2013/111105. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con (S)-5-(5-cloro-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)-1-isopropil-5,6-dihidropirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona (Compuesto A14), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2013/111105, para tratar un trastorno, tal como un cáncer o un sarcoma de tejidos blandos. En otra modalidad, la combinación, por ejemplo., una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor

de la tirosina cinasa CSF-1R, 4-((2-(((1R,2R)2-ciclohexilhidroxi)amino)benzo[d]tiazol-6-il)oxi)-N-metilpicolinamida (Compuesto A15) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2005/073224, para tratar un trastorno, *por ejemplo.,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de la tirosina cinasa CSF-1R es 4-((2-(((1R,2R)-2-hidroxiciclohexil)amino)benzo[d]tiazol-6-il)oxi)-N-metilpicolinamida (Compuesto A15) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2005/073224. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con 4-((2-(((1R,2R)-2-hidroxiciclohexil)amino)benzo[d]tiazol-6-il)oxi)-N-metilpicolinamida (Compuesto A15) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2005/073224, para tratar un trastorno como el cáncer.

En otra modalidd, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inductor de la apoptosis y/o un inhibidor de la angiogénesis, tal como mesilato de imatinib (también conocido como GLEEVEC; Compuesto A16) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 1999/003854, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inductor de la apoptosis y/o un inhibidor de la angiogénesis es el mesilato de Imatinib (Compuesto A16) o un compuesto descrito en la Publicación PCT

N.° WO1999/003854. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con mesilato de Imatinib (Compuesto A16), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO1999/003854, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un mieloma múltiple, un cáncer de próstata, un cáncer pulmonar no microcítico, un linfoma, un cáncer gástrico, un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un cáncer digestivo/gastrointestinal, un cáncer colorrectal, un glioblastoma multiforme, un cáncer de hígado, una cáncer de cabeza y cuello, asma, esclerosis múltiple, alergia, demencia de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica o artritis reumatoide. En determinadas modalidades, el mesilato de Imatinib (Compuesto A16) se administra a una dosis de aproximadamente 100 a 1000 mg, por ejemplo, aproximadamente 200 mg a 800 mg, aproximadamente 300 mg a 700 mg o aproximadamente 400 mg a 600 mg, por ejemplo, aproximadamente 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg o 700 mg. El cronograma de dosificación puede variar de, por ejemplo, un día de por medio a diariamente, dos veces o tres veces al día. En una modalidad, el mesilato de imatinib se administra a una dosis oral de aproximadamente 100 mg a 600 mg al día, por ejemplo, aproximadamente 100 mg, 200 mg, 260 mg, 300 mg, 400 mg, o 600 mg al día.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de JAK, 2-fluoro-N-metil-4-(7-(quinolin-6-ilmetil)imidazo[1,2-b][1,2,4]triazin-2-il)benzamida (Compuesto A17) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/070514, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de JAK es 2-fluoro-N-metil-4-(7-(quinolin-6-ilmetil)imidazo[1,2-b][1,2,4]triazin-2-il)benzamida (Compuesto A17), o una sal diclorhídrica de este, o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/070514. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con 2-fluoro-N-metil-4-(7-(quinolin-6-ilmetil)imidazo[1,2-b][1,2,4]triazin-2-il)benzamida (Compuesto A17), o una sal diclorhídrica de este, o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.| WO 2007/070514, para tratar un trastorno, tal como cáncer colorrectal, leucemia mieloide, cáncer hematológico, enfermedad autoinmune, linfoma no Hodgkin, o trombocitemia. En una modalidad, el inhibidor de JAK o un 2-fluoro-N-metil-4-(7-(quinolin-6-ilmetil)imidazo[1,2-b][1,2,4]triazin-2-il)benzamida (Compuesto A17), o una sal diclorhídrica de este se administra en una dosis de aproximadamente 400-600 mg (por

ejemplo, por día), por ejemplo, aproximadamente 400, 500 o 600 mg, o aproximadamente 400-500 o 500-600 mg.

En otra modalidd, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de JAK, Fosfato de Ruxolitinib (también conocido como JAKAFI; Compuesto A18), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/070514, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de JAK es Fosfato de Ruxolitinib (Compuesto A18) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/070514. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con Fosfato de Ruxolitinib (Compuesto A18), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/070514, para tratar un trastorno, tal como un cáncer de próstata, una leucemia linfocítica, un mieloma múltiple, un linfoma, un cáncer de pulmón, una leucemia, caquexia, un cáncer de mama, un cáncer de páncreas, artritis reumatoide, psoriasis, un cáncer colorrectal, una leucemia mieloide, un cáncer hematológico, una enfermedad autoinmune, un linfoma no Hodgkin o trombocitemia. En una modalidad, el inhibidor de JAK o Fosfato de Ruxolitinib (Compuesto A18) se administra a una dosis de aproximadamente 15-25 mg, por ejemplo, dos veces al día. En

algunas modalidades, la dosis es de aproximadamente 15, 20 o 25 mg, o aproximadamente 15-20 o 20-25 mg.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se usa junto con un inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC). En algunas modalidades, el inhibidor de HDAC se selecciona del grupo que consta de panobinostat, vorinostat, romidepsin, chidamida, ácido valproico, belinostat, piroxamida, mocetinostat, abexinostat, entinostat, pracinostat, resminostat, givinostat, quisinostat, ricolinostat, CUDC-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202 y CG200745. En algunas modalidades, la combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC), Panobinostat (Compuesto A19), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2014/072493, para tratar un trastorno, *por ejemplo.,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de HDAC es Panobinostat (Compuesto A19) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2014/072493. En una modalidad, el compuesto mono o di F-CDN se usa junto con Panobinostat (Compuesto A19), un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2014/072493, para tratar un trastorno, tal como un cáncer pulmonar microcítico, un cáncer respiratorio/torácico, un cáncer de

próstata, un mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, un cáncer de hueso, un cáncer pulmonar no microcítico, un cáncer endócrino, un linfoma, un cáncer neurológico, una leucemia, VIH/SIDA, un trastorno inmunitario, rechazo de trasplantes, un cáncer gástrico, un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un cáncer colorrectal, un glioblastoma multiforme, una leucemia mieloide, un cáncer hematológico, un cáncer renal, un linfoma no Hodgkin, un cáncer de cabeza y cuello, un trastorno de hematopoyesis o un cáncer de hígado. En una modalidad, el inhibidor de HDAC o Panobinostat (Compuesto A19) se administra a una dosis de aproximadamente 20 mg (por ejemplo, por día).

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de uno o más de citocromo P450 (por ejemplo, 11B2), aldosterona o angiogénesis, Osilodrostat (Compuesto A20), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2007/024945 para el tratamiento de un trastorno, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de una o más de citocromo P450 (por ejemplo, 11B2), aldosterona o angiogénesis es Osilodrostat (Compuesto A20) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2007/024945. En una modalidad, el compuesto mono o di-F-CDN se usa junto con

Osilodrostat (Compuesto A20), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2007/024945, para tratar un trastorno como el síndrome de Cushing, hipertensión, o terapia de insuficiencia cardíaca.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se usa junto con un inhibidor de IAP, (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-(4-(4-fluorobenzoil)tiazol-2-il)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-2-(metilamino)propanamida (Compuesto A21) o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 8,552,003, para el tratamiento de un trastorno, *por ejempoo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-(4-(4-fluorobenzoil)tiazol-2-il)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-2-(metilamino)propanamida (Compuesto A21) o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 8.552.003. En una modalidad, el compuesto mono o di-F-CDN se usa junto con (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-(4-(4-fluorobenzoil)tiazol-2-il)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-2-(metilamino)propanamida (Compuesto A21), o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 8.552.003, para tratar un trastorno, tal como un mieloma múltiple, un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un cáncer pancreático, o un trastorno de hematopoyesis. En una modalidad, el inhibidor de la IAP o (S)-

N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-(4-(4-fluorobenzoil)tiazol-2-il)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-2-(metilamino)propanamida (Compuesto A21) o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 8.552.003 se administra a una dosis de aproximadamente 1800 mg, por ejemplo, una vez por semana.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se usa junto con un inhibidor de Smoothened (SMO), fosfato Sonidegib (Compuesto A22), (R)-2-(5-(4-(6-bencil-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-2-metil-piperazin-1-il) pirazin-2-il) propan-2-ol (compuesto A25), o un compuesto descrito en la publicación PCT N.° WO 2007/131201 o WO 2010/007120, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de la SMO es fosfato de Sonidegib (Compuesto A22), (R)-2-(5-(4-(6-bencil-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-il)propan-2-ol (Compuesto A25), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/131201 o WO 2010/007120. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se utiliza junto con fosfato de Sonidegib (Compuesto A22), (R)-2-(5-(4-(6-bencil-4,5-dimetilpiridazin-3-il)-2-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-il)propan-2-ol (Compuesto A25), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/131201 o WO 2010/007120 para tratar un trastorno,

tal como un cáncer, un meduloblastoma, un cáncer pulmonar microcítico, un cáncer de próstata, un carcinoma de células basales, un cáncer de páncreas, o una inflamación. En determinadas modalidades, fosfato de Sonidegib (Compuesto A22) se administra a una dosis de aproximadamente 20 a 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 40 mg a 400 mg, aproximadamente 50 mg a 300 mg o aproximadamente 100 mg a 200 mg, por ejemplo, aproximadamente 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, o 300 mg. El cronograma de dosificación puede variar de, por ejemplo, un día de por medio a diariamente, dos veces o tres veces al día.

En otra modalidd, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de Alk, ceritinib (también conocido como ZYKADIA; Compuesto A23), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/131201, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de Alk es ceritinib (Compuesto A23) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/131201. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con ceritinib (Compuesto A23), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/131201, para tratar un trastorno, tal como cáncer pulmonar no microcítico o tumores sólidos. En una modalidad,

el inhibidor de Alk o ceritinib (Compuesto A23) se administra a una dosis de aproximadamente 750 mg, por ejemplo, una vez al día.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo*, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de JAK y/o CDK4/6, 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida (Compuesto A24), o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 8.415.355 o la patente de Estados Unidos 8.685.980 para el tratamiento de un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de JAK y/o CDK4/6 es 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida (Compuesto A24) o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 8.415.355 o la patente de Estados Unidos 8.685.980. En una modalidad, el compuesto mono-di-F-CDN se usa junto con 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida (Compuesto A24), o un compuesto descrito en la patente de Estados Unidos 8.415.355 o la patente de Estados Unidos 8.685.980, para tratar un trastorno tal como un linfoma, un cáncer neurológico, un melanoma, un cáncer de mama o un tumor sólido. En una

modalidad, el inhibidor de JAK y/o inhibidor de CDK4/6 o 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida (Compuesto A24) se administra a una dosis de aproximadamente 200-600 mg, *por ejemplo,* por día. En una modalidad, el compuesto se administra a una dosis de aproximadamente 200, 300, 400, 500 o 600 mg, o aproximadamente 200-300, 300-400, 400-500 o 500-600 mg.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de PIM cinasa, N-(4-((1R,3S,5S)-3-amino-5-metilciclohexil)piridin-3-il)-6-(2,6-difluorofenil)-5-fluoropicolinamida (Compuesto A27), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/026124, para tratar un trastorno, *por ejemplo.,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de la PIM cinasa es N-(4-((1R,3S,5S)-3-amino-5-metilciclohexil)piridin-3-il)-6-(2,6-difluorofenil)-5-fluoropicolinamida (Compuesto A27) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/026124. En una modalidad, el compuesto mono-o di-F-CDN se usa junto con N-(4-((1R,3S,5S)-3-amino-5-metilciclohexil)piridin-3-il)-6-(2,6-difluorofenil)-5-fluoropicolinamida (Compuesto A27), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/026124, para tratar un

trastorno, tal como un mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide, o un linfoma no Hodgkin. En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de señalización de Wnt, 2-(2',3-dimetil-[2,4'-bipiridin]-5-il)-N-(5-(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida (Compuesto A28) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/101849, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de la señalización de Wnt es 2-(2',3-dimetil-[2,4'-bipiridin]-5-il)-N-(5-(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida (Compuesto A28) o un compuesto descrito en la publicación PCT N.° WO 2010/101849. En una modalidad, el inhibidor de la señalización de Wnt es 2-(2',3-dimetil-[2,4'-bipiridin]-5-il)-N-(5-(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida (Compuesto A28). En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con 2-(2',3-dimetil-[2,4'-bipiridin]-5-il)-N-(5-(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida (Compuesto A28), o un compuesto descrito en la publicación PCT N.° WO 2010/101849, para tratar un trastorno, tal como un tumor sólido (*por ejemplo,* un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, o un cáncer de colon). En determinadas modalidades, 2-(2',3-dimetil-[2,4'-bipiridin]-5-il)-N-(5-

(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida (Compuesto A28) se administra a una dosis de aproximadamente 1 a 50 mg, *por ejemplo,* aproximadamente 2 mg a 45 mg, aproximadamente 3 mg a 40 mg, aproximadamente 5 mg a 35 mg, 5 mg a 10 mg o aproximadamente 10 mg a 30 mg, *por ejemplo,* aproximadamente 2 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg o 40 mg. El cronograma de dosificación puede variar de, *por ejemplo,* día por medio a diariamente, dos veces o tres veces al día.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de BRAF, Encorafenib (Compuesto A29), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2011/025927, para tratar un trastorno, *por ejemplo.,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de BRAF es Encorafenib (Compuesto A29) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2011/025927. En una modalidad, el compuesto mono-o di-F-CDN se usa junto con Encorafenib (Compuesto A29), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2011/025927, para tratar un trastorno, tal como un cáncer pulmonar no microcítico, un melanoma o un cáncer colorrectal. En una modalidad, el inhibidor de BRAF o Encorafenib (Compuesto A29) se administra a una dosis de aproximadamente 200-300, 200-400 o 300-400 mg, por ejemplo, por día. En una modalidad, el compuesto se

administra a una dosis de aproximadamente 200, aproximadamente 300 o aproximadamente 400 mg.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de CDK4/6, 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-((1R,6S)-9-metil-4-oxo-3,9-diazabiciclo[4.2.1]nonan-3-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida (Compuesto A30), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N. WO 2011/101409, para tratar un trastorno, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de CDK4/6 es 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-((1R,6S)-9-metil-4-oxo-3,9-diazabiciclo[4.2.1]nonan-3-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida (Compuesto A30) o un compuesto descrito en la publicación PCT N. WO 2011/101409. En una modalidad, el compuesto mono-di-F- CDN se usa junto con 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-((1R,6S)-9-metil-4-oxo-3,9-diazabiciclo[4.2.1]nonan-3-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida (Compuesto A30), o un compuesto descrito en la publicación PCT N.° WO 2011/101409, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un linfoma de células del manto, un liposarcoma, un cáncer pulmonar no microcítico, un melanoma, un cáncer de esófago de células escamosas o un cáncer de mama.

En otra modalidd, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de MEK, Binimetinib (Compuesto A34), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2003/077914, para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de MEK es Binimetinib (Compuesto A34), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2003/077914. En una modalidad, el compuesto mono-di-F-CDN se usa junto con Binimetinib (Compuesto A34), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2003/077914, para tratar un trastorno, tal como un cáncer pulmonar no microcítico, una trastorno multisistémico genético, un melanoma, un cáncer de ovario, un cáncer digestivo/gastrointestinal, una artritis reumatoide o un cáncer colorrectal. En una modalidad, el inhibidor de MEK o Binimetinib (Compuesto A34) se administra a una dosis de aproximadamente 45 mg,, por ejemplo, dos veces al día.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de uno o más de c-KIT, liberación de histamina, Flt3 (por ejemplo, FLK2/STK1) o PKC, Midostaurina (Compuesto A35), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2003/037347 para el

tratamiento de un trastorno,, *por ejemplo,* un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor es Midostaurina (Compuesto A35), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2003/037347. En una modalidad, el inhibidor de una o más de c-KIT, liberación de histamina, Flt3 (por ejemplo, FLK2/STK1) o PKC es Midostaurina. En una modalidad, el compuesto mono-di-F-CDN se usa junto con Midostaurina (Compuesto A35), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2003/037347, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un cáncer colorrectal, una leucemia mieloide, síndrome mielodisplásico, una degeneración mascular relacionada con la edad, una complicación de la diabetes o un trastorno dermatológico.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de TOR (por ejemplo, inhibidor mTOR), Everolimus (también conocido como AFINITOR; compuesto A36) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2014/085318, para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de TOR es Everolimus (Compuesto A36) o un Compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2014/085318. En una modalidad, el compuesto mono-o di-F-CDN se usa junto con Everolimus (Compuesto A36) para tratar un trastorno tal

como una enfermedad pulmonar intersticial, un cáncer pulmonar microcítico, un cáncer respiratorio/torácico, un cáncer de próstata, un mieloma múltiple, un sarcoma, una degeneración macular relacionada con la edad, un cáncer óseo, esclerosis tuberosa, un cáncer pulmonar no microcítico, un cáncer endócrino, un linfoma, trastornos neurológicos, un astrocitoma, un cáncer de cuello uterino, un cáncer neurológico, una leucemia, un trastorno inmunitario, rechazo de trasplantes, un cáncer gástrico, un melanoma, epilepsia, un cáncer de mama o un cáncer de vejiga. En una modalidad, el inhibidor de TOR o Everolimusis (Compuesto A36) se administra a una dosis de aproximadamente 2.5-20 mg/día. En una modalidad, el compuesto se administra en una dosis de aproximadamente 2.5, 5, 10 o 20 mg / día,, por ejemplo, aproximadamente 2.5-5, 5-10, o 10-20 mg/día.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de una o más de VEGFR-2, PDGFRbeta, KIT o Raf cinasa C,1-metil-5-((2-(5-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il)piridin-4-il)oxi)-N-(4-(trifluorometil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-2-amina (Compuesto A37) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/030377 para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el

inhibidor de una o más de VEGFR-2, PDGFRbeta, KIT o Raf cinasa C es 1-metil-5-((2-(5-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il)piridin-4-il)oxi)-N-(4-(trifluorometil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-2-amina (Compuesto A37) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/030377. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con 1-metil-5-((2-(5-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il)piridin-4-il)oxi)-N-(4-(trifluorometil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-2-amina (Compuesto A37), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2007/030377, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un melanoma o un tumor sólido.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un agonista de la somatostatina y/o el inhibidor de la liberación de la hormona de crecimiento, diaspartato de pasireotida (también conocido como SIGNIFOR; Compuesto A38) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2002/010192 o en la Patente de Estados Unidos N.° 7.473.761 para el tratamiento de un trastorno,, por ejemplo, un desorden descrito en la presente. En una modalidad, el agonista de la somatostatina y/o inhibidor de la liberación de hormona de crecimiento es diaspartato de Pasireotida (Compuesto A38) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2002/010192 o en la Patente

estadounidense N.° 7.473.761. En una modalidad, el compuesto mono-o di-F-CDN se usa junto con diaspartato de Pasireotida (Compuesto A38), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2002/010192 o en la Patente estadounidense N.° 7.473.761, para tratar un trastorno tal como un cáncer de próstata, un cáncer endócrino, un cáncer neurológico, un cáncer de piel (por ejemplo, un melanoma), un cáncer pancreático, un cáncer de hígado, síndrome de Cushing, un trastorno gastrointestinal, acromegalia, un trastorno hepático y del tracto biliar, o cirrosis del hígado.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un modulador de transducción de señales y/o inhibidor de angiogénesis, Dovitinib (Compuesto A39), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2009/115562, para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el modulador de la transducción de señal y/o inhibidor de la angiogénesis es Dovitinib (Compuesto A39) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2009/115562. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con Dovitinib (Compuesto A39), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2009/115562, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un cáncer respiratorio/torácico, un mieloma

múltiple, un cáncer de próstata, un cáncer pulmonar no microcítico, un cáncer endócrino o un trastorno genético neurológico.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de EGFR, (R,E)-N-(7-cloro-1-(1-(4-(dimetilamino)but-2-enoil)azepan-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2-metilisonicotinamida (Compuesto A40), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2013/184757, para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de EGFR es (R,E)-N-(7-cloro-1-(1-(4-(dimetilamino)but-2-enoil)azepan-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2-metilisonicotinamida (Compuesto A40) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2013/184757. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con (R,E)-N-(7-cloro-1-(1-(4-(dimetilamino)but-2-enoil)azepan-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2-metilisonicotinamida (Compuesto A40), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2013/184757, para tratar un trastorno tal como un cáncer, por ejemplo, un tumor sólido. En una modalidad, el inhibidor de EGFR o (R,E)-N-(7-cloro-1-(1-(4-(dimetilamino)but-2-enoil)azepan-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2-metilisonicotinamida (Compuesto A40) se administra a

una dosis de 150-250 mg,, por ejemplo, por día. En una modalidad, el compuesto se administra en una dosis de aproximadamente 150, 200 o 250 mg, o aproximadamente 150-200 o 200-250 mg.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de ALK N^6-(2-isopropoxi-5-metil-4-(1-metilpiperidin-4-il)fenil)-N^4-(2-(isopropilsulfonil)fenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina (Compuesto A42) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2008/073687, para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de ALK es N^6-(2-isopropoxi-5-metil-4-(1-metilpiperidin-4-il)fenil)-N^4-(2-(isopropilsulfonil)fenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina (Compuesto A42) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2008/073687. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se utiliza junto con N^6-(2-isopropoxi-5-metil-4-(1-metilpiperidin-4-il)fenil)-N^4-(2-(isopropilsulfonil)fenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina (Compuesto A42), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2008/073687, para tratar un trastorno tal como un cáncer, un linfoma anaplásico de células grandes

(ALCL), un ncáncer pulmonar no microcítico (NSCLC) o un neuroblastoma.

En otra modalidad, la combinación, *por ejemplo,* una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de IGF-1R, 1,1-dióxido de 3-(4-(4-((5-cloro-4-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)amino)-5-fluoro-2-metilfenil)piperidin-1-il)tietano (Compuesto A43),5-cloro-N^2-(2-fluoro-5-metil-4-(1-(tetrahidro-2H-piran-4-il)piperidin-4-il)fenil)-N^4-(5-metil-1H-pirazol-3-il)pirimidina-2,4-diamina (Compuesto A44), o 5-cloro-N2-(4-(1-etilpiperidin-4-il)-2-fluoro-5-metilfenil)-N^4-(5-metil-1H-pirazol-3-il)pirimidina-2,4-diamina (Compuesto A45) o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/002655 para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito. En una modalidad, el inhibidor de IGF-1R es 1,1-dióxido de 3-(4-(4-((5-cloro-4-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)amino)-5-fluoro-2-metilfenil)piperidin-1-il)tietano (Compuesto A43), 5-cloro-N^2-(2-fluoro-5-metil-4-(1-(tetrahidro-2H-piran-4-il)piperidin-4-il)fenil)-N^4-(5-metil-1H-pirazol-3-il)pirimidina-2,4-diamina (Compuesto A44), 5-cloro-N2-(4-(1-etilpiperidin-4-il)-2-fluoro-5-metilfenil)-N^4-(5-metil-1H-pirazol-3-il)pirimidina-2,4-diamina (Compuesto A45), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/002655. En una modalidad, el

compuesto mono- o di-F-CDN se utiliza junto con 1,1-dióxido de 3-(4-(4-((5-cloro-4-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)amino)-5-fluoro-2-metilfenil)piperidin-1-il)tietano (Compuesto A43), 5-cloro-N^2-(2-fluoro-5-metil-4-(1-(tetrahidro-2H-piran-4-il)piperidin-4-il)fenil)-N^4-(5-metil-1H-pirazol-3-il)pirimidina-2,4-diamina (Compuesto A44), 5-cloro-N2-(4-(1-etilpiperidin-4-il)-2-fluoro-5-metilfenil)-N^4-(5-metil-1H-pirazol-3-il)pirimidina-2,4-diamina (Compuesto A45), o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2010/002655, para tratar un trastorno, tal como un cáncer o sarcoma.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se usa junto con un inhibidor de la P-glicoproteína 1, Valspodar (también conocido como AMDRAY; Compuesto A46) o un compuesto descrito en EP 296122, para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de la P-glicoproteína 1 es Valspodar (Compuesto A46) o un compuesto descrito en el documento EP 296122. En una modalidad, el compuesto mono-o di-F-CDN se usa junto con Valspodar (Compuesto A46), o un compuesto descrito en el documento EP 296122, para tratar un trastorno tal como un cáncer o un tumor resistente a los fármacos.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con uno o más de un inhibidor de VEGFR, succinato de Vatalanib (Compuesto A47), o un compuesto descrito en WO 98/35958, para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de VEGFR es succinato de Vatalanib (Compuesto A47) o un compuesto descrito en WO 98/35958. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con succinato de Vatalanib (Compuesto A47), o un compuesto descrito en EP 296122, para tratar el cáncer.

En otra modalidd, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de IDH o un compuesto descrito en WO 2014/141104, para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de IDH es un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2014/141104. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con un compuesto descrito en WO2014/141104 para el tratamiento de un trastorno tal como un cáncer.

En otra modalidad, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de BCL-ABL o

un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2013/171639, WO2013/171640, WO2013/171641 o WO2013/171642 para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de BCL-ABL es un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2013/171639, WO2013/171640, WO2013/171641 o WO2013/171642. En una modalidad, el compuesto mono-o di-F-CDN se usa junto con un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2013/171639, WO2013/171640, WO2013/171641 o WO2013/171642 para el tratamiento de un trastorno tal como un cáncer.

En otra modalidd, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor de c-RAF o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2014/151616 para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor de c-RAF es el Compuesto A50 o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2004/151616. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con un compuesto descrito en la Publicación PCT N.°WO2014/151616 para el tratamiento de un trastorno tal como un cáncer.

En otra modalidd, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se utiliza junto con un inhibidor competitivo

de ERK1/2 ATP o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO 2015/066188 para tratar un trastorno,, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente. En una modalidad, el inhibidor competitivo de ERK1/2 ATP es un compuesto descrito en la Publicación PCT N.° WO2015/066188. En una modalidad, el compuesto mono- o di-F-CDN se usa junto con un compuesto A51 o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.°WO2015/066188 para el tratamiento de un trastorno tal como un cáncer. En algunas modalidades, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN descrito en este documento, y el Compuesto A51 o un compuesto descrito en la Publicación PCT N.°WO2015/066188, se administra junto con uno o más agentes seleccionados, Compuesto A8, Compuesto A17, Compuesto A23, Compuesto A24, Compuesto A27, Compuesto A29 y Compuesto A33.

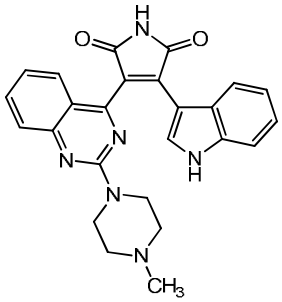
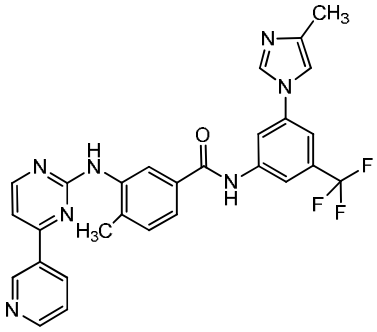
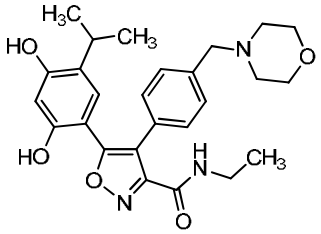
En algunas modalidades, la combinación, por ejemplo, una combinación que comprende un compuesto mono- o di-F-CDN como se describe en la presente, se administra junto con un agente anti-cáncer que tiene una actividad conocida en un ensayo de células inmunes,, por ejemplo, en uno o más de un ensayo de huMLR, un ensayo de proliferación de linfocitos T, y un ensayo de proliferación de linfocitos B, donde tales ensayos son conocidos en la técnica, y se pueden utilizar para demostrar que los compuestos no inhiben una respuesta inmunitaria (es

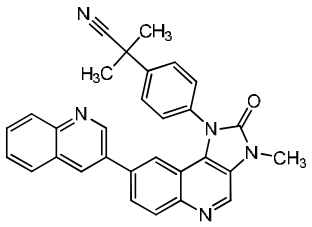
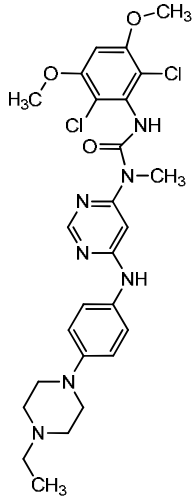
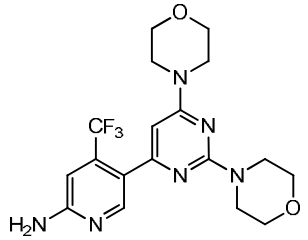
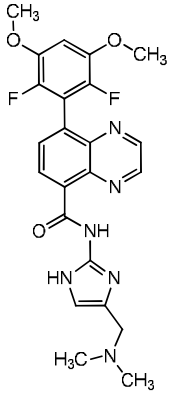
decir, demuestran poca o ninguna inhibición en tales ensayos). Una IC50 en tales ensayos se puede determinar para los compuestos a ser usados junto con el compuesto mono- o di-F-CDN. En modalidades, el agente anti-cáncer tiene una CI50 de,, por ejemplo, >1 µM, 1-4 µM, o mayor que 4 µM,, *por ejemplo,* 4-10 µM o 4-20 µM, o mayor de 20 µM. En modalidades, el segundo agente terapéutico se selecciona de entre uno o más de: Compuesto A9, Compuesto A16, Compuesto A17, Compuesto A21, Compuesto A22, Compuesto A25, Compuesto A28, Compuesto A48 y Compuesto A49.

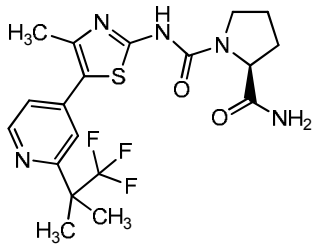
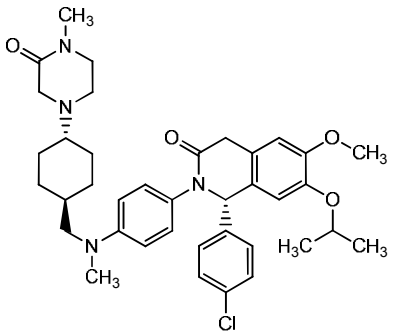
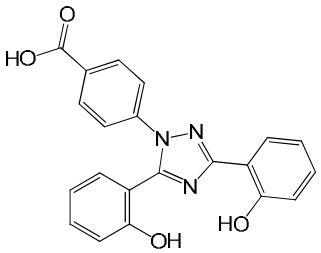
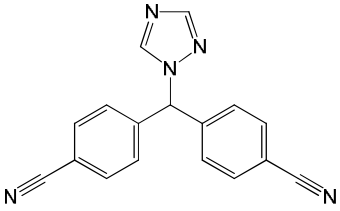
En algunas modalidades, el Compuesto A28 (o un compuesto relacionado al Compuesto A28) se administra a una dosis de aproximadamente 5-10 o 10-30 mg. En algunas modalidades, el Compuesto A22 (o un compuesto relacionado al Compuesto A22) se administra a una dosis de aproximadamente 200 mg. En algunas modalidades, el Compuesto A17 (o compuesto relacionado al Compuesto A17) se administra a una dosis de aproximadamente 400-600 mg. En algunas modalidades, el Compuesto A16 (o compuesto relacionado al Compuesto A16) se administra a una dosis de aproximadamente 400-600 mg por vía oral al día. En algunas modalidades, el Compuesto A29 (o compuesto relacionado al Compuesto A29) se administra a una dosis de aproximadamente 200-400 o 300-400 mg. En algunas modalidades, el Compuesto A24 (o compuesto relacionado al Compuesto A24) se administra a una

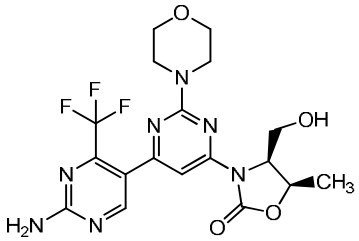
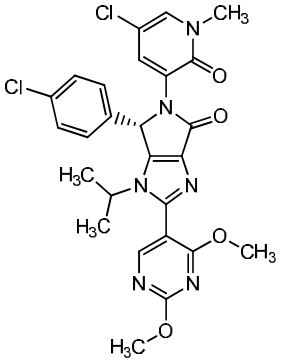
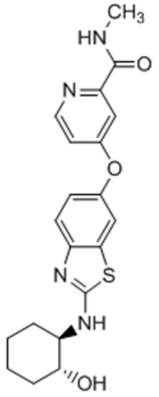
dosis de aproximadamente 200-600 mg. En algunas modalidades, el Compuesto A23 (ceritinib) (o compuesto relacionado con ceritinib) se administra a una dosis de aproximadamente 750 mg una vez al día. En algunas modalidades, el Compuesto A8 (o compuesto relacionado al Compuesto A8) se administra a una dosis de aproximadamente 200-400 o 300-400 mg. En algunas modalidades, el Compuesto A5 (o compuesto relacionado al Compuesto A5) se administra a una dosis de aproximadamente 100-125 mg. En algunas modalidades, el Compuesto A6 (o compuesto relacionado al Compuesto A6) se administra a una dosis de aproximadamente 100 mg. En algunas modalidades, el Compuesto A1 (o compuesto relacionado al Compuesto A1) se administra a una dosis de aproximadamente 200-300 o 200-600 mg. En algunas modalidades, el Compuesto A40 (o compuesto relacionado al Compuesto A40) se administra a una dosis de aproximadamente 150-250 mg. En modalidades, el Compuesto A10 (o compuesto relacionado al Compuesto A10) se administra a una dosis de aproximadamente 400 a 700 mg, por ejemplo, se administra tres veces a la semana, durante 2 semanas y con una semana de descanso. En modalidades, el inhibidor de BCR-ABL se administra a una dosis de aproximadamente 20 mg bid-80 mg bid.

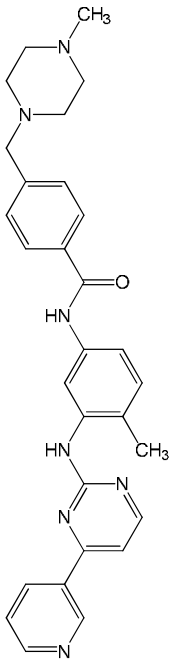
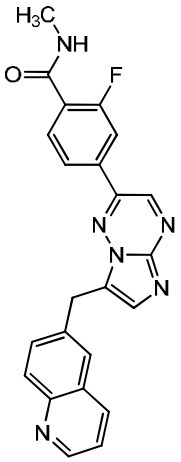
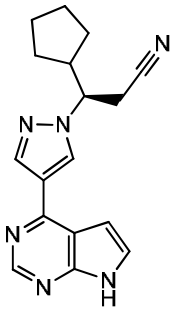
Tabla 2. Agentes terapéuticos que se pueden administrar junto con los compuestos mono- o di-F-CDN como se describen en la presente.

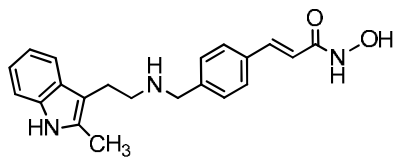
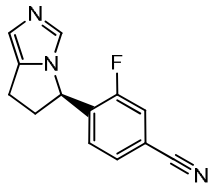
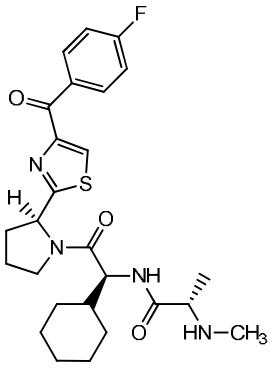
Designación del compuesto / nombre genérico	Patente / Referencia	Estructura del compuesto
A1 Sotrastaurina	EP 1682103 US 2007/142401 WO 2005/039549	
A2 Monohidrato de Nilotinib HCl TASIGNA®	WO 2004/005281 US 7,169,791	 • HCl H_2O
A3	WO 2010/060937 WO 2004/072051 EP 1611112 US 8,450,310	

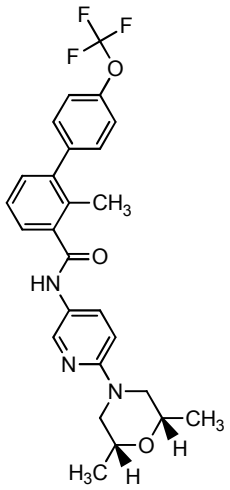
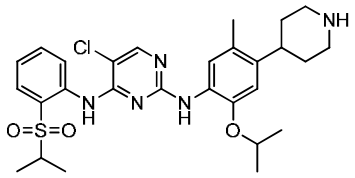
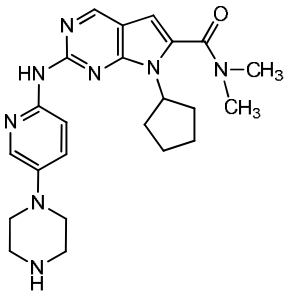
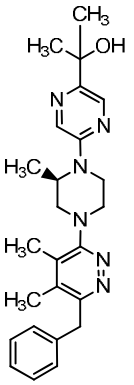
A4 Dactolisib	WO 2006/122806	
A5	US 8.552.002	
A6 Buparlisib	WO 2007/084786	
A7	WO 2009/141386 US 2010/0105667	

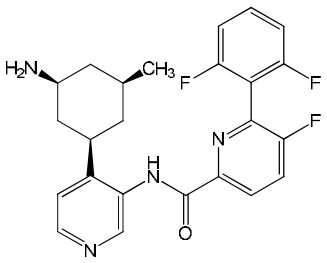
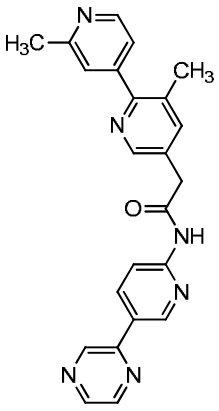
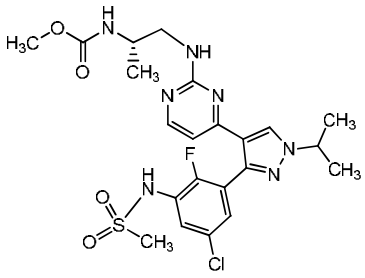
A8	WO 2010/029082	
A9 inhibidor de CYP17	WO 2010/149755 US 8.263.635 B2 EP 2445903 B1	
A10	WO 2011/076786	
A11 Deferasirox EXJADE®	WO 1997/049395	
A12 Letrozol FEMARA®	US4.978.672	

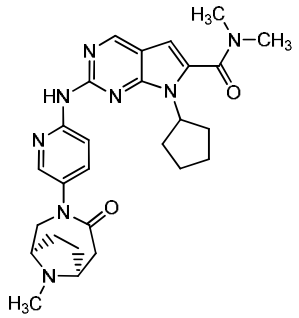
A13	WO 2013/124826 US 2013/0225574	
A14	WO 2013/111105	
A15	WO 2005/073224	

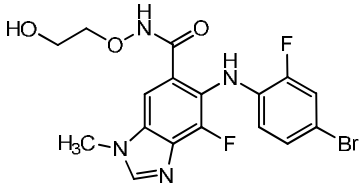
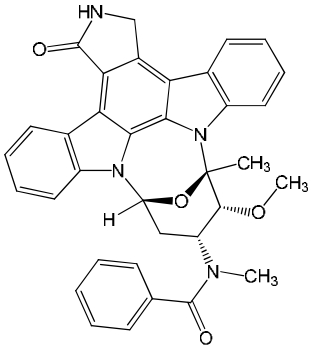
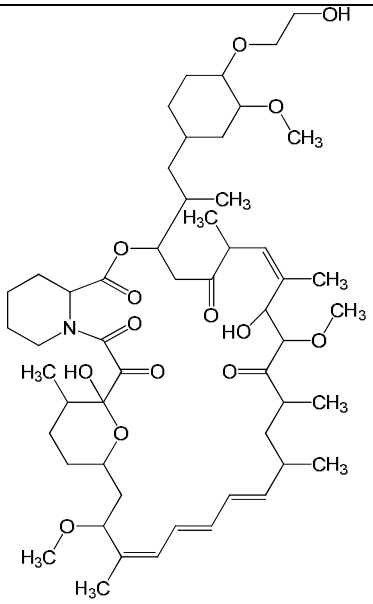
A16 Mesilato de imatinib GLEEVEC®	WO 1999/003854	 mesilato
A17	EP 2099447 US 7,767,675 US 8,420,645	 sal diclorhidrato
A18 Fosfato de ruxolitinib JAKAFI®	WO 2007/070514 EP 2474545 US 7.598.257 WO 2014/018632	 H_3PO_4

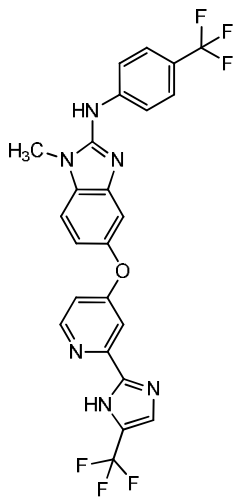
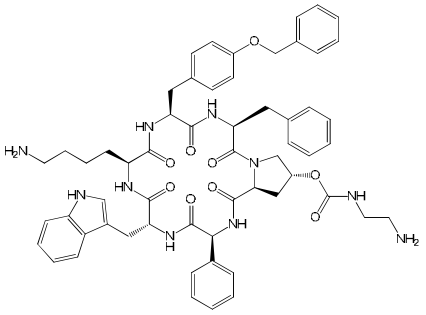
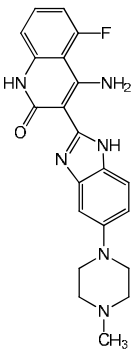
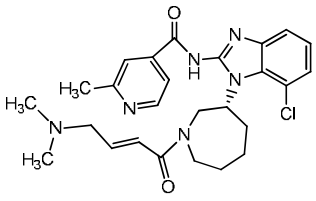
A19 Panobinostat	WO 2014/072493 WO 2002/022577 EP1870399	
A20 Osilodrostat	WO 2007/024945	
A21	WO 2008/016893 EP 2051990 US 8.546.336	

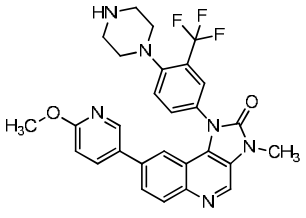
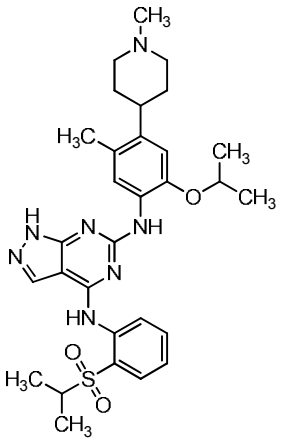
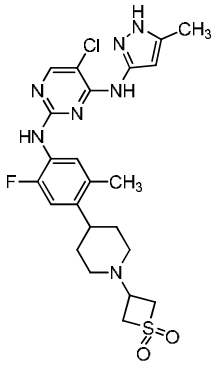
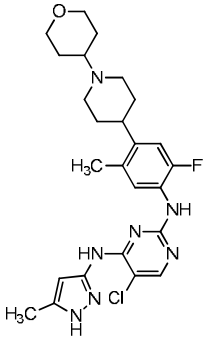
A22 Fosfato de Sonidegib	WO 2007/131201 EP 2021328 US 8.178.563	
A23 Ceritinib ZYKADIA™	WO 2008/073687 US 8.039.479	
A24	US 8,415,355 US 8.685.980	
A25	WO 2010/007120	

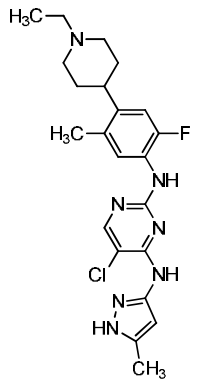
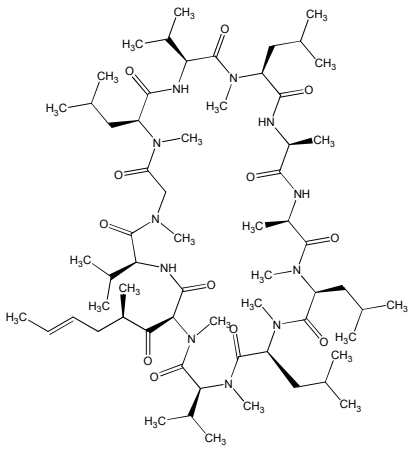
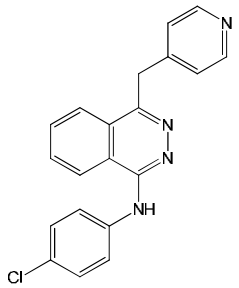
A26	US 7.867.493	anticuerpo monoclonal humano para PRLR
A27	WO 2010/026124 EP 2344474 US 2010/0056576 WO2008/106692	
A28	WO 2010/101849	
A29 Encorafenib	WO 2011/025927	

A30	WO 2011/101409	
A31	WO 2012/022814 EP 2606070 US 8.735.551	anticuerpo monoclonal humano a HER3
A32	WO 2014/160160 Ab: 12425 (véase la Tabla 1, párrafo [00191]) Enlazador: SMCC (véase el párrafo [00117] Carga útil: DM1 (véase el párrafo [00111] Véase también la reivindicación 29	conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC)

A33	WO 2004/045532	Anticuerpo monoclonal o Fab de M-CSF
A34 Binimetinib	WO 2003/077914	
A35 Midostaurina	WO 2003/037347 EP 1441737 US 2012/252785	
A36 Everolimus AFINITOR®	WO 2014/085318	

A37	WO 2007/030377 US 7.482.367	
A38 Diaspartato de pasireotida SIGNIFOR®	WO2002/010192 US 7.473.761	
A39 Dovitinib	WO 2009/115562 US 8,563,556	
A40	WO 2013/184757	

A41	WO 2006/122806	
A42	WO 2008/073687 US 8.372.858	
A43	WO 2010/002655 US 8,519,129	
A44	WO 2010/002655 US 8.519.129	

A45	WO 2010/002655	
A46 Valspodar AMDRAY™	EP 296122	
A47 succinato de Vatalanib	WO 98/35958	 succinato
A48	WO2014/141104	inhibidor de IDH
A49	WO2013/171639 WO2013/171640 WO2013/171641 WO2013/171642	inhibidor de BCR-ABL

A50	WO2014/151616	inhibidor cRAF
A51	WO2015/066188	inhibidor competitivo de ERK1/2 ATP

Líneas celulares inmunomoduladoras

Por "célula tumoral inactivada" se entiende una célula tumoral (bien sea "autóloga" o "alogénica" del paciente) que ha sido tratada para evitar la división de las células. A los efectos de la presente invención, dichas células conservan su inmunogenicidad y su actividad metabólica. Estas células tumorales se modifican genéticamente para expresar un transgén que se expresa dentro de un paciente como parte de la terapia contra el cáncer. Por lo tanto, una composición o vacuna de la invención comprende células neoplásicas (por ejemplo, tumorales) que son autólogas o alogénicas del paciente sometido a tratamiento, y es más preferiblemente el mismo tipo general de células del tumor que padece el paciente. Por ejemplo, a un paciente que padece melanoma se le administrará normalmente una célula modificada genéticamente derivada de un melanoma. Los métodos para la inactivación de células tumorales para su uso en la presente invención, tales como el uso de la irradiación, son bien conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, las células tumorales inactivadas de la presente invención se modifican para expresar y secretar una o más proteínas de choque térmico. Por ejemplo, las proteínas de fusión gp96-Ig se pueden expresar y secretar para estimular una respuesta inmunitaria (Yamazaki et ál., The Journal of Immunology, 1999, 163: 5178-5182; Strbo et ál., Immunol Res. 2013 Dic; 57(1-3): 311-25). En algunas modalidades, se modifican las células tumorales inactivadas para que expresen y secreten una proteína de fusión gp96-Ig. Las células tumorales inactivadas de la presente invención se administran al paciente junto con uno o más agentes o moléculas coestimuladores. Un agente coestimulador preferido comprende una o más citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas. Los métodos para la evaluación de dichos agentes coestimuladores son bien conocidos en la literatura. La inducción y la maduración de las células dendríticas se evalúa típicamente por el aumento en la expresión de ciertas moléculas de membrana tales como CD80 y CD86, y/o la secreción de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-12 e interferones de tipo I después de la estimulación.

En modalidades preferidas, las células tumorales inactivadas mismas se modifican para expresar y secretar una o más citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la

maduración de células dendríticas. La presente invención se describe en términos de ejemplos en relación con el uso del GM-CSF. Por lo tanto, a manera de ejemplo, la célula tumoral puede expresar un transgén que codifica un GM-CSF, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos. N.° 5,637,483, 5,904,920, 6,277,368 y 6,350,445, así como en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.° 20100150946. Una forma de células cancerosas genéticamente modificadas que expresan GM-CSF o una "vacuna celular que expresa citocinas" para el tratamiento del cáncer de páncreas se describe en las Patentes de Estados Unidos N.° 6,033,674 y 5,985,290.

Otras citocinas adecuadas que pueden ser expresadas por dichas células tumorales inactivadas y/o células no específicas en lugar de, o junto con, GM-CSF incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, uno o más de ligando de CD40, ligando de FLT-3, IL-12, CCL3, CCL20 y CCL21. Esta lista no pretende ser restrictiva.

Aunque se prefiere que las células tumorales inactivadas administradas al sujeto expresen una o más citocinas de interés, la línea celular tumoral puede ir acompañada de una línea celular no especificada inactivada que exprese y secrete una o más citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas. La línea celular no especificada puede proporcionar todas las

citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas, o puede complementar las citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas expresadas y secretadas por las células tumorales inactivadas. A manera de ejemplo, las líneas celulares no especificadas que expresan citocinas inmunomoduladoras se divulgan en las Patentes de los Estados Unidos. N.° 6,464,973 y 8,012,469, Dessureault et ál., Ann. Surg. Oncol. 14: 869-84, 2007, y Eager y Nemunaitis, Mol. Ther. 12: 18-27, 2005.

Por "polipéptido de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)" se entiende una citocina o fragmento de esta que tiene actividad inmunomoduladora y que tiene al menos aproximadamente 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos frente a N.° de Acceso GenBank AAA52122.1.

Vacunas

En determinadas modalidades, las composiciones de CDN se administran junto con una o más vacunas cuyo propósito es estimular una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos predeterminados. Ejemplos de antígenos diana que pueden ser útiles en la invención se enumeran en la siguiente tabla. El antígeno diana puede ser también un fragmento o polipéptido de fusión que comprende una parte inmunológicamente activa de los

antígenos enumerados en la tabla. Esta lista no pretende ser restrictiva.

Tabla 1. Antígenos.

Antígeno	Referencia
Antígenos tumorales	
Mesotelina	N.° de Acc. GenBank NM_005823; U40434; NM_013404; BC003512 (véase también, por ejemplo, Hassan, *et ál*. (2004) Clin. Cancer Res. 10:3937-3942; Muminova, *et ál*. (2004) BMC Cancer 4: 19; Iacobuzio-Donahue, *et ál*. (2003) Cancer Res. 63: 8614-8622).
Proteína asociada al tumor de Wilms 1 (Wt-1), incluyendo isoforma A; isoforma B; isoforma C; isoforma D.	WT-1 isoforma A (N.° de Acc. GenBank NM 000378; NP_000369). WT-1 isoforma B (N.° de Acc. GenBank NM 024424; NP_077742). WT-1 isoforma C (N.° de Acc. GenBank NM 024425; NP_077743). WT-1 isoforma D (N.° de Acc. GenBank NM 024426; NP_077744).

Enzima quimotríptica del estrato córneo. (SCCE), y variantes de esta.	N.° de Acc. GenBank NM_005046; NM_139277; AF332583. Véase también, por ejemplo, Bondurant, *et ál*. (2005) Clin. Cancer Res. 11: 3446-3454; Santin, *et ál*. (2004) Gynecol. Oncol. 94: 283-288; Shigemasa, *et ál*. (2001) Int. J. Gynecol. Cancer 11: 454-461; Sepehr, *et ál*. (2001) Oncogene 20: 7368-7374.
proteína relacionada con la cadena A MHC de clase I (MICA); proteína relacionada con la cadena B MHC de clase I (MICB).	Véase, por ejemplo, Groh, *et ál*. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 102: 6461-6466; N.° de Acc. GenBank NM_000247; BC_016929; AY750850; NM_005931.
Gastrina y péptidos derivados de la gastrina; receptor de gastrina/CCK-2 (también conocido como CCK-B).	Harris, *et ál*. (2004) Cancer Res. 64: 5624-5631; Gilliam, *et ál*. (2004) Eur. J. Surg. Oncol. 30: 536-543; Laheru y Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5: 459-467.

Glipicano-3 (un antígeno de, por ejemplo, carcinoma hepatocelular y melanoma).	N.° de Acc. GenBank NM 004484. Nakatsura, *et ál*. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 306: 16-25; Capurro, *et ál*. (2003) Gasteroenterol. 125: 89-97; Nakatsura, *et ál*. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 6612-6621).
Proteína de tipo coactosina.	Nakatsura, *et ál*. (2002) Eur. J. Immunol. 32: 826-836; Laheru y Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5: 459-467.
Antígeno de células madre de próstata (PSCA).	N.° de Acc. GenBank AF043498; AR026974; AR302232 (véase también, por ejemplo, Argani, *et ál*. (2001) Cancer Res. 61: 4320-4324; Christiansen, *et ál*. (2003) Prostate 55: 9-19; Fuessel, *et ál*. (2003) 23: 221-228).
Fosfatasa ácida prostática (PAP); Antígeno específico de próstata (PSA); PSM; PSMA.	Small, *et ál*. (2000) J. Clin. Oncol. 18: 3894-3903; Altwein y Luboldt (1999) Urol. Int. 63: 62-71; Chan, *et ál*. (1999) Prostate 41: 99-109; Ito, *et ál*. (2005) Cancer 103: 242-250; Schmittgen, *et ál*. (2003) Int. J. Cancer 107: 323-329; Millon, *et ál*. (1999) Eur. Urol. 36: 278-285.

Antígeno epitelial de seis transmembranas de próstata (STEAP).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, *et ál.* (2005) Cancer Res. 65: 6435-6442; N.° de Acc. GenBank NM_018234; NM_001008410; NM_182915; NM_024636; NM_012449; BC011802.
Antígeno-1 de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, *et ál.* (2005) Cancer Res. 65: 6435-6442; N.° de Acc. GenBank L78132.
Gen-1 inductor de tumor de próstata (PTI-1).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, *et ál.* (2005) Cancer Res. 65: 6435-6442).
Gen específico de la próstata con homología con el receptor acoplado a proteína G.	Véase, por ejemplo, Machlenkin, *et ál.* (2005) Cancer Res. 65: 6435-6442).

Prostasa (una serina proteasa regulada por andrógeno).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, *et ál.* (2005) Cancer Res. 65: 6435-6442; N.° de Acc. GenBank BC096178; BC096176; BC096175.
Proteinasa 3.	N.° de Acc. GenBank X55668.
Antígenos de cáncer testicular, por ejemplo, NY-ESO-1; SCP-1; SSX-1; SSX-2; SSX-4; GAGE, CT7; CT8; CT10; MAGE-1; MAGE-2; MAGE-3; MAGE-4; MAGE-6; LAGE-1.	N.° de Acc. GenBank NM_001327 (NY-ESO-1) (véase también, por ejemplo, Li, *et ál.* (2005) Clin. Cancer Res. 11: 1809-1814; Chen, *et ál.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(25): 9363-9368; Kubuschok, *et ál.* (2004) Int. J. Cancer. 109: 568-575; Scanlan, *et ál.* (2004) Cancer Immun. 4: 1; Scanlan, *et ál.* (2002) Cancer Res. 62: 4041-4047; Scanlan, *et ál.* (2000) Cancer Lett. 150: 155-164; Dalerba, *et ál.* (2001) Int. J. Cancer 93: 85-90; Ries, *et ál.* (2005) Int. J. Oncol. 26: 817-824.

MAGE-A1, MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-A10; MAGE-A12; GAGE-3/6; NT-SAR-35; BAGE; CA125.	Otte, *et ál*. (2001) Cancer Res. 61: 6682-6687; Lee, *et ál*. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 100:2651-2656; Sarcevic, *et ál*. (2003) Oncology 64: 443-449; Lin, *et ál*. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 5708-5716.
GAGE-1; GAGE-2; GAGE-3; GAGE-4; GAGE-5; GAGE-6; GAGE-7; GAGE-8; GAGE-65; GAGE-11; GAGE-13; GAGE-7B.	De Backer, *et ál*. (1999) Cancer Res. 59: 3157-3165; Scarcella, *et ál*. (1999) Clin. Cancer Res. 5: 335-341.
HIP1R; LMNA; KIAA1416; Seb4D; KNSL6; TRIP4; MBD2; HCAC5; MAGEA3.	Scanlan, *et ál*. (2002) Cancer Res. 62: 4041-4047.

Familia de genes DAM, por ejemplo, DAM-1; DAM-6.	Fleishhauer, *et ál*. (1998) Cancer Res. 58: 2969-2972.
RCAS1.	Enjoji, *et ál*. (2004) Dig. Dis. Sci. 49: 1654-1656.
RU2.	Van Den Eynde, *et ál*. (1999) J. Exp. Med. 190: 1793-1800.
CAMEL.	Slager, *et ál*. (2004) J. Immunol. 172: 5095-5102; Slager, *et ál*. (2004) Cancer Gene Ther. 11: 227-236.
Antígenos asociados al cáncer de colon, por ejemplo, NY-CO-8; NY-CO-9; NY-CO-13; NY-CO-16; NY-CO-20; NY-CO-38; NY-CO-45; NY-CO-9/HDAC5; NY-CO-41/MBD2; NY-CO-42/TRIP4; NY-CO-95/KIAA1416; KNSL6; seb4D.	Scanlan, *et ál*. (2002) Cancer Res. 62: 4041-4047.

N-acetilglucosaminil-transferasa V (GnT-V).	Dosaka-Akita, *et ál*. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 1773-1779.
Factor de elongación 2 mutado (ELF2M).	Renkvist, *et ál*. (2001) Cancer Immunol Immunother. 50: 3-15.
HOM-MEL-40/SSX2	Neumann, *et ál*. (2004) Int. J. Cancer 112: 661-668; Scanlan, *et ál*. (2000) Cancer Lett. 150: 155-164.
BRDT.	Scanlan, *et ál*. (2000) Cancer Lett. 150: 155-164.
SAGE; HAGE.	Sasaki, *et ál*. (2003) Eur. J. Surg. Oncol. 29: 900-903.
RAGE.	Véase, por ejemplo, Li, *et ál*. (2004) Am. J. Pathol. 164: 1389-1397; Shirasawa, *et ál*. (2004) Genes to Cells 9: 165-174.

MUM-1 (melanoma ubicuo mutado); MUM-2; mutación Gly-ARg MUM-2; MUM-3.	Gueguen, *et ál*. (1998) J. Immunol. 160: 6188-6194; Hirose, *et ál*. (2005) Int. J. Hematol. 81: 48-57; Baurain, *et ál*. (2000) J. Immunol. 164: 6057-6066; Chiari, *et ál*. (1999) Cancer Res. 59: 5785-5792.
Antígeno de melanoma de proteína de fusión LDLR/FUT	Wang, *et ál*. (1999) J. Exp. Med. 189: 1659-1667.
Serie NY-REN de antígenos de cáncer renal.	Scanlan, *et ál*. (2002) Cancer Res. 62: 4041-4047; Scanlan, *et ál*. (1999) Cancer Res. 83: 456-464.
Serie NY-BR de antígenos del cáncer de mama, por ejemplo, NY-BR-62; NY-BR-75; NY-BR-85; NY-BR-62; NY-BR-85.	Scanlan, *et ál*. (2002) Cancer Res. 62: 4041-4047; Scanlan, *et ál*. (2001) Cancer Immunity 1: 4.

BRCA-1; BRCA-2.	Stolier, *et ál*. (2004) Breast J. 10: 475-480; Nicoletto, *et ál*. (2001) Cancer Treat Rev. 27: 295-304.
Proteína de fusión DEK/CAN.	Von Lindern, *et ál*. (1992) Mol. Cell. Biol. 12: 1687-1697.
Ras, por ejemplo, ras de tipo silvestre, ras con mutaciones en el codón 12, 13, 59 o 61, por ejemplo, mutaciones G12C; G12D; G12R; G12S; G12V; G13D; A59T; Q61H. K-RAS; H-RAS; N-RAS.	N.° de Acc. GenBank P01112; P01116; M54969; M54968; P01111; P01112; K00654. Véase también, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank M26261; M34904; K01519; K01520; BC006499; NM_006270; NM_002890; NM_004985; NM_033360; NM_176795; NM_005343.

BRAF (una isoforma de RAF).	Tannapfel, *et ál*. (2005) Am. J. Clin. Pathol. 123: 256-260l; Tsao y Sober (2005) Dermatol. Clin. 23: 323-333.
Antígenos de melanoma, incluyendo antígenos de células de melanoma HST-2.	N.° de Acc. GenBank NM_206956; NM_206955; NM_206954; NM_206953; NM_006115; NM_005367; NM_004988; AY148486; U10340; U10339; M77481. Véase, por ejemplo, Suzuki, *et ál*. (1999) J. Immunol. 163: 2783-2791.
Survivin	N.° de Acc. GenBank AB028869; U75285 (véase también, por ejemplo, Tsuruma, *et ál*. (2004) J. Translational Med. 2:19 (11 páginas); Pisarev, *et ál*. (2003) Clin. Cancer Res. 9: 6523-6533; Siegel, *et ál*. (2003) Br. J. Haematol. 122: 911-914; Andersen, *et ál*. (2002) Histol. Histopathol. 17: 669-675).
MDM-2	NM 002392; NM 006878 (véase también, por ejemplo, Mayo, *et ál*. (1997) Cancer Res. 57: 5013-5016; Demidenko y Blagosklonny (2004) Cancer Res. 64: 3653-3660).

Proteínas de unión a metil-CpG (MeCP2; MBD2).	Muller, *et ál*. (2003) Br. J. Cancer 89: 1934-1939; Fang, *et ál*. (2004) World J. Gastreenterol. 10: 3394-3398.
NA88-A.	Moreau-Aubry, *et ál*. (2000) J. Exp. Med. 191: 1617-1624.
Desacetilasas de histonas (HDAC), por ejemplo, HDAC5.	Waltregny, *et ál*. (2004) Eur. J. Histochem. 48: 273-290; Scanlan, *et ál*. (2002) Cancer Res. 62: 4041-4047.
Ciclofilina B (Cyp-B).	Tamura, *et ál*. (2001) Jpn. J. Cancer Res. 92: 762-767.
CA 15-3; CA 27.29.	Clinton, *et ál*. (2003) Biomed. Sci. Instrum. 39: 408-414.
Proteína de choque térmico Hsp70.	Faure, *et ál*. (2004) Int. J. Cancer 108: 863-870.

Familia GAGE/PAGE, por ejemplo, PAGE-1; PAGE-2; PAGE-3; PAGE-4; XAGE-1; XAGE-2; XAGE-3.	Brinkmann, *et ál*. (1999) Cancer Res. 59: 1445-1448.
Familias MAGE-A, B, C y D. MAGE-B5; MAGE-B6; MAGE-C2; MAGE-C3; MAGE-3; MAGE-6.	Lucas, *et ál*. (2000) Int. J. Cancer 87: 55-60; Scanlan, *et ál*. (2001) Cancer Immun. 1: 4.
Quinesina 2; factor 1 modulador del elemento TATA; proteína tumoral D53; NY	Scanlan, *et ál*. (2001) Cancer Immun. 30: 1-4.
Alfa-fetoproteína (AFP)	Grimm, *et ál*. (2000) Gastroenterol. 119: 1104-1112.

SART1; SART2; SART3; ART4.	Kumamuru, *et ál*. (2004) Int. J. Cancer 108: 686-695; Sasatomi, *et ál*. (2002) Cancer 94: 1636-1641; Matsumoto, *et ál*. (1998) Jpn. J. Cancer Res. 89: 1292-1295; Tanaka, *et ál*. (2000) Jpn. J. Cancer Res. 91: 1177-1184.
Antígeno de melanoma expresado preferencialmente (PRAME).	Matsushita, *et ál*. (2003) Leuk. Lymphoma 44: 439-444; Oberthuer, *et ál*. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 4307-4313.
Antígeno carcinoembrionario (CEA), péptido agonista potenciador CAP1-6D.	N.° de Acc. GenBank M29540; E03352; X98311; M17303 (véase también, por ejemplo, Zaremba (1997) Cancer Res. 57: 4570-4577; Sarobe, *et ál*. (2004) Curr. Cancer Drug Targets 4: 443-454; Tsang, *et ál*. (1997) Clin. Cancer Res. 3: 2439-2449; Fong, *et ál*. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 98: 8809-8814).
HER-2/neu.	Disis, *et ál*. (2004) J. Clin. Immunol. 24: 571-578; Disis y Cheever (1997) Adv. Cancer Res. 71: 343-371.

Cdk4; cdk6; p16 (INK4); proteína Rb.	Ghazizadeh, *et ál*. (2005) Respiration 72: 68-73; Ericson, *et ál*. (2003) Mol. Cancer Res. 1: 654-664.
TEL; AML1; TEL/AML1.	Stams, *et ál*. (2005) Clin. Cancer Res. 11: 2974-2980.
Telomerasa (TERT).	Nair, *et ál*. (2000) Nat. Med. 6: 1011-1017.
707-AP.	Takahashi, *et ál*. (1997) Clin. Cancer Res. 3: 1363-1370.
Anexina, por ejemplo, anexina II.	Zimmerman, *et ál*. (2004) Virchows Arch. 445: 368-374.
BCR/ABL; BCR/ABL p210; BCR/ABL p190; CML-66; CML-28.	Cobaldda, *et ál*. (2000) Blood 95: 1007-1013; Hakansson, *et ál*. (2004) Leukemia 18: 538-547; Schwartz, *et ál*. (2003) Semin. Hematol. 40: 87-96; Lim, *et ál*. (1999) Int. J. Mol. Med. 4: 665-667.

BCL2; BLC6; proteína CD10.	Iqbal, *et ál*. (2004) Am. J. Pathol. 165: 159-166.
CDC27 (este es un antígeno de melanoma).	Wang, *et ál*. (1999) Science 284: 1351-1354.
Proteína de esperma 17 (SP17); 14-3-3-zeta; MEMD; KIAA0471; TC21.	Arora, *et ál*. (2005) Mol. Carcinog. 42: 97-108.
Proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa (TRP-1 y TRP-2).	N.° de Acc. GenBank NM_001922. (véase también, por ejemplo, Bronte, *et ál*. (2000) Cancer Res. 60: 253-258).
Gp100/pmel-17.	N.° de Acc. GenBank AH003567; U31798; U31799;U31807; U31799 (véase, por ejemplo, Bronte, *et ál*. (2000) Cancer Res. 60: 253-258).
TARP.	Véase, por ejemplo, Clifton, *et ál*. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 101: 10166-10171; Virok, *et ál*. (2005) Infection Immunity 73: 1939-1946.

Proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa (TRP-1 y TRP-2).	N.° de Acc. GenBank NM_001922. (véase también, por ejemplo, Bronte, *et ál*. (2000) Cancer Res. 60: 253-258).
Receptor de melanocortina 1 (MC1R); MAGE-3; gp100; tirosinasa; tautomerasa dopacromo (TRP-2); MART-1.	Salazar-Onfray, *et ál*. (1997) Cancer Res. 57: 4348-4355; Reynolds, *et ál*. (1998) J. Immunol. 161: 6970-6976; Chang, *et ál*. (2002) Clin. Cancer Res. 8: 1021-1032.
MUC-1; MUC-2.	Véase, por ejemplo, Davies, *et ál*. (1994) Cancer Lett. 82: 179-184; Gambus, *et ál*. (1995) Int. J. Cancer 60: 146-148; McCool, *et ál*. (1999) Biochem. J. 341: 593-600.
Spas-1.	Solicitud de pat. de EE UU. publicada N.° 20020150588 de Allison, *et ál*.
CASP-8; FLICE; MACH.	Mandruzzato, *et ál*. (1997) J. Exp. Med. 186: 785-793.

CEACAM6; CAP-1.	Duxbury, *et ál*. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun. 317: 837-843; Morse, *et ál*. (1999) Clin. Cancer Res. 5: 1331-1338.
HMGB1 (una proteína de unión a ADN y citocina).	Brezniceanu, *et ál*. (2003) FASEB J. 17: 1295-1297.
ETV6/AML1.	Codrington, *et ál*. (2000) Br. J. Haematol. 111: 1071-1079.
Formas mutantes y de tipo silvestre de la poliposis adenomatosa coli (APC); beta-catenina; c-Met; p53; E-cadherina; ciclooxigenasa-2 (COX-2).	Clements, *et ál*. (2003) Clin. Colorectal Cancer 3: 113-120; Gulmann, *et ál*. (2003) Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 11: 230-237; Jungck, *et ál*. (2004) Int. J. Colorectal. Dis. 19: 438-445; Wang, *et ál*. (2004) J. Surg. Res. 120: 242-248; Abutaily, *et ál*. (2003) J. Pathol. 201: 355-362; Liang, *et ál*. (2004) Br. J. Surg. 91: 355-361; Shirakawa, *et ál*. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 4342-4348.

Antígeno de carcinoma de células renales unido al anticuerpo monoclonal G250.	Mulders, *et ál.* (2003) Urol. Clin. North Am. 30: 455-465; Steffens, *et ál.* (1999) Anticancer Res. 19: 1197-1200.
EphA2	Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N.° 2005/0281783 A1; N.° de Acceso GenBank NM_004431 (humano); N.° de Acceso GenBank NM_010139 (ratón); N.° de Acceso GenBank AB038986 (pollo, secuencia parcial); N.° de Acceso GenBank NP_004422, AAH37166 y AAA53375 (humano); N.° de Acceso GenBank NP_034269 (ratón), AAH06954 (ratón), XP_345597 (rata) y BAB63910 (pollo).
EGFRvIII	Véase, por ejemplo, WO/2012/068360

Antígenos de *Francisella tularensis*	
Francisella tularensis A y B.	Genoma completo de subespecies Schu S4 (N.° de Acc. GenBank AJ749949); de subespecies Schu 4 (N.° de Acc. GenBank NC_006570). Proteína de membrana externa (43 kDa) Bevanger, *et ál*. (1988) J. Clin. Microbiol. 27: 922-926; Porsch-Ozcurumez, *et ál*. (2004) Clin. Diagnostic. Lab. Immunol. 11: 1008-1015). Los componentes antigénicos de *F. tularensis* incluyen, por ejemplo, 80 antígenos, que incluyen chaperoninas de 10 kDa y 60 kDa (Havlasova, *et ál*. (2002) Proteomics 2: 857-86), nucleósido-difosfato cinasa, isocitrato deshidrogenasa, proteína Hfq de unión a ARN, chaperona ClpB (Havlasova, *et ál*. (2005) Proteomics 5: 2090-2103). Véase también, por ejemplo, Oyston y Quarry (2005) Antonie Van Leeuwenhoek 87:277-281; Isherwood, *et ál*. (2005) Adv. Drug Deliv. Rev. 57: 1403-1414; Biagini, *et ál*. (2005) Anal. Bioanal. Chem. 382: 1027-1034.

Antígenos de malaria	
Proteína circumsporozoito (CSP); SSP2; HEP17; Ortólogos Exp-1 encontrados en P. falciparum; y LSA-1.	Véase, por ejemplo, Haddad, *et ál*. (2004) Infection Immunity 72: 1594-1602; Hoffman, *et ál*. (1997) Vaccine 15: 842-845; Oliveira-Ferreira y Daniel-Ribeiro (2001) Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 96: 221-227. CSP (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AB121024). SSP2 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AF249739). LSA-1 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank Z30319).
Proteína superficial de eritrocitos de anillo infectado (RESA); proteína superficial de merozoitos 2 (PSM2); Spf66; proteína superficial de merozoitos 1 (MSP1); 195A; BVp42.	Véase, por ejemplo, Stirnadel, *et ál*. (2000) Int. J. Epidemiol. 29: 579-586; Krzych, *et ál*. (1995) J. Immunol. 155: 4072-4077. Véase también, Good, *et ál*. (2004) Immunol. Rev. 201: 254-267; Good, *et ál*. (2004) Ann. Rev. Immunol. 23: 69-99. MSP2 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank X96399; X96397). MSP1 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank X03371). RESA (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank X05181; X05182).

Antígeno apical de membrana 1 (AMA1).	Véase, por ejemplo, Gupta, *et ál*. (2005) Protein Expr. Purif. 41: 186-198. AMA1 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank A`13; AJ494905; AJ490565).
Virus y antígenos virales	
Hepatitis A	N.° de Acc. GenBank, por ejemplo, NC_001489.; AY644670; X83302; K02990; M14707.
Hepatitis B	Genoma completo (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AB214516; NC_003977; AB205192; AB205191; AB205190; AJ748098; AB198079; AB198078; AB198076; AB074756).
Hepatitis C	Genoma completo (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_004102; AJ238800; AJ238799; AJ132997; AJ132996; AJ000009; D84263).
Hepatitis D	N.° de Acc. GenBank, por ejemplo, NC_001653; AB118847; AY261457.

Virus del papiloma humano, incluyendo más de 200 subtipos (clasificados en 16 grupos), tales como los subtipos de alto riesgo 16, 18, 30, 31, 33, 45.	Véase, por ejemplo, Trimble, *et ál*. (2003) Vaccine 21: 4036-4042; Kim, *et ál*. (2004) Gene Ther. 11: 1011-1018; Simon, *et ál*. (2003) Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 109: 219-223; Jung, *et ál*. (2004) J. Microbiol. 42: 255-266; Damasus-Awatai y Freeman-Wang (2003) Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 15: 473-477; Jansen y Shaw (2004) Annu. Rev. Med. 55: 319-331; Roden y Wu (2003) Expert Rev. Vaccines 2: 495-516; de Villiers, *et ál*. (2004) Virology 324: 17-24; Hussain y Paterson (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54: 577-586; Molijn, *et ál*. (2005) J. Clin. Virol. 32 (Suppl. 1) S43-S51. Nos. de Acc. GenBank AY686584; AY686583; AY686582; NC_006169; NC_006168; NC_006164; NC_001355; NC_001349; NC_005351; NC_001596).

Virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV) tipos I y II, el HTLV tipo I subtipos Cosmopolita, África Central y región Austro-Melanesia, y el HTLV tipo II subtipos Iia, Iib, Iic y Iid.	Véase, por ejemplo, Capdepont, *et ál*. (2005) AIDS Res. Hum. Retrovirus 21: 28-42; Bhigjee, *et ál*. (1999) AIDS Res. Hum. Restrovirus 15: 1229-1233; Vandamme, *et ál*. (1998) J. Virol. 72: 4327-4340; Vallejo, *et ál*. (1996) J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 13: 384-391. HTLV tipo I (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY563954; AY563953. HTLV tipo II (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank L03561; Y13051; AF139382).
Coronaviridae, incluyendo coronavirus, tales como SARS-coronavirus (SARS-CoV) y torovirus.	Véase, por ejemplo, Brian y Baric (2005) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 287: 1-30; Gonzalez, *et ál*. (2003) Arch. Virol. 148: 2207-2235; Smits, *et ál*. (2003) J. Virol. 77: 9567-9577; Jamieson, *et ál*. (1998) J. Infect. Dis. 178:1263-1269 (N.° de Acc. GenBank AY348314; NC_004718; AY394850).

Virus de la rubéola.	N.° de Acc. GenBank NC_001545; AF435866.
Virus de las paperas, incluyendo los genotipos A, C, D, G, H e I.	Véase, por ejemplo, Orvell, et ál. (2002) J. Gen. Virol. 83: 2489-2496. Véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY681495; NC_002200; AY685921; AF201473.
Virus coxsackie A, incluyendo los serotipos 1, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 24 (también conocido como enterovirus humano C; HEV-C).	Véase, por ejemplo, Brown, *et ál*. (2003) J. Virol. 77: 8973-8984. N.° de Acc. GenBank AY421768; AY790926: X67706.
Virus de coxsackie B, incluyendo los subtipos 1-6.	Véase, por ejemplo, Ahn, *et ál*. (2005) J. Med. Virol. 75: 290-294; Patel, *et ál*. (2004) J. Virol. Métodos 120: 167-172; Rezig, *et ál*. (2004) J. Med. Virol. 72: 268-274. N.° de Acc. GenBank X05690.

Enterovirus humano, incluyendo, por ejemplo, enterovirus humano A (VHE-A, CAV2 a CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16 y EV71), incluyendo también VHE-B (CAV9, CBV1 a CBV6, E1 a E7, E9, E11 a E21, E24 a E27, E29 a E33, y E73 y EV69), así como HEV.	Véase, por ejemplo, Oberste, *et ál*. (2004) J. Virol. 78: 855-867. Enterovirus humano (N.° de Acc. GenBank NC_001612).; enterovirus humano B (NC_001472); enterovirus humano C (NC_001428); enterovirus humano D (NC_001430). Enterovirus de simio (N.° de Acc. GenBank NC_003988).
Poliovirus, incluyendo PV1, PV2 y VP3.	Véase, por ejemplo, He, *et ál*. (2003) J. Virol. 77: 4827-4835; Hahsido, *et ál*. (1999) Microbiol. Immunol. 43: 73-77. N.° de Acc. GenBank AJ132961 (tipo 1); AY278550 (tipo 2); X04468 (tipo 3).

Virus de encefalitis virales, incluyendo el virus de la encefalitis equina, la encefalitis equina venezolana (EEV) (incluyendo los subtipos IA, IB, IC, ID, IIIC, IIID), la encefalitis equina oriental (EEE), la encefalitis equina occidental (WEE), la encefalitis de San Luis, la encefalitis de Murray Valley (australiana), la encefalitis japonesa y encefalitis generada por garrapatas.	Véase, por ejemplo, Hoke (2005) Mil. Med. 170: 92-105; Estrada-Franco, *et ál*. (2004) Emerg. Infect. Dis. 10: 2113-2121; Das, *et ál*. (2004) Antiviral Res. 64: 85-92; Aguilar, *et ál*. (2004) Emerg. Infect. Dis. 10: 880-888; Weaver, *et ál*. (2004) Arch. Virol. Suppl. 18: 43-64; Weaver, *et ál*. (2004) Annu. Rev. Entomol. 49: 141-174. Encefalitis equina oriental (N.° de Acc. GenBank NC_003899; AY722102); Encefalitis equina occidental (NC_003908).

Herpesvirus humano, incluyendo el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV), herpesvirus-1 humano (HHV-1), HHV-2, HHV-3, HHV-4, HHV-5, HHV-6, HHV-7, HHV-8, el virus herpes B, el virus del herpes simple tipos 1 y 2 (HSV-1, HSV-2) y el virus de la varicela zoster (VZV).	Véase, por ejemplo, Studahl, *et ál*. (2000) Scand. J. Infect. Dis. 32: 237-248; Padilla, *et ál*. (2003) J. Med. Virol. 70 (Suppl. 1) S103-S110; Jainkittivong y Langlais (1998) Oral Surg. Oral Med. 85: 399-403. Nos. de Acc. GenBank NC_001806 (virus del herpes 1); NC_001798 (virus del herpes 2); X04370 y NC_001348 (virus del herpes 3); NC_001345 (virus del herpes 4); NC_001347 (virus del herpes 5); X83413 y NC_000898 (virus del herpes 6); NC_001716 (virus del herpes 7). Los virus del herpes humano tipos 6 y 7 (HHV-6; HHV-7) han sido divulgados en, por ejemplo, Padilla, *et ál*. (2003) J. Med. Virol. 70 (Suppl. 1) S103-S110. El virus del herpes humano 8 (HHV-8), incluyendo los subtipos A-E, se divulga en, por ejemplo, Treurnicht, *et ál*. (2002) J. Med. Virul. 66: 235-240.

VIH-1, incluyendo el grupo M (incluyendo los subtipos de A a J) y el grupo O (incluyendo todos los subtipos distinguibles) (VIH-2, incluyendo los subtipos A-E.	Véase, por ejemplo, Smith, *et ál*. (1998) J. Med. Virol. 56: 264-268. Véase también, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank DQ054367; NC_001802; AY968312; DQ011180; DQ011179; DQ011178; DQ011177; AY588971; AY588970; AY781127; AY781126; AY970950; AY970949; AY970948; X61240; AJ006287; AJ508597; y AJ508596.
Virus de Epstein-Barr (EBV), incluyendo los subtipos A y B.	Véase, por ejemplo, Peh, *et ál*. (2002) Pathology 34: 446-450. Virus de Epstein-Barr, cepa B95-8 (N.° de Acc. GenBank V01555).
Reovirus, incluyendo los serotipos y cepas 1, 2, y 3, tipo 1 Lang, tipo 2 Jones y tipo 3 Dearing.	Véase, por ejemplo, Barthold, *et ál*. (1993) Lab. Anim. Sci. 43: 425-430; Roner, *et ál*. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 92: 12362-12366; Kedl, *et ál*. (1995) J. Virol. 69: 552-559. N.° de Acc. GenBank K02739 (proteína superficial sigma-3 gen).

Los subtipos de citomegalovirus (CMV) incluyen los subtipos I-VII de CMV.	Véase, por ejemplo, Chern, *et ál*. (1998) J. Infect. Dis. 178: 1149-1153; Vilas Boas, *et ál*. (2003) J. Med. Virol. 71: 404-407; Trincado, *et ál*. (2000) J. Med. Virol. 61: 481-487. N.° de Acc. GenBank X17403.
Rinovirus, incluyendo todos los serotipos.	Rinovirus humano 2 (N.° de Acc. GenBank X02316); Rinovirus humano B (N.° de Acc. GenBank NC_001490); Rinovirus humano 89 (N.° de Acc. GenBank NC_001617); Rinovirus humano 39 (N.° de Acc. GenBank AY751783).
Adenovirus, incluyendo todos los serotipos.	AY803294; NC_004001; AC_000019; AC_000018; AC_000017; AC_000015; AC_000008; AC_000007; AC_000006; AC_000005; AY737798; AY737797; NC_003266; NC_002067; AY594256; AY594254; AY875648; AJ854486; AY163756; AY594255; AY594253; NC_001460; NC_001405; AY598970; AY458656; AY487947; NC_001454; AF534906; AY45969; AY128640; L19443; AY339865; AF532578.

Filovirus, incluyendo el virus de Marburg y el virus Ébola, y las cepas tales como el Ébola-Sudán (EBO-S), Ébola-Zaire (EBO-Z) y Ébola-Reston (EBO-R).	Véase, por ejemplo, Geisbert y Jahrling (1995) Virus Res. 39: 129-150; Hutchinson, *et ál*. (2001) J. Med. Virol. 65: 561-566. Virus de Marburg (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_001608). Virus del Ébola (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_006432; AY769362; NC_002549; AF272001; AF086833).
Arenavirus, incluyendo el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), el virus de Lassa, el virus de Junin y el virus Machupo.	Virus Junin, segmento S (N.° de Acc. GenBank NC_005081); Virus Junin, segmento L (N.° de Acc. GenBank NC_005080).
Virus de la rabia.	Véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_001542; AY956319; AY705373; AF499686; AB128149; AB085828; AB009663.

Arbovirus, incluyendo el virus del Nilo Occidental, el virus 1 a 4 del Dengue, el virus de la fiebre de Colorado, el virus Sindbis, Togaviraidae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, y similares.	Virus del Dengue tipo 1 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AB195673; AY762084). Virus del Dengue tipo 2 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_001474; AY702040; AY702039; AY702037). Virus del Dengue tipo 3 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY923865; AT858043). Virus del Dengue tipo 4 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank Y947539; AY947539; AF326573). Virus Sindbis (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_001547; AF429428; J02363; AF103728). Virus del Nilo Occidental (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_001563; AY603654).

Poxvirus, incluyendo ortopoxvirus (virus de la viruela, virus de la viruela de mono, virus vacuna, virus de la viruela bovina), yatapoxvirus (virus tanapox, virus del tumor del mono de Yaba), parapoxvirus y molluscipoxvirus.	Virus de la viruela (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_001611; Y16780; X72086; X69198).
Fiebre amarilla.	Véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_002031; AY640589; X03700.

Hantavirus, incluyendo los serotipos Hantaan (HTN), Seúl (SEO), Dobrava (DOB), Sin Nombre (SN), Puumala (PUU) y Saaremaa tipo Drovaba (SAAV).	Véase, por ejemplo, Elgh, *et ál*. (1997) J. Clin. Microbiol. 35: 1122-1130; Sjolander, *et ál*. (2002) Epidemiol. Infect. 128: 99-103; Zeier, *et ál*. (2005) Virus Genes 30: 157-180. N.° de Acc. GenBank NC_005222 y NC_005219 (Hantavirus). Véase también, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_005218; NC_005222; NC_005219.
Flavivirus, incluyendo el virus del dengue, el virus de la encefalitis japonesa, el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla.	Véase, por ejemplo, Mukhopadhyay, *et ál*. (2005) Nature Rev. Microbiol. 3: 13-22. N.° de Acc. GenBank NC_001474 y AY702040 (Dengue). N.° de Acc. GenBank NC_001563 y AY603654.

Virus del sarampión.	Véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AB040874 y AY486084.
Virus de la parainfluenza humanos (VPH), incluyendo los tipos 1-56 de VPH.	Virus de la parainfluenza humano 2 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AB176531; NC003443). Virus de la parainfluenza humano 3 (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_001796).
Virus de la influenza, incluyendo los tipos de virus de la influenza A, B y C.	Nucleocápside de la influenza (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY626145). Hemaglutinina de la influenza (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY627885; AY555153). Neuraminidasa de la influenza (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY555151; AY577316). Proteína 2 matriz de la influenza (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY626144). Proteína 1 básica de la influenza (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY627897). Proteína ácida de la polimerasa de la influenza (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY627896). Nucleoproteína de la influenza (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank N.° AY627895).

Subtipos de virus de la influenza A, por ejemplo, virus porcinos (SIV): Influenza A H1N1 y virus de la influenza porcina.	Hemaglutinina del virus H1N1 (N.° de Acc. GenBank S67220). Proteína matriz del virus de la influenza A (N.° de Acc. GenBank AY700216). Nucleoproteína del virus de la influenza A H5H1 (N.° de Acc. GenBank AY646426). Hemaglutinina de H1N1 (N.° de Acc. GenBank D00837). Véase también, N.° de Acc. GenBank BD006058; BD006055; BD006052. Ver también, por ejemplo, Wentworth, *et ál.* (1994) J. Virol. 68: 2051-2058; Wells, *et ál.* (1991) J.A.M.A. 265: 478-481.
Virus sincitial respiratorio (RSV), incluyendo el subgrupo A y el subgrupo B.	Virus sincitial respiratorio (RSV) (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY353550; NC_001803; NC001781).

Rotavirus, incluyendo rotavirus humanos A a E, rotavirus bovino, rotavirus de monos rhesus y recombinaciones humano-RVV.	Segmento 8 de rotavirus humano C (N.° de Acc. GenBank AJ549087); proteína de la cápside externa de la cepa G9 de rotavirus humano (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank DQ056300); proteína 4 no estructural de la cepa B de rotavirus humano (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank N.° AY548957); proteína de la cápside externa de la cepa A de rotavirus humano (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank N.° AY601554).
Poliomavirus, incluyendo virus de simio 40 (SV40), virus JC (JCV) y virus BK (BKV).	Véase, por ejemplo, Engels, *et ál*. (2004) J. Infect. Dis. 190: 2065-2069; Vilchez y Butel (2004) Clin. Microbiol. Rev. 17: 495-508; Shivapurkar, *et ál*. (2004) Cancer Res. 64: 3757-3760; Carbone, *et ál*. (2003) Oncogene 2: 5173-5180; Barbanti-Brodano, *et ál*. (2004) Virology 318:1-9) (genoma completo SV40 en, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank NC_001669; AF168994; AY271817; AY271816; AY120890; AF345344; AF332562).

Coltiviruses, incluyendo virus de la fiebre por garrapatas de Colorado, virus de Eyach.	Attoui, *et ál*. (1998) J. Gen. Virol. 79: 2481-2489. Segmentos de virus de Eyach (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AF282475; AF282472; AF282473; AF282478; AF282476; NC 003707; NC 003702; NC 003703; NC 003704; NC 003705; NC 003696; NC 003697; NC 003698; NC 003699; NC 003701; NC 003706; NC 003700; AF282471; AF282477).
Calciviruses, incluidos los genogrupos Norwalk, grupo Snow Mountain (SMA) y Saaporo.	Virus Snow Mountain (véase, por ejemplo, N.° de Acc. GenBank AY134748).
Parvovíridos, incluyendo dependovirus, parvovirus (incluyendo parvovirus B19) y eritrovirus.	Véase, por ejemplo, Brown (2004) Dev. Biol. (Basel) 118: 71-77; Alvarez-Lafuente, *et ál*. (2005) Ann. Rheum. Dis. 64: 780-782; Ziyaeyan, *et ál*. (2005) Jpn. J. Infect. Dis. 58: 95-97; Kaufman, *et ál*. (2005) Virology 332: 189-198.

Otros organismos para los que se conocen antígenos adecuados en la técnica incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, *Chlamydia trachomatis, Streptococcus pyogenes* (Estreptococo del grupo A), *Streptococcus agalactia* (Estreptococo del grupo B), *Streptococcus pneumonia, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Vibrio cholerae, especies Salmonella* (incluyendo *typhi, typhimurium*), enterica *(incluyendo Helicobactor pylori Shigella flexneri* y otras especies *shigella* del grupo D), *Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei, Klebsiella pneumonia, especies Clostridium* (incluyendo *C. difficile*), *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Esta lista no pretende ser restrictiva.

Composiciones farmacéuticas

El término "farmacéutica", tal como se usa en la presente, se refiere a una sustancia química diseñada para ser usada en la cura, el tratamiento o la prevención de enfermedades y que está sujeta a un proceso de aprobación por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (o cualquier entidad no estadounidense equivalente a esta) como un producto farmacéutico de venta con receta o de venta libre. Los detalles sobre las técnicas para la formulación y administración de

dichas composiciones se pueden encontrar en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, ed. 21 (Mack Publishing Co., Easton, PA) y Nielloud y Marti-Mestres, Pharmaceutical Emulsions and Suspensions: Segunda Edición (Marcel Dekker, Inc, Nueva York).

A los efectos de la presente divulgación, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a través de una variedad de medios, incluyendo vía no parenteral, parenteral, spray para inhalación, tópicamente o por vía rectal en formulaciones que contienen portadores, vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables. La "administración no parenteral" incluye administración por vía oral, bucal, sublingual, tópica, transdérmica, oftálmica, ótica, nasal, rectal, cervical, pulmonar, mucosa y vaginal. El término parenteral, tal como se usa en la presente, incluye, de manera enunciativa mas no limitativa, inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intradérmicas, intratecales y epidurales con una variedad de técnicas de infusión. La inyección intraarterial e intravenosa, tal como se usa en la presente, incluye la administración a través de catéteres. También se contempla la administración a través de stents intracoronarios y depósitos intracoronarios. La administración intra-tumoral (directamente en la masa tumoral) o peri-tumoral (alrededor de la masa tumoral) de los compuestos de la presente

invención puede activar directamente DC de infiltración local, promover directamente la apoptosis de células tumorales o sensibilizar las células tumorales a agentes citotóxicos. El término por vía oral, tal como se utiliza en la presente, incluye, de manera enunciativa mas no limitativa, ingestión oral o entrega por vía sublingual o bucal. La administración oral incluye bebidas de fluidos, barras energéticas, así como formulaciones de pastillas.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para el método deseado de administración. Por ejemplo, para la administración oral se pueden preparar comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas, y tales composiciones pueden contener uno o más agentes, incluyendo agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones agradables al gusto. Los comprimidos que contienen un compuesto farmacéutico mezclado con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos son aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como

carbonato de calcio o sodio, lactosa, fosfato de calcio o sodio; agentes de granulación y desintegración, tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o acacia; y agentes lubricantes; tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no tener recubrimiento o pueden ser recubiertos mediante técnicas conocidas, incluyendo recubrimiento entérico, recubrimiento colónico o microencapsulación para retrasar la desintegración y la adsorción en el tracto gastrointestinal y/o proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso temporal tal como el monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

Las formulaciones para uso oral se pueden presentar también como cápsulas duras de gelatina, donde el compuesto farmacológico se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blandas, donde el ingrediente activo está mezclado con agua o un medio oleoso, tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como suspensiones acuosas en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes

incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma de acacia, y agentes dispersantes o humectantes, tales como un fosfátido de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como etil o n-propil p-hidroxi-benzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, tal como el aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o un aceite mineral tal como la parafina líquida. Las suspensiones orales pueden contener un agente espesante, tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los expuestos anteriormente, y agentes aromatizantes para proporcionar una

preparación oral de sabor agradable. Estas composiciones se pueden conservar agregando un antioxidante, tal como el ácido ascórbico.

Los gránulos y polvos dispersables de la divulgación adecuados para preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión, y uno o más conservantes. Ejemplos de agentes dispersantes o humectantes y de suspensión adecuados han sido mencionados anteriormente en la presente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden presentarse en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete, un aceite mineral, tal como parafina líquida, o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural, tales como goma arábiga y goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como el monooleato de sorbitán, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno,

tales como monooleato de polioxietileno sorbitán. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y aromatizantes. Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, tales como glicerol, el sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante, un aromatizante o un agente colorante.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes y de suspensión adecuados mencionados anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una solución en 1,3-butano-diol o preparada como un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos estériles pueden ser usados convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, también se pueden usar ácidos grasos, tales como el ácido oleico, en la preparación de inyectables.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con el material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación de liberación progresiva en el tiempo diseñada para administración oral a seres humanos puede contener aproximadamente entre 20 y 500 mg de material activo combinado con una cantidad apropiada y conveniente de material portador, la cual puede variar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 95 % de las composiciones totales. Es preferible preparar la composición farmacéutica de manera tal que se proporcionen cantidades fácilmente medibles para la administración. Típicamente, una cantidad eficaz para ser administrada por vía sistémica está entre aproximadamente 0.1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg, y depende de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, la edad y el peso del sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano), la afección exacta que requiere tratamiento y su gravedad, la vía de administración, y finalmente estará a discreción del médico o veterinario tratante. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del individuo que esté siendo tratado; el momento y la vía de administración; la tasa

de excreción; otros fármacos que se hayan administrado previamente; y la gravedad de la afección específica para la cual se está sometiendo el sujeto a terapia, como bien lo entienden los expertos en la técnica.

Como se señaló anteriormente, las formulaciones de la divulgación adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades individuales, tales como cápsulas, tabletas o comprimidos que contienen cada una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse como un bolo, electuario o pasta.

Un comprimido se puede producir mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidas se pueden preparar comprimiendo el ingrediente activo en una máquina adecuada en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclada con un aglutinante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropil etil celulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, almidón glicolato de sodio, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados

se pueden realizar en una máquina adecuada usando una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos también pueden estar opcionalmente recubiertos o ranurados, y se pueden formular de manera que permitan una liberación lenta o controlada del ingrediente activo de estos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos se pueden proporcionar opcionalmente con un recubrimiento entérico o colónico para proporcionar la liberación en partes del intestino distintas del estómago. Esto es particularmente ventajoso con los compuestos de mono- o di-F-CDN, tal como se describen en la presente, cuando dichos compuestos son susceptibles a hidrólisis ácida.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las formulaciones adecuadas para administración por vía vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen, además del ingrediente activo, vehículos conocidos en la técnica como apropiados.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos, los cuales hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor al cual va dirigido el medicamento; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores sellados con dosis unitarias o en dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden ser almacenadas en un estado liofilizado, requiriendo solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las suspensiones y soluciones inyectables se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

Cuando un compuesto divulgado o su sal se nombre o represente mediante su estructura, se entenderá que el compuesto o sal, incluyendo los solvatos (en particular, los hidratos) de este, puede existir en formas cristalinas, formas no cristalinas o

una mezcla de estas. El compuesto o sal, o los solvatos (en particular, los hidratos) de este, también puede exhibir polimorfismo (es decir, la capacidad de presentarse en diferentes formas cristalinas). Estas diferentes formas cristalinas se conocen generalmente como "polimorfos". Se entenderá que cuando se nombre o se represente por su estructura, el compuesto divulgado, o los solvatos (en particular, los hidratos) de este, también incluye todos sus polimorfos. Los polimorfos tienen la misma composición química, pero difieren en el empaquetamiento, la disposición geométrica y otras propiedades descriptivas del estado sólido cristalino. Los polimorfos pueden tener diferentes propiedades físicas, tales como la densidad, la forma, la dureza, la estabilidad y propiedades de disolución. Los polimorfos normalmente presentan diferentes puntos de fusión, espectros de IR y patrones de difracción de rayos X en polvo, los cuales pueden ser usados para su identificación. Cualquier experto en la técnica apreciará que es posible producir diversos polimorfos, por ejemplo, cambiando o ajustando las condiciones usadas durante la cristalización o recristalización del compuesto.

Para los solvatos de los compuestos de la presente invención, o las sales de estos, que están en forma cristalina, un experto en la técnica apreciará que es posible formar solvatos farmacéuticamente aceptables cuando se incorporan moléculas de

disolvente en la red cristalina durante la cristalización. Los solvatos pueden incluir disolventes no acuosos tales como etanol, isopropanol, dimetilsulfóxido, ácido acético, etanolamina y acetato de etilo, o pueden incluir agua como el disolvente que se incorpora en la red cristalina. Los solvatos en los que el agua es el disolvente que se incorpora a la red cristalina se conocen típicamente como "hidratos". Los hidratos incluyen hidratos estequiométricos, así como composiciones que contienen cantidades variables de agua. La invención incluye todos estos solvatos.

Debido a su uso potencial en medicina, las sales de los compuestos de la presente invención son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las descritas por P. Heinrich Stahl y Camille G. Wermuth in Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Segunda Edición. (Wiley-VCH: 2011) y también Remington’s Pharmaceutical Sciences, Ed. 18. (Mack Publishing, Easton PA: 1990) y también Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Ed. 19. (Mack Publishing, Easton PA: 1995). Sal, comprendida en el término "sales farmacéuticamente aceptables", se refiere a sales no tóxicas de los compuestos de la presente invención.

Las sales de los compuestos de la presente invención que contienen una amina básica u otro grupo funcional básico se

pueden preparar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo el tratamiento de bases libres con un ácido inorgánico, tal como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares, o con un ácido orgánico, tal como el ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido fórmico, ácido algínico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, ácido piranosildilo, tal como el ácido glucurónico o ácido galacturónico, ácido alfahidroxi, tal como el ácido cítrico o ácido tartárico, aminoácido, tal como el ácido aspártico o ácido glutámico, ácido aromático, tal como el ácido benzoico o ácido cinámico, ácido sulfónico, tal como el ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, o similares. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sulfatos, pirosulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formiatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butino-1,4-dioatos, hexino-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutratos, citratos,

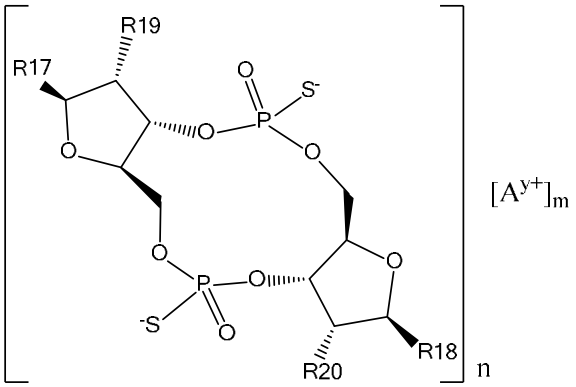
lactatos, glicolato, resinato, lactatos, camsilatos, tartratos, mandelatos y sulfonatos, tales como xilenosulfonatos, metanosulfonatos, propanosulfonatos, naftaleno-1-sulfonatos y naftaleno-2-sulfonatos.

Las sales de los compuestos de la presente invención que contiene un diéster de fosfato, diéster de fosforotioato u otro grupo funcional ácido se pueden preparar mediante reacción con una base adecuada. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, acetato, piridina, amonio, piperazina, dietilamina, nicotinamida, fórmico, urea, sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, litio, cinámico, metilamino, metanosulfónico, pícrico, tartárico, trietilamino, dimetilamino y tris(hidroximetil)aminometano. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales son conocidas por los expertos en la técnica.

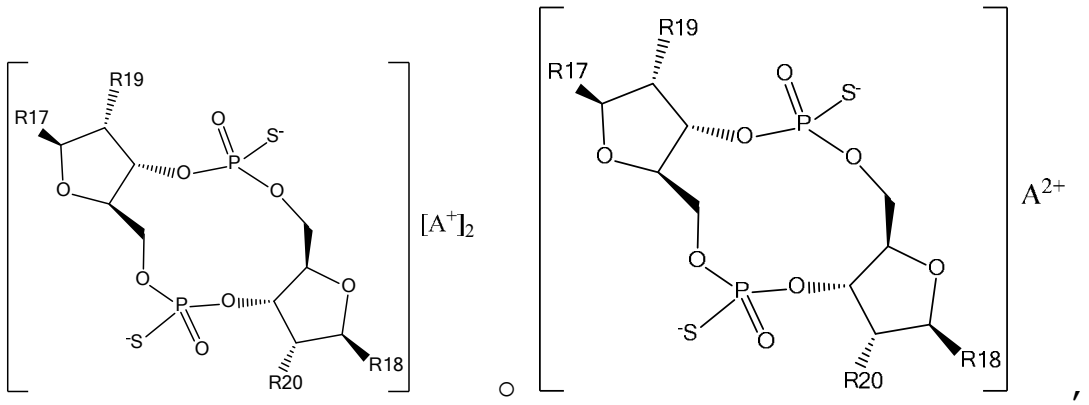
Una sal farmacéuticamente aceptable de este tipo se puede elaborar con una base, que proporciona un catión farmacéuticamente aceptable, incluyendo sales de metales alcalinos (especialmente sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (especialmente calcio y magnesio), sales de aluminio y sales de amonio, zinc, así como sales preparadas a partir de bases orgánicas fisiológicamente aceptables tales como dietilamina, isopropilamina, olamina, benzatina, benetamina, trometamina (2-amino-2- (hidroximetil)propano-1,3-

diol), morfolina, epolamina, piperidina, piperazina, picolina, diciclohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, 2-hidroxietilamina, tri-(2-hidroxietil)amina, cloroprocaína, colina, deanol, imidazol, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), procaína, dibencilpiperidina, dehidroabietilamina, glucamina, colidina, quinina, quinolona, erbumina y aminoácidos básicos tales como lisina y arginina.

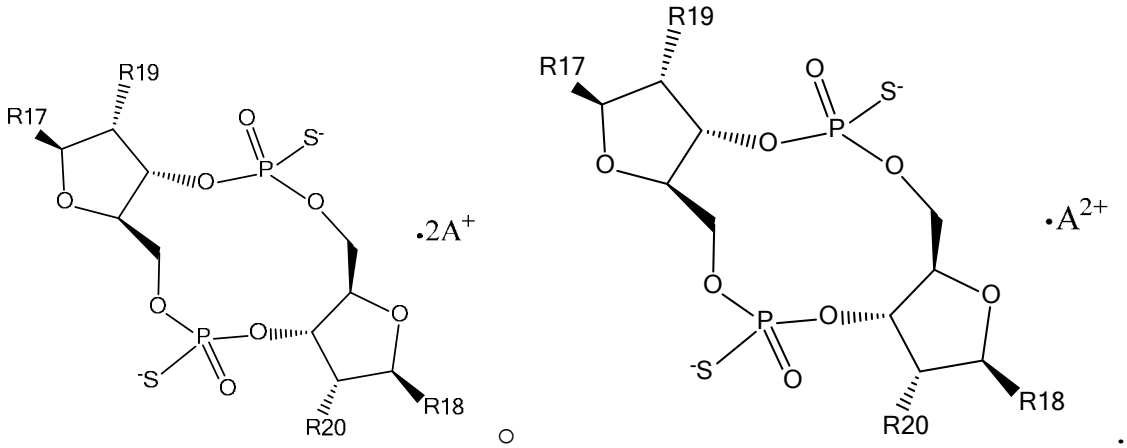
Los compuestos mono- o di-F-CDN, tal como se describen en la presente, que incluyen sales de estos, pueden ser descritos por estructuras en las que el -SH o -OH en el enlace fosfato o tiofosfato (por ejemplo, R5 o R6 del compuesto de Fórmula I tal como se describe en la presente) se representan como $-S^-$ u $-O^-$ con un catión correspondiente para formar sales de los compuestos tal como se describen en la presente. Por ejemplo, una sal del compuesto de Fórmula II del tercer aspecto, tal como se describe en la presente, puede ser representada por las siguientes estructuras:



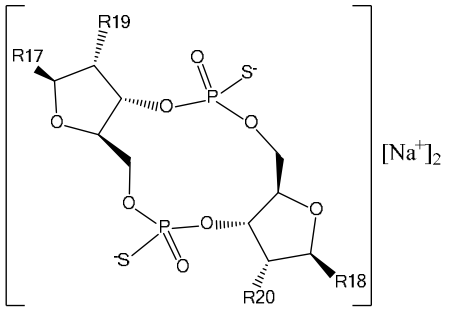
donde A^{y+} representa un catión salino mono o polivalente, y n y m son el número entero más bajo posible para una determinada y. Por ejemplo, cuando A^{y+} es monovalente, es decir, cuando y es 1, tal como Na^+, K^+, NH_4^+, $TEAH^+$ o similares, n es 1 y m es 2; cuando y es 2, tal como Ca^{2+}, Mg^{2+} y similares, n es 1 y m es 1; cuando y es 3, por ejemplo, Al^{3+} o similares, n es 3 y m es 2. Por ejemplo, sales de un catión salino monovalente o divalente pueden ser representadas como



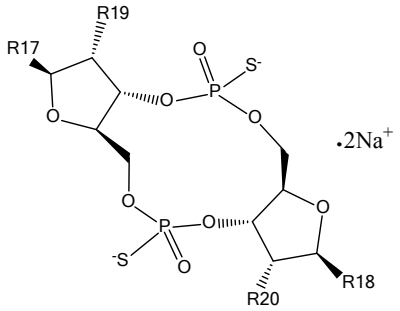
respectivamente, o en casos donde n = 1, estas pueden ser representadas sin corchetes, por ejemplo, como



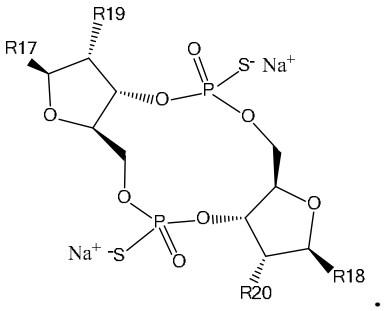
Alternativamente, las sales monovalentes pueden ser representadas con A^+ adyacente a cada uno de los $-S^-$ u $-O^-$. Por ejemplo, la sal sódica de un compuesto mono- o di-F-RR-CDN de Formula II, tal como se describe en la presente, se puede representar como



,

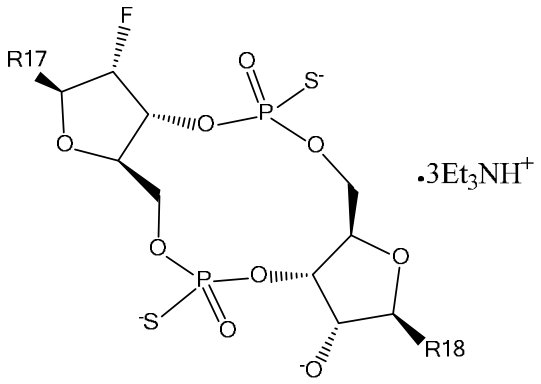


o

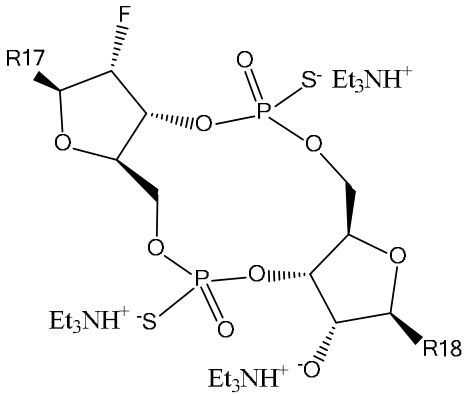


.

En algunos casos, los compuestos pueden incluir sales del grupo 2'OH, así como, por ejemplo, sales de tris-trietilamonio de un compuesto de fórmula II, por ejemplo, donde R19 es F y R20 es OH puede tener la estructura representada como



o



.

Se pueden usar otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, trifluoroacetato o trietilamonio, por ejemplo, en el aislamiento de compuestos de la invención, y están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

La invención incluye dentro de su alcance todas las formas estequiométricas y no estequiométricas posibles de las sales de los compuestos de la presente invención.

Si un compuesto de la presente invención que contiene una amina básica u otro grupo funcional básico se aísla como una sal, la forma de base libre correspondiente de ese compuesto se puede preparar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo el tratamiento de la sal con una base orgánica o inorgánica, adecuadamente una base orgánica o inorgánica con una pK_a mayor a la de la forma de base libre del compuesto. De manera similar, si un compuesto de la presente invención que contiene un diéster de fosfato, diéster de fosforotioato u otro grupo funcional ácido se aísla como una sal, la forma de ácido libre correspondiente de ese compuesto se puede preparar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo el tratamiento de la sal con un ácido orgánico o inorgánico, adecuadamente un ácido orgánico o inorgánico con una pK_a menor a la de la forma de ácido libre del compuesto.

Una cantidad eficaz de un compuesto mono- o di-F-CDN, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, tal como se describe en la presente, para un paciente particular, puede variar dependiendo de factores tales como la afección a tratar, la salud general del paciente, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Existe orientación para los métodos de tratamiento y el diagnóstico (véase, por ejemplo, Maynard, et ál. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

Una cantidad eficaz se puede administrar en una sola dosis, pero no se limita a una sola dosis. Por lo tanto, la administración puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, o más, administraciones de una composición farmacéutica que comprende el compuesto mono- o di-F-CDN, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, tal como se describe en la presente. Cuando hay más de una administración de una composición farmacéutica en los presentes métodos, las administraciones pueden hacerse espaciadas en intervalos de

tiempo de un minuto, dos minutos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más minutos, en intervalos de tiempo de aproximadamente una hora, dos horas, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, y así sucesivamente. En el contexto de horas, el término "aproximadamente" significa más o menos cualquier intervalo de tiempo de 30 minutos. Las administraciones también pueden hacerse separadas por intervalos de tiempo de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, y combinaciones de estos. La invención no está limitada a intervalos de dosificación equidistantemente espaciados en el tiempo, sino que incluye también dosis administradas en intervalos diferentes.

Un esquema de dosificación de, por ejemplo, una vez/semana, dos veces/semana, tres veces/semana, cuatro veces/semana, cinco veces/semana, seis veces/semana, siete veces/semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, y similares, está disponible para la invención. Los esquemas de dosificación incluyen la dosificación durante un periodo total de tiempo de, por ejemplo, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro

semanas, cinco semanas, seis semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses y doce meses.

Se proporcionan los ciclos de los anteriores esquemas de dosificación. El ciclo se puede repetir aproximadamente, por ejemplo, cada siete días; cada 14 días; cada 21 días; cada 28 días; cada 35 días; cada 42 días; cada 49 días; cada 56 días; cada 63 días; cada 70 días; y similares. Se puede incorporar un intervalo sin dosificación en un ciclo, donde el intervalo puede ser de aproximadamente, por ejemplo, siete días; 14 días; 21 días; 28 días; 35 días; 42 días; 49 días; 56 días; 63 días; 70 días; y similares. En este contexto, el término "aproximadamente" significa más o menos un día, más o menos dos días, más o menos tres días, más o menos cuatro días, más o menos cinco días, más o menos seis días, o más o menos siete días.

Los métodos para la administración conjunta con un agente terapéutico adicional son bien conocidos en la técnica (Hardman, et ál. (eds.) (2001) Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy,

Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA). En general, la administración conjunta indica el tratamiento de un sujeto con dos o más agentes, donde los agentes se pueden administrar de manera simultánea o en momentos diferentes. Por ejemplo, dichos agentes se pueden proporcionar a un solo sujeto como administraciones separadas, las cuales pueden suministrarse esencialmente al mismo tiempo o en momentos diferentes, y las cuales pueden suministrarse por la misma vía o por vías de administración diferentes. Dichos agentes se pueden proporcionar a un solo sujeto en la misma administración (por ejemplo, la misma formulación), de tal manera que se administren al mismo tiempo por la misma vía de administración. Como se ha indicado, las composiciones de la presente invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas para administración parenteral o enteral. Una composición farmacéutica típica para administración a un sujeto animal comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, amortiguadores y similares. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª ed., Easton ed., Mack Publishing Co., pág. 1405-1412 y 1461-1487 (1975); The National Formulary XIV, 14ª ed., American Pharmaceutical Association, Washington, DC (1975). Ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y

ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como el cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, *etc.* Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con habilidades cotidianas que hacen parte de la técnica.

Las administraciones repetidas de una vacuna en particular (estímulo homólogo) han demostrado ser eficaces para aumentar la respuesta humoral. Este enfoque puede no ser eficaz para estimular la inmunidad celular porque la inmunidad previa al vector tiende a deteriorar la presentación de antígenos fuertes y la generación de señales inflamatorias adecuadas. Un enfoque para evitar este problema ha sido la administración secuencial de vacunas que usan distintos sistemas de administración de antígenos (estímulo heterólogo). En un régimen de estímulo heterólogo, la administración de al menos un estimulador o iniciador comprende la administración del compuesto mono o di-F-CDN/célula tumoral inactivada o composiciones de estos descritos en la presente. El extremo heterólogo del régimen

puede comprender la administración de antígeno usando una o más de las siguientes estrategias:

bacterias o virus inactivados o atenuados que comprenden el antígeno de interés, que son partículas que han sido tratadas con una condición de desnaturalización para volverlas ineficaces o ineficientes para el montaje de una invasión patógena;

antígenos purificados, que son típicamente antígenos producidos naturalmente purificados a partir de un cultivo de células del patógeno o una muestra de tejido que contiene el agente patógeno, o una versión recombinante de este;

vectores de administración virales o bacterianos vivos modificados de manera recombinante para expresar y/o secretar antígenos en las células hospedadoras del sujeto. Estas estrategias se basan en la atenuación (por ejemplo, a través de ingeniería genética) de los vectores virales o bacteriano para volverlos no patógenos y no tóxicos;

vectores de células presentadoras de antígeno (CPA), tales como un vector de células dendríticas (DC), que comprenden células cargadas con un antígeno, o transfectadas con una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el antígeno (por ejemplo, Provenge® (Dendreon Corporation)

para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico resistente a la castración);

vehículos de administración de antígenos liposomales; y

vectores de ADN no unido y vectores de ARN no unido, que pueden ser administrados mediante una pistola de genes, electroporación, fantasmas bacterianos, microesferas, micropartículas, liposomas, nanopartículas policatiónicas, y similares.

Es posible administrar una vacuna de iniciador y una vacuna de estimulador mediante cualquiera o una combinación de las siguientes vías. En un aspecto, la vacuna de iniciador y la vacuna de estimulador se administran por la misma vía. En otro aspecto, la vacuna de iniciador y la vacuna de estimulador se administran por vías diferentes. La expresión "vías diferentes" incluye, de manera enunciativa mas no limitativa, diferentes sitios en el cuerpo, por ejemplo, un sitio que es oral, no oral, enteral, parenteral, rectal, intranodal (ganglios linfáticos), intravenoso, arterial, subcutáneo, intramuscular, peritumoral, intratumoral, infusión, mucosal, nasal, en el espacio cefalorraquídeo o líquido cefalorraquídeo, etc., así como los diferentes modos, por ejemplo, oral, intravenoso e intramuscular.

Se puede proporcionar una cantidad eficaz de una vacuna de iniciador o estimulador en una dosis, pero no está limitada a una sola dosis. Por lo tanto, la administración puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, o más, administraciones de la vacuna. Cuando hay más de una administración de una vacuna, las administraciones pueden hacerse espaciadas en intervalos de tiempo de un minuto, dos minutos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más minutos, en intervalos de tiempo de aproximadamente una hora, dos horas, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, y así sucesivamente. En el contexto de horas, el término "aproximadamente" significa más o menos cualquier intervalo de tiempo de 30 minutos. Las administraciones también pueden hacerse separadas por intervalos de tiempo de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, y combinaciones de estos. La invención no está limitada a intervalos de dosificación equidistantemente espaciados en el tiempo, sino que incluye también dosis en intervalos diferentes, tales como un esquema de administración de

iniciador que consiste en la administración a 1 día, 4 días, 7 días y 25 días, solo a manera de ejemplo no limitativo.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

Métodos generales

Los reactivos y disolventes anhidros adecuados para la síntesis de oligonucleótidos en fase de solución se adquirieron de proveedores comerciales (Aldrich, ChemGenes Corporation, Wilmington, MA, EE.UU.) y fueron manipulados en atmósfera de nitrógeno o argón secos usando técnica anhidra. Se llevaron a cabo reacciones de acoplamiento de fosforamidita y ciclaciones de H-fosfonato en piridina o acetonitrilo anhidros en atmósfera de nitrógeno o argón secos. Los materiales de partida para todas las reacciones en piridina seca se secaron mediante concentración (tres veces) a partir de piridina, a menos que se indique lo contrario. Las condiciones cromatográficas fueron las que se describen a continuación, a menos que se indique lo contrario en el ejemplo más adelante. Se llevó a cabo cromatografía flash preparativa en gel de sílice bajo cromatografía de media presión (MPLC) usando columnas de sílice RediSep Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE) en un Combiflash Rf + UV-Vis (Teledyne Isco) usando gradientes de metanol en

diclorometano. Se llevó a cabo cromatografía preparativa de fase inversa bajo condiciones de MPLC usando columnas RediSep Rf C18 Aq (Teledyne Isco) en un Combiflash Rf + UV-Vis usando gradientes de acetonitrilo en solución acuosa TEAA 10 mM. Se llevó a cabo cromatografía líquida de alta presión analítica (HPLC) en un sistema HPLC Shimadzu Prominence con dos bombas LC-20AD y un detector de matriz de fotodiodos SPD-M30A con monitoreo a 254 nm. Se usaron gradientes de TEAA 10 mM en acetonitrilo o NH_4OAc 20 mM en acetonitrilo, bien sea con una columna C-18 (4.6 x 250 mm) de 5 micras (Thermo Scientific Acclaim 120) o una columna C-18 (4.0 x 250 mm) de 10 micras (Thermo Scientific Hypersil) a temperatura ambiente. La HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema LC20-AP HPLC preparativo Shimadzu, equipado con monitoreo de detección SPD-20A UV/Vis a 254 nm en una columna C-18 (41.6 x 250 mm) Varian Microsorb 60-8 usando gradientes de TEAA 10 mM y acetronilo a una velocidad de flujo de 50 ml/min. Se realizaron extracciones en fase sólida usando C-18 Sep-Pak (Waters) a cargas de 3 % (peso/peso). Se registraron LCMS analíticos usando un sistema LCMS Shimadzu, con una HPLC Prominence acoplada a un espectrómetro de masa cuadrupolar único Shimadzu LCMS-2020, usando una fuente de ionización de electrospray (ESI).

Se registraron los espectros ^{1}H NMR, ^{19}F NMR, ^{31}P NMR y ^{13}C NMR en $CDCl_3$, d6-DMSO, CD_3OD o D_2O como disolvente. La frecuencia

de operación para ^{1}H fue de 400 MHz, para ^{19}F fue 376 MHz, para ^{31}P fue de 162 MHz, y para ^{13}C fue de 100 MHz. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente (20-25 °C), a menos que se indique lo contrario. La temperatura para los experimentos a temperatura variable se calibró mensual o bimensualmente usando el método de etilenglicol que se describe en C. Amman, P. Meier y A. E. Merbach, *J. Magn. Reson.* **1982**, *46*, 319-321.

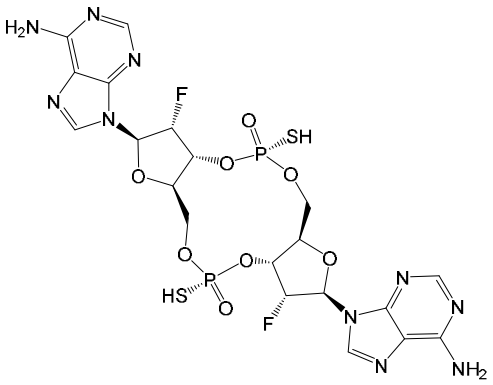
Los compuestos finales pueden existir como sal de trietilamonio ($TEAH^+$ o Et_3NH^+), la cual se puede convertir en otras formas de sales (incluyendo, de manera enunciativa mas no restrictiva, sodio (Na^+) o amonio (NH_4^+)) usando técnicas de intercambio iónico estándar u otros métodos bien conocidos.

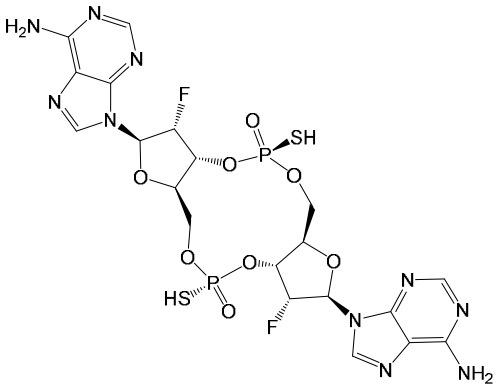
Las asignaciones de estereoquímica en el fósforo se hicieron de manera análoga a los métodos descritos en la bibliografía (Zhao et ál. Nucleosides, Nucleotides, y Nucleic Acid 289: 352-378, 2009) o tal como se describe en los ejemplos a continuación.

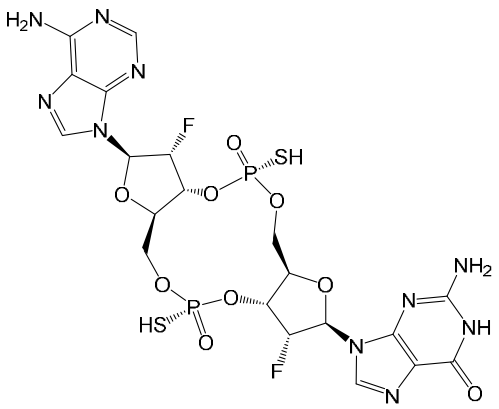
Los nombres de los compuestos se generaron usando el programa de software ChemBioDraw Ultra V 14.0, el cual se puede adquirir a través de CambridgeSoft Corporation, 100 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140 USA (http://www.cambridgesoft.com). Los nombres abreviados de los compuestos, o los compuestos de referencia usados en los ejemplos, también se proporcionan en la siguiente Tabla 3. Los compuestos de referencia 3'3'-RR-

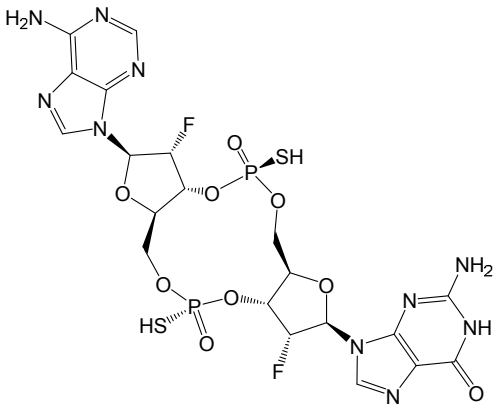
(G)(A), 3’3’-RR-(G)(G) y 3’3’-RR-(A)(A) se prepararon de acuerdo con los métodos descritos en la Publicación PCT N.° WO2014/093936, la cual se incluye a manera de referencia con respecto a dichas síntesis. Las estructuras en los ejemplos también pueden estar representadas como sales, por ejemplo, $-O^- A^+$ o $-S^- A^+$, donde A^+ es el catión de sal.

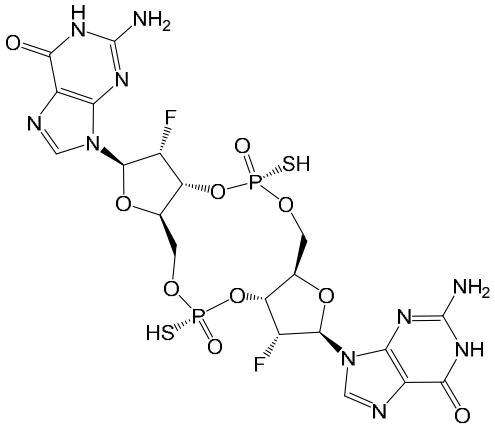
Tabla 3: Nombres abreviado de los compuestos y estructuras

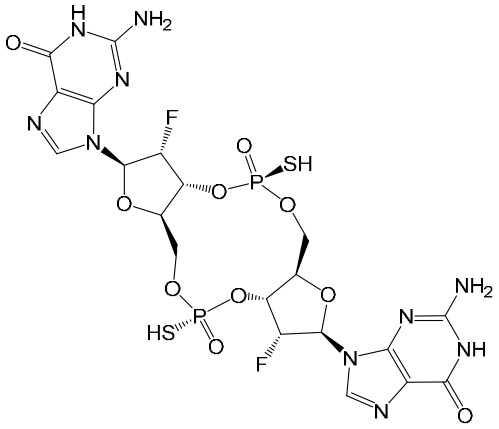
Número de ejemplo y nombres abreviados de los compuestos	Estructura
Ejemplo 1 Compuesto 6 3'3'-RR- (2'F-A) (2'F-A); ditio (Rp, Rp)-[2'F-A (3 ', 5')p-2'F-A (3 ', 5') p]- cíclico (2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR, 12R,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H- purin-9-il)-3,10-difluoro- 5,12-dimercaptooctahidro- 2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'- j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosf aciclododecin 5,12-dióxido	

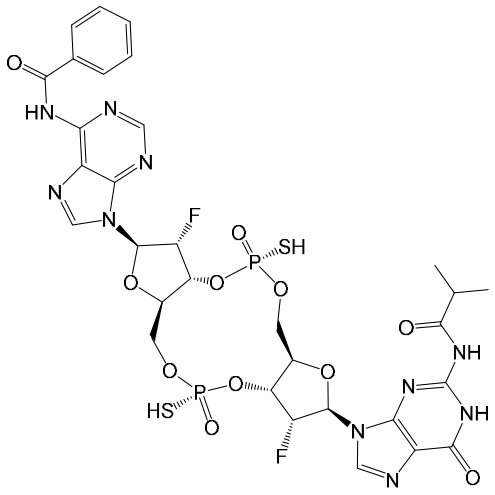
Ejemplo 1 Compuesto 6a 3'3'-RS- (2'F-A) (2'F-A); ditio (Rp, Sp)-[2'F-A (3',5')p-2'F-A (3', 5')p]-cíclico (2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12S,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercaptooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin 5,12-dióxido	

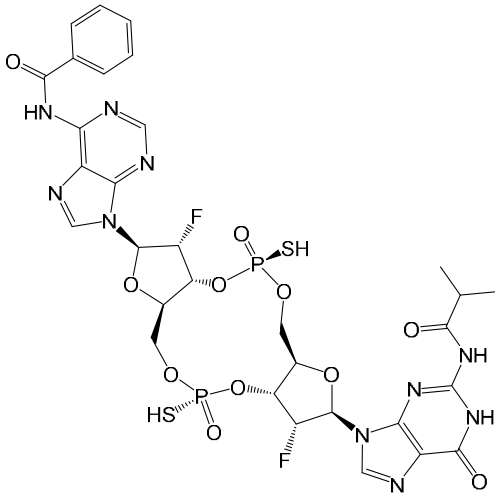
Ejemplo 2 Compuesto 14 3'3'-RR-(2´F-G)(2´F-A); ditio-(Rp, Rp)-[2'F-G(3',5')p-2'F-A(3',5')p]-cíclico 2-amino-9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona	

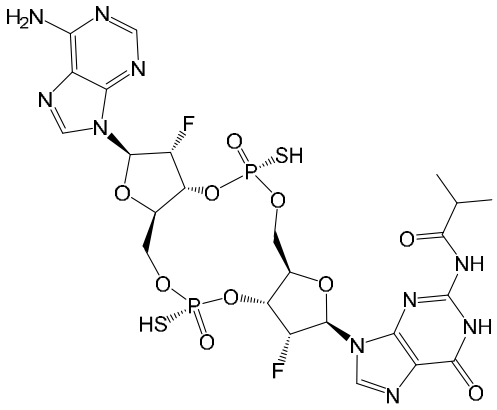
Ejemplo 2 Compuesto 14a 3’3’-RS-(2’F-G)(2’F-A); ditio-(Rp, Sp)[2'F-G (3 ', 5')p-2'F-A(3',5') p]-cíclico 2-amino-9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12S,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona	

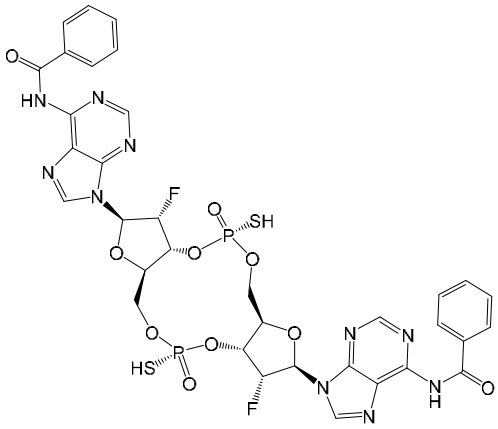
Ejemplo 3 Compuesto 17 3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-G); ditio (Rp, Rp) [2'F-G(3',5')p-2'F-G(3',5')p]-cíclico 9,9'-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diilo)bis(2-amino-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona)	

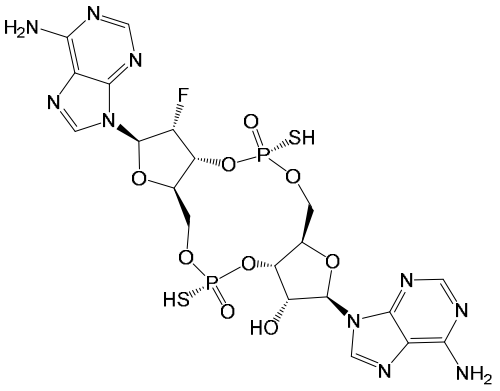
Ejemplo 3 Compuesto 17a 3’3’-RS-(2’F-G)(2’F-G); ditio (Rp,Sp)-[2'F-G(3',5')p-2'F-G(3',5')p]- cíclico 9,9'-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12S,14aR)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecine-2,9-diilo)bis(2-amino-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona)	

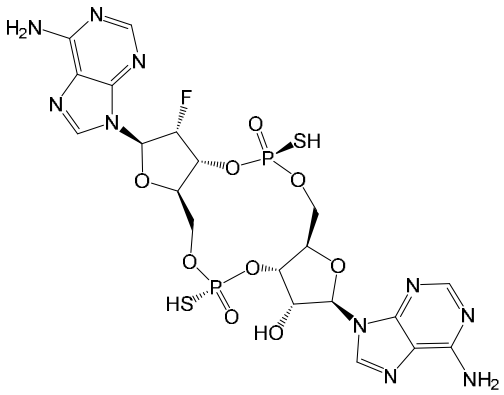
Ejemplo 7 Compuesto 25 3’3’-RR-(2’F-iBuG)(2’F-BzA); ditio (Rp,Rp)-[2'FiBuG(3',5')p-2'F-BzA(3',5') p]-cíclico *N*-(9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-3,10-difluoro-9-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-9H-purin-6-il)benzamida	

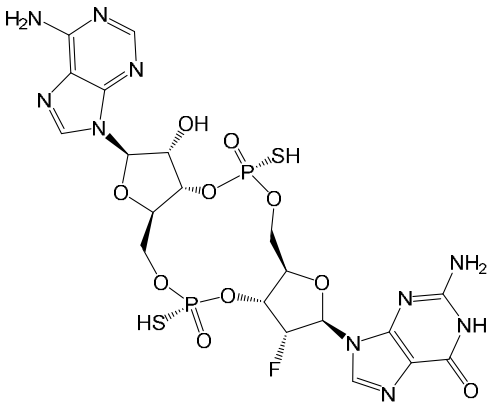
Ejemplo 7 Compuesto 25a 3’3’-RS-(2’F-iBuG)(2’F-BzA); ditio-(Rp, Sp)-[2'FiBuG (3',5')p-2'F-BzA(3', 5')p]-cíclico *N*-(9-((2R,3R,3aR,5S,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-3,10-difluoro-9-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-9H-purin-6-il)benzamida	

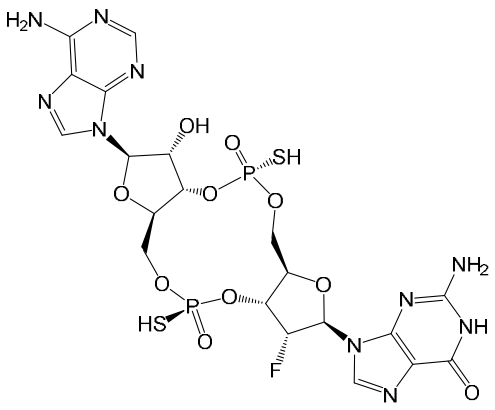
Ejemplo 8 Compuesto 26 3’3’-RR-(2’F-iBuG)(2’F-A); ditio-(Rp,Rp)-[2'F-iBuG(3',5')p-2'F-A(3',5')p]-cíclico *N*-(9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il)isobutiramida	

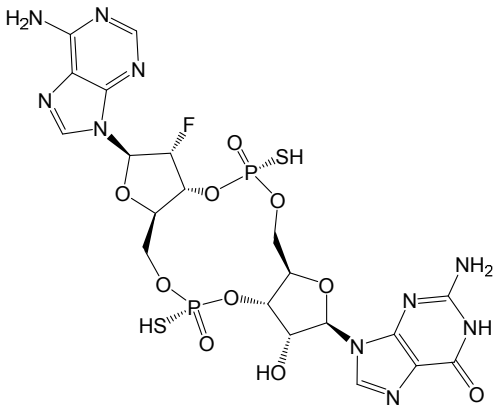
Ejemplo 9 Compuesto 27 3’3’-RR-(2’F-BzA)(2’F-BzA); ditio-(Rp,Rp)-[2'F-BzA(3',5')p-2'F-BzA(3',5') p]-cíclico *N*,N'-(((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diilo)bis(9H-purino-9,6-diilo))dibenzamida	

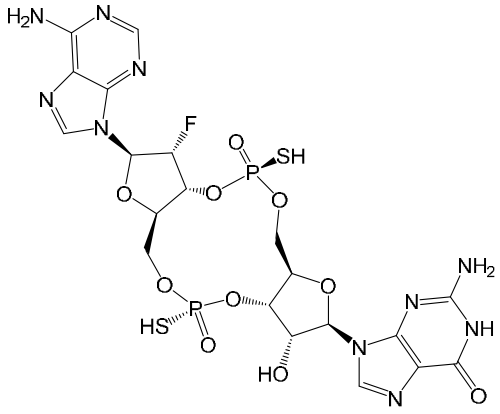
Ejemplo 4 Compuesto 22 3’3’-RR-(A)(2’F-A); ditio-(Rp,Rp)-[A(3',5')p-2'F-A(3',5')p]-cíclico (2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aS,12R,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3-fluoro-10-hidroxi-5,12-dimercaptooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin 5,12-dióxido	

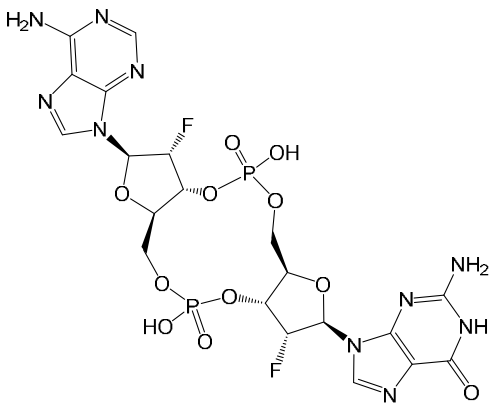
Ejemplo 4 Compuesto 22a 3’3’-RS-(A)(2’F-A); ditio-(Rp,Rp)-[A(3',5')p-2'F-A(3',5')p]-cíclico (2R,3R,3aR,5S,7aR,9R,10R,10aS,12R,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3-fluoro-10-hidroxi-5,12-dimercaptooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin 5,12-dióxido	

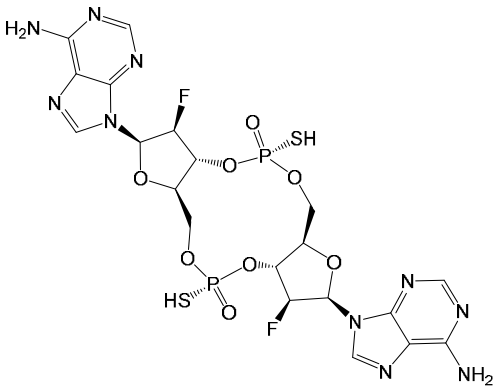
Ejemplo 5 Compuesto 23 3’3’-RR-(2’F-G)(A) ditio-(Rp,Rp)-[2'F-G(3',5')p-A(3',5')p]-cíclico 2-amino-9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aS,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3-fluoro-10-hidroxi-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona	

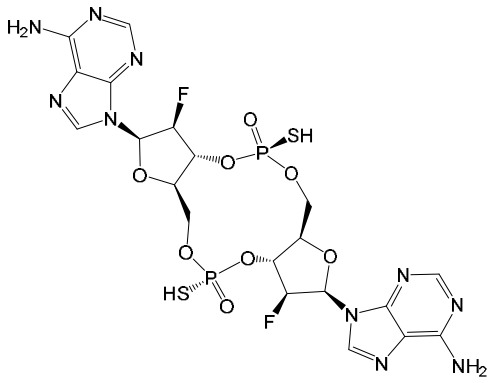
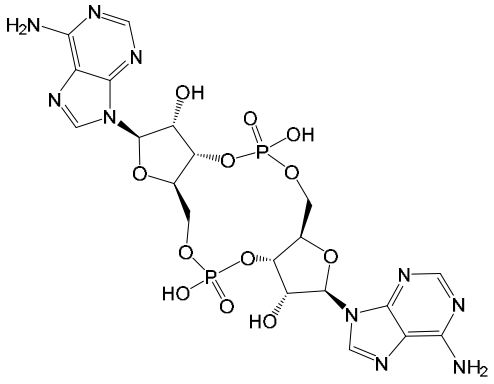
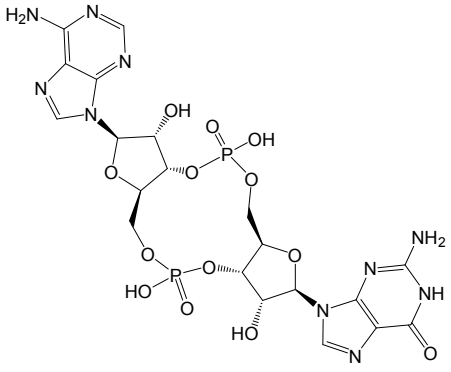
Ejemplo 5 Compuesto 23a 3’3’-SR-(2’F-G)(A) ditio-(Sp,Rp)- [2'F-G(3', 5')p-A(3',5')p]-cíclico 2-amino-9-((2R,3R,3aR,5S,7aR,9R,10R,10aS,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3-fluoro-10-hidroxi-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona	

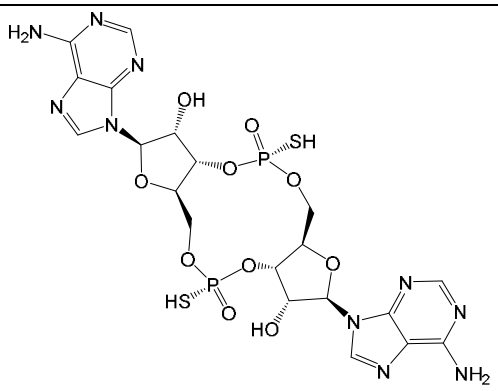
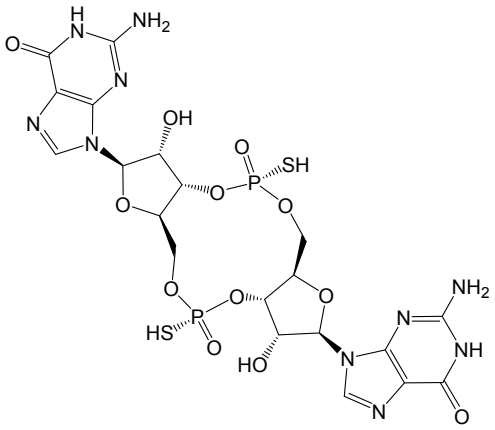
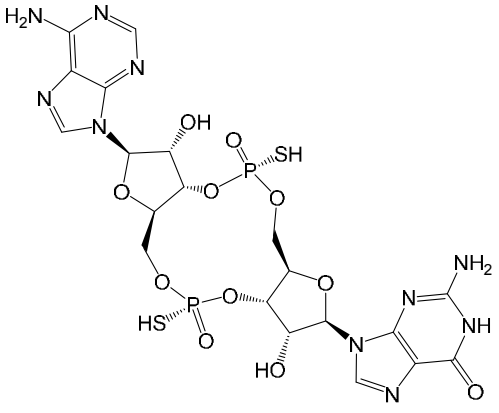
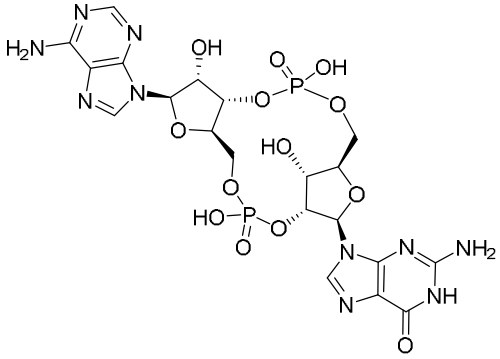
Ejemplo 6 Compuesto 24 3’3’-RR-(G)(2’F-A) ditio-(Rp,Rp)-[G(3',5')p-2'F-A(3',5')p]-cíclico 2-amino-9-((2R,3R,3aS,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-10-fluoro-3-hidroxi-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona	

Ejemplo 6 Compuesto 24a 3’3’-RS-(G)(2’F-A) ditio(Rp,Sp)-[G(3',5')p-2'F-A(3',5')p] cíclico 2-amino-9-((2R,3R,3aS,5R,7aR,9R,10R,10aR,12S,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-10-fluoro-3-hidroxi-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona	

Ejemplo 10 Compuesto 30 3’3’-(2’F-G)(2’F-A); [2'F-G(3',5')p-2'F-A(3',5')p]-cíclico 2-amino-9-((2R,3R,3aR,7aR,9R,10R,10aR,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dihidroxi-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona	

Ejemplo 1 Compuesto 7 3’3’-RR-(2’βF-A)(2’βF-A) ditio-(Rp,Rp)-[2 'βF-A(3',5')p-2'βF-A(3',5')p]-cíclico (2R,3S,3aR,5R,7aR,9R,10S,10aR,12R,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercaptooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin 5,12-dióxido	

Ejemplo 1 Compuesto 7a 3’3’-RS-(2’βF-A)(2’βF-A) ditio-(Rp,Sp)-[2 'βF-A (3',5')p-2'βF-A(3',5')p]-cíclico (2R,3S,3aR,5R,7aR,9R,10S,10aR,12S,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercaptooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin 5,12-dióxido	
CDA 3'3 '- (A) (A) [A(3',5')p-A(3',5') p]-cíclico	
cGAMP 3'3'-(G)(A) [G(3',5')p-A(3',5')p]-cíclico	

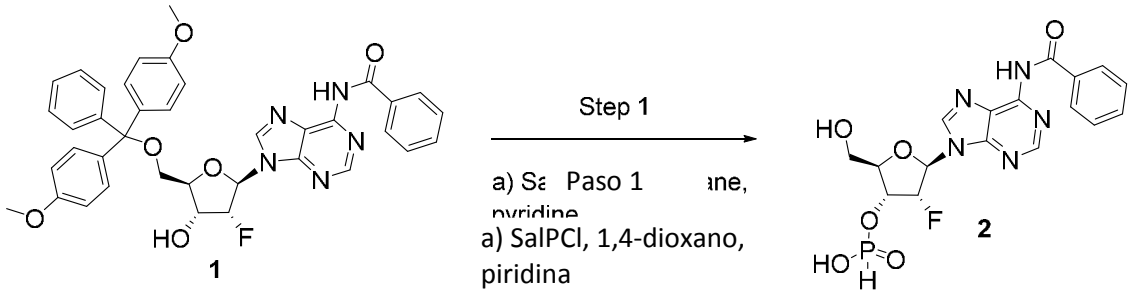
RR-CDA 3'3'-RR-(A)(A) ditio-(Rp,Rp)-[A(3',5')p- A(3',5')p]-cíclico	
RR-CDG 3'3'-RR-(G)(G) ditio-(Rp, Rp)-[G(3',5')p- G(3',5')p] cíclico	
RR-cGAMP 3'3'-RR-(G)(A) ditio-(Rp, Rp)- [G(3',5')p-A(3',5')p] cíclico	
ML-cGAMP 2'3'-(G)(A); [G(2',5')pA(3',5')p]-cíclico	

Abreviaciones y acrónimos. SalPCl = salicil clorofosfito (2-cloro-4H-benzo [d][1,3,2]dioxafosfinin-4-ona). DCA = ácido dicloroacético. DDTT = 3 - ((*N*, *N*-dimetil-aminometilideno)amino)-3H-1,2,4-ditiazol-5-tiona. DAST = trifluoruro de dietilaminoazufre. $NaHCO_3$ = bicarbonato de sodio. DCM = CH_2Cl_2 = diclorometano. EtOH = etanol. EtOAc = acetato de etilo. KOAc = acetato de potasio. MeCN = acetonitrilo. MeOH = metanol. NH_4OAc = acetato de amonio. DMAP = N,N-dimetilpiridin-4-amina. DMOCP = 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano-2-óxido. DMTCl = cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo. DMT = 4,4-dimetoxitritilo. N-feniltriflamida = 1,1,1-trifluoro-N-fenil-N-((trifluorometil)sulfonil) metanosulfonamida. TBAF = fluoruro de tetrabutilamonio. TBS = *terc*-butildimetilsililo. TEAA = acetato de trietilamonio. TEA = trimetilamina. $TEAH^+$ = trietilamonio. TEAB = bicarbonato de trietilamonio. TFA = ácido trifluoroacético. TMSCl = cloruro de trimetilsililo. HF = ácido fluorhídrico. THF = tetrahidrofurano. G = Guanina. G^{ib} = guanina isobutirilo. A = adenina. A^{BZ} = adenina benzoílo. AMA = solución de hidróxido de amonio/40 % de metilamina en agua.

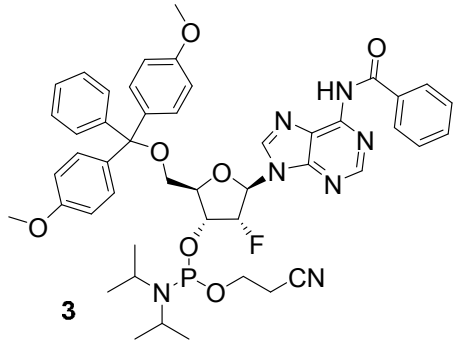
Ejemplo 1: Síntesis de 3'3'-RR- (2'F-A) (2'F-A) (6) y 3'3 '-RS (2'F-A) (2'F-A) (6a)

5,12-dióxido de (2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-

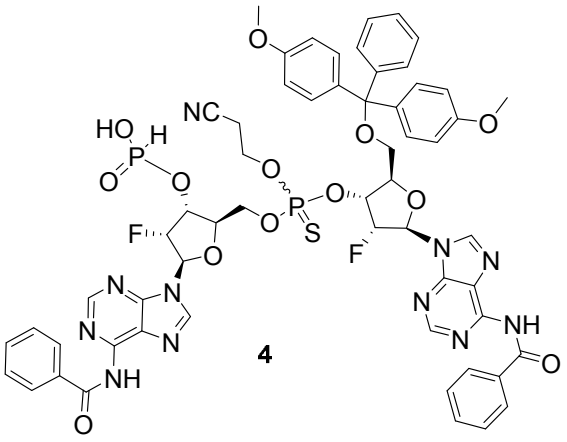
dimercaptooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin (**6**), también denominado 3'3 '-RR-(**2'**F-A) (2'F-A) o ditio-(*Rp, Rp*)-cíclico-[2'F-A(3',5')p-2'F-A (3',5')p] y 5,12-dióxido de (2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12S,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercaptooctahiydro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecina (**6a**), 3'3'-RS-(2'F-A)(2'F-A) o ditio-(Rp,Sp)-cíclico-[2'F-A (3',5') p-2'F-A (3',5') p], se prepararon de acuerdo con el siguiente esquema



Paso 2
a) dicloroacetato de
pririnio residual, MeCN
b) DDTT, MeCN



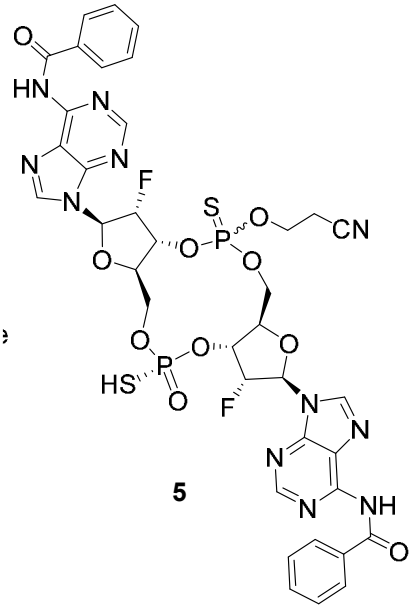
3



4

Paso 3

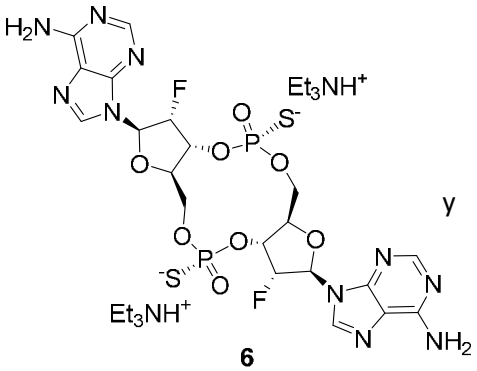
a) DCA, H_2O, CH_2Cl_2
b) DMOCP, piridina
c) 3H-1,2-benzoditiol-3-ona



5

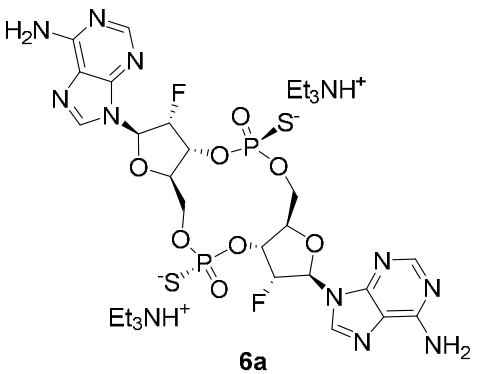
Paso 4

a) NH_4OH, MeOH, 50 ºC
b) HPLC



6

y



6a

Paso 1: Preparación de (2R, 3R, 4R, 5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)tetrahidrofurano-3-il fosfonato de hidrógeno (**2**): A una solución de N-(9-((2R,3R,4R,5R)-5-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-3-fluoro-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)-9H-purin-6-il)benzamida (**1**, 2.0 g, 3.0 mmol, ChemGenes) en 1,4-dioxano (25 ml) y piridina (8 ml) se añadió una solución de SalPCl (0.84 g, 4.1 mmol) en 1,4-dioxano (12 ml). Después de 30 min, a la mezcla de reacción agitada a temperatura ambiente se introdujo agua (4 ml), y la mezcla resultante se vertió en una solución acuosa de $NaHCO_3$ 1 N (100 ml). Esta mezcla acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml) y se repartieron las capas. Los extractos de EtOAc se combinaron y se concentraron a sequedad a vacío como una espuma incolora. La espuma incolora se disolvió en CH_2Cl_2 (30 ml) para dar una solución incolora. A esta solución se añadió agua (0.5 ml) y una de solución al 6% (v/v) de DCA en CH_2Cl_2 (30 ml). Después de diez minutos de agitación a temperatura ambiente, a la solución de color rojo, se le cargó piridina (3.5 ml). La mezcla blanca resultante se concentró al vacío y se eliminó el agua como un azeótropo después de la concentración con MeCN (30 ml). Este proceso azeótropo se repitió dos veces más con MeCN (30 ml). En la última evaporación, la suspensión blanca resultante de compuesto **2** se dejó en MeCN (15 ml).

Paso 2: Preparación de fosfonato de hidrógeno de (2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluorotetrahidrofuran-3-il)oxi)(2-cianoetoxi)fospforotioil)oxi)metil)-4-fluorotetrahidrofuran-3-ilo (**4**): Una solución de (2-cianoetil) diisopropilfosforamidita de (2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluorotetrahidrofuran-3-ilo (**3**, 2.5 g, 2.9 mmol, ChemGenes) en MeCN (20 ml) se secó a través de concentración a vacío. Este proceso se repitió dos veces más para eliminar el agua como un azeótropo. En el último azeótropo, a la solución de compuesto **3** en MeCN (7 ml) se le introdujeron diez tamices moleculares de 3Å y la solución se almacenó bajo una atmósfera de nitrógeno. A una mezcla agitada del compuesto **2** con dicloroacetato piridin-1-io residual en MeCN (15 ml) se añadió la solución de compuesto **3** en MeCN (7 ml). Después de cinco minutos, a la mezcla agitada se añadió DDTT (650 mg, 3.2 mmol). Después de 30 min, la mezcla amarilla se concentró al vacío para dar el compuesto **4** como un aceite amarillo.

Paso 3: Preparación de N,N'-(((2R,3R,3aR,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-5-(2-cyanoetoxi)-3,10-difluoro-12-mercapto-12-oxido-5-sulfidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-

j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diil)bis(9H-purine-9,6-diil))dibenzamida(**5**): A una solución de compuesto **4** en CH_2Cl_2 (60 ml) se le añadió agua (0.35 ml) y una de solución al 6 % (v/v) de DCA en CH_2Cl_2 (60 ml). Después de diez minutos a temperatura ambiente, a la solución de color rojo se introdujo piridina (20 ml). La mezcla amarilla resultante se concentró al vacío hasta que quedaron aproximadamente 20 ml de la mezcla amarilla. A la mezcla amarilla se le introdujo piridina (20 ml) y la mezcla se concentró a vacío hasta que quedaron aproximadamente 20 ml de la mezcla amarilla. A la mezcla amarilla se le añadió piridina (30 ml) y la mezcla se concentró a vacío hasta que quedaron aproximadamente 30 ml de la mezcla amarilla. A la mezcla amarilla agitada en piridina (30 ml) se le añadió DMOCP (1.6 g, 8.4 mmol). Después de siete minutos, se añadió agua (1.4 ml) a la solución de color naranja oscuro, seguido inmediatamente por la introducción de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona (0.71 mg, 4.2 mmol). Después de cinco minutos, la solución de color naranja oscuro se vertió en una solución acuosa de $NaHCO_3$ 1 N (400 ml). Después de diez minutos, la mezcla bifásica se extrajo con EtOAc (200 ml) y éter dietílico (200 ml). Después de la separación, la capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (200 ml) y éter dietílico (200 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se concentraron a vacío. Al aceite amarillo concentrado se le añadió tolueno (75

ml) y la mezcla se evaporó a vacío para eliminar la piridina residual. Este procedimiento se repitió dos veces con tolueno (75 ml). El aceite resultante se purificó por cromatografía en gel de sílice (0 % a 10 % de MeOH en CH_2Cl_2) para proporcionar el compuesto **5** (67 mg, 2.5 % de rendimiento) como un aceite naranja.

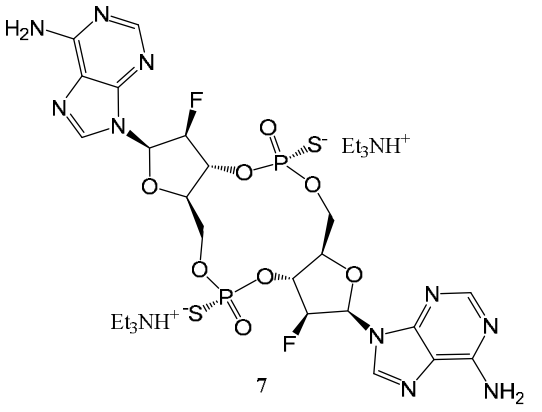
Paso 4: Preparación de 3'3 '-RR- (2'F-A) (2'F-A) (**6**) y 3'3'RS-(2'F-A) (2'F-A) (**6a**): A una solución agitada del compuesto **5** (65 mg, 0.07 mmol) en MeOH (0.9 ml) se le añadió hidróxido de amonio acuoso (0.9 ml) y la suspensión naranja se calentó a 50 °C. Después de dos horas, la solución naranja se dejó enfriar y se concentró a vacío. El residuo naranja se purificó por cromatografía en gel de sílice de fase inversa (0 % a 30 % de MeCN en 10 mM de TEAA acuoso) para obtener el compuesto **6** (18 mg, 38 % de rendimiento) como una sal de mono-trietilamonio blanca después de la liofilización. LCMS-ESI: 693.25 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{20}H_{22}F_2N_{10}O_8P_2S_2$: 694.305); R_t: 16.698' min para las condiciones de HPLC (10 mM de TEAA, 2 % a 20 %); R_t: 20.026'. min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2 % a 20 %). ^1H NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8,44 (s, 2H), 8,24 (s, 2H), 6,52 (d, J = 16,4 Hz, 2H), 5,80 (d, J = 3,6 Hz, 1H) , 5,67 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 5,37-5,26 (m, 2H), 4,77-4,65 (m, 4H), 4,22 (dd, J = 11,4 Hz, 6,0 Hz, 2H), 3,34 (q, J = 7,0 Hz, 6H), 1,43 (t, J = 7,0 Hz, 9H). 19F NMR (400 MHz, 45 ° C, D_2O) δ -200,74

a 200,98 (m). 3^1P NMR (45 °C, D_2O) δ 54.46. La estereoquímica de este compuesto, como se representa en el Esquema 1, se confirmó mediante la estructura de co-cristal unido a proteína STING tipo silvestre.

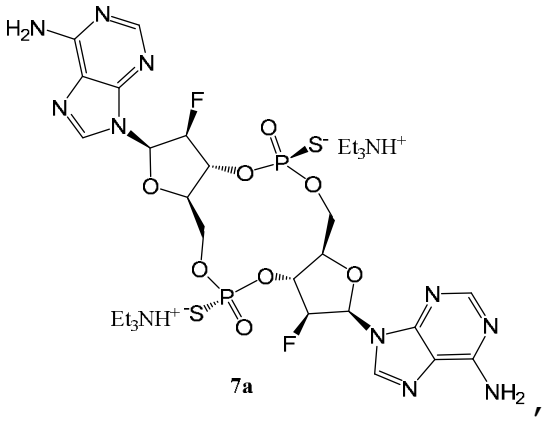
También se preparó la sal sódica del compuesto **6**. En una pequeña columna micro (1 ml de capacidad) de Bio-Rad (Bio-Spin, Cat # 732-6008) se cargó la resina de AG® 50W-X2 de Bio-Rad (catálogo 143-5241, grado biotecnológico, malla 100-200, forma de hidrógeno, CAS 69011-20-7) hasta el marcador 0.2 en la columna micro. La resina se empapó cinco veces con agua Millipore filtrada (0.5 ml) y se dejaron fluir lavados con agua resultantes a través de la gravedad. Los lavados se desecharon. La resina se trató con 2 ml de solución de hidróxido de sodio acuoso 1N. Después, la resina condensada se lavó seis veces con 2 ml de agua Millipore filtrada. La sal de $TEAH^+$ del compuesto **6** (5 mg) se disolvió en 2 ml de agua Millipore filtrada y se cargó en la resina. La resina se lavó seis veces con 2 ml de agua Millipore filtrada y el producto deseado se recogió de las fracciones de elución y se liofilizó durante la noche para proporcionar la sal de sodio del compuesto **6** (3 mg). El isómero Rp,Sp también se aisló después de la purificación en el paso de cromatografía de fase inversa, para proporcionar el compuesto **6a** (9.0 mg, 99 %) como la sal de bis-trietilamonio después de la liofilización. LCMS-ESI: 693.30 $[M-H]^-$(calculado

para $C_{20}H_{22}F_2N_{10}O_8P_2S_2$: 694.05); R_t 13.830' min para las condiciones de HPLC (TEAA 10 mM, 2 % a 20 %). R_t 15.032 'min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2 % a 20 %). ^1H NMR. (400 MHz, 45 ° C, D_2O) δ 8.65 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 6.58 (dd, J = 16.4, 2.8 Hz, 2H), 6.00 (dd, J = 51.2, 3.6 Hz, 1H), 5.69 (dd, J = 51.2, 3.8 Hz, 1H), 5.32-5.15 (m, 2H), 4.77-4.67 (m, 3H), 4.61 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.25 (dd, J = 11.8, 4.2 Hz, 2H), 3.33 (q, J = 7.2 Hz, 12H), 1.43 (t, J = 7.2 Hz, 18H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ -200.75-201.31 (m). ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 54.69, 54.64.

Los compuestos 5,12-dióxido de (2R,3S,3aR,5R,7aR,9R,10S,10aR,12R,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercaptooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin (**7**), también denominado 3'3'-RR-(2'βF-A) (2'βF-A) o ditio-(Rp, Rp)-cíclico [2 'Bf-A (3',5') p2'βF-A(3',5') p] y 5,12-dióxido de (2R,3S,3aR,5R,7aR,9R,10S,10aR,12S,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercaptooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecine (**7a**), también denominado 3'3'-RS-(2'βF-A) (2'βF-A) o ditio-(Rp, Sp)-cíclico-[2'βF-A(3',5')p-2'βF-A(3',5') p],



7 y



7a,

se prepararon de manera similar al método del Esquema 1, donde se utilizó N-(9-((2R,3S,4R,5R)-5-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-3-fluoro-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)-9H-purin-6-il)benzamida (0.4 g, 0.6 mmol, Glen Research, Sterling, Virginia) en lugar del compuesto **1** en el Paso 1, y se utilizó (2R,3R,4S,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluorotetrahidrofuran-3-il-(2-cianoetil)-diisopropilfosforamidita (0.5 g, 0.6 mmol, Glen Research) en lugar del compuesto **3** en el paso 2. Se obtuvieron el compuesto **7** (6.4 mg, 97 % de pureza) y **7a** (5.0 mg, 93 % de pureza) como las sales de bis-trietilamonio después de la purificación mediante HPLC de fase inversa y liofilización.

Compuesto **7**: LCMS-ESI: 695.75 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{22}F_2N_{10}O_8P_2S_2$: 694,05); R_t 16.779' min para las condiciones de

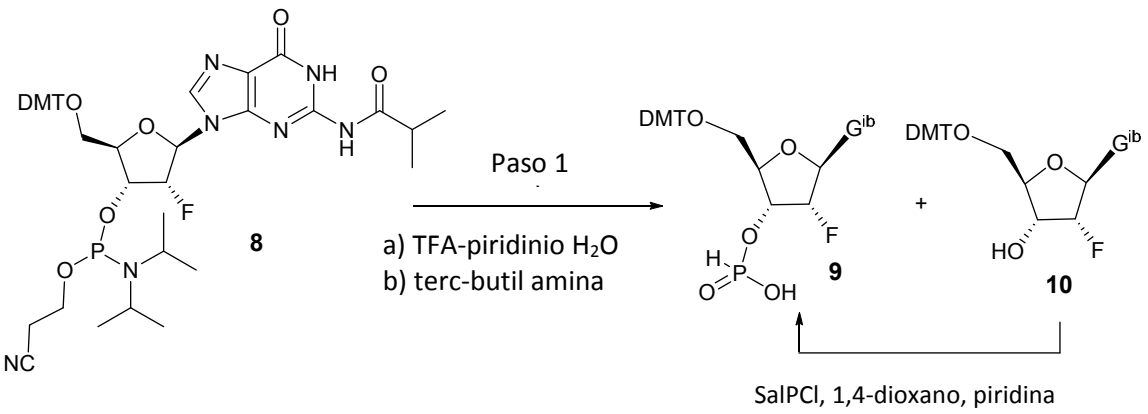
HPLC (TEAA 10 mM, 2 % a 20 %). R_t 7.616 'min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2 % a 50 %). ^1H NMR. (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8.65 (s, 2H), 8.49 (s, 2H), 6.79 (dd, J = 14.4, 4.2 Hz, 2H), 5.86 (br s, 1H), 5.74 (br s, 1H), 5.52-5.44 (m, 2H), 4.59 (br s, 2H), 4.51-4.40 (m, 4H), 3.39 (q, J = 7.2 Hz, 12H), 1.48 (t, J = 7.2 Hz, 18H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 ° C, D_2O) δ -196.47-196.70 (m).

Compuesto **7a**: LCMS-ESI: 695.75 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{22}F_2N_{10}O_8P_2S_2$: 694,05); R_t 14.216' min para las condiciones de HPLC (TEAA 10 mM, 2 % a 20 %). R_t 8,106 'min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2 % a 50 %). ^1H NMR. (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8.65 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.44 (s, 2H), 6.73 (d, J = 14.8 Hz, 2H), 5.88-5.64 (m, 2H), 5.48-5.41 (m, 2H), 4.57 (br s, 2H), 4.46-4.35 (m, 4H), 3.34 (q, J = 7.2 Hz, 12H), 1.43 (t, J = 7.2 Hz, 18H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ -196.98-197.61 (m). ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 57.28, 55.16, 55.09.

Ejemplo 2: Síntesis de 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) (14) y 3'3'-RS-(2'F-G)(2'F-A) (14a)

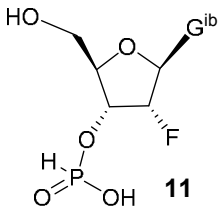
[00382] 2-Amino-9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (**14**), también denominado 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) o ditio-(Rp,Rp)-cíclico-[2'F-G (3',5') p2'F-A

(3',5')p], y 2-amino-9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12S,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (**14a**), también denominado 3'3'-RS-(**2'**F-G)(**2'**F-A) o ditio-(Rp,Sp)-cíclico-[2'F-G (3', 5')p-2'F-A(3',5')p], se prepararon de acuerdo con el siguiente esquema 2.



Paso 2

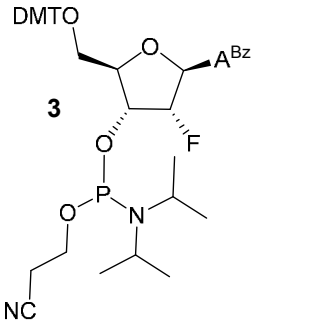
DCA, H_2O, CH_2Cl_2



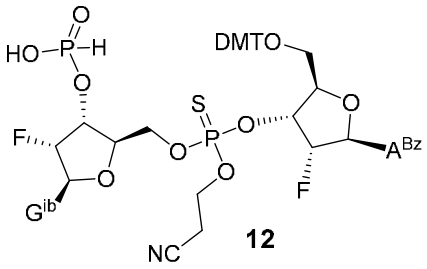
11

Paso 3

a) dicloroacetato de piridinio residual, H_2O



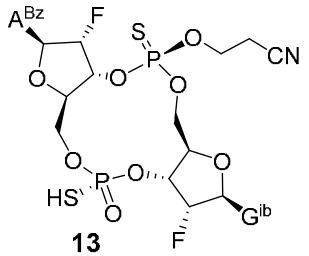
3



12

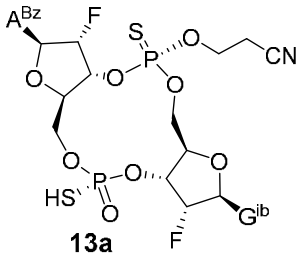
Paso 4

a) DCA, H_2O, CH_2Cl_2
b) DMOCP, piridina
c) 3H-1,2-benzoditiol-3-ona



13

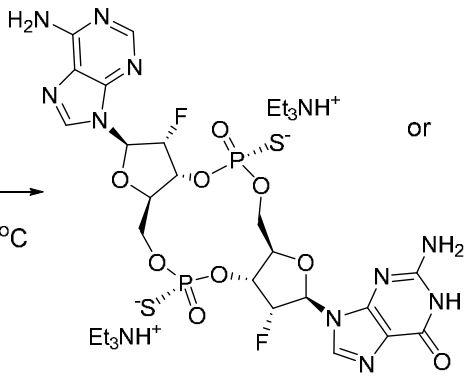
y



13a

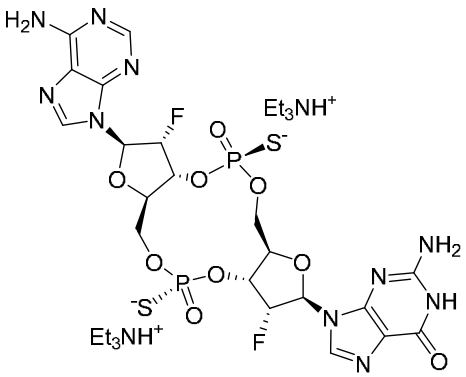
Paso 5

a) AMA, 50 °C
b) HPLC



14

or



14a

Paso 1: Preparación de fosfonato de hidrógeno de (2R,3R,4R,5R)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluoro-5-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)tetrahidrofuran-3-ilo (**9**): A una solución de (2R,3R,4R,5R)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluoro-5-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)tetrahidrofuran-3-il(2-cianoetil) diisopropilfosforamidita (**8**, 1 g, ChemGenes) en acetonitrilo (5 ml) y agua (36 µL) se añadió trifluoroacetato de piridinio (232 mg). La reacción se agitó durante 1 min seguido de la adición de terc-butilamina (5 ml). La reacción procedió durante 10 min y se concentró a vacío y se co-evaporó a vacío con acetonitrilo (2 x 10 ml) para dar una mezcla de los compuestos **9** y **10** ~ (4: 1). La mezcla se recogió en 1,4-dioxano anhidro (9 ml) seguido de la adición de piridina anhidra (3 ml) y una solución de SalPCl (210 mg) en 1,4-dioxano (4.5 ml). Después de agitar durante 15 min la mezcla de reacción se inactivó con agua (1.5 ml) seguido de la adición de solución saturada de $NaHCO_3$ (60 ml). La mezcla se extrajo 3 x 60 ml con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se concentraron a vacío para dar una mezcla bruta 1.7 g de Paso 5 to **9** en su mayoría (6:1).

Paso 2: Preparación de fosfonato de hidrógeno de (2R,3R,4R,5R)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-5-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)tetrahidrofuran-3-ilo (**11**): se

añadió agua (0.18 ml) a una solución de compuesto **9** (1.7 g) y DCM (12 ml) seguido de una solución de la solución de 6 % de DCA en DCM (12 ml). Después de 10 min, la mezcla de reacción se inactivó con piridina (1.4 ml) y después se concentró a vacío. El material bruto se co-evaporó al vacío con 3 x 6.6 ml de acetonitrilo anhidro dejando 1.4 ml del compuesto **11**.

Paso 3: Preparación de fosfonato de hidrógeno de (2R,3R,4R,5R)-2-(((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluorotetrahidrofuran-3-il)oxi)(2-cianoetoxi)fosforotioil)oxi)metil)-4-fluoro-5-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)tetrahidrofuran-3-ilo (**12**): Se añadió una solución del compuesto **3** (co-evaporada al vacío 3 x 6.6 ml con acetonitrilo anhidro, dejando 4 ml) en 4 ml de acetonitrilo anhidro y la solución 1.4 ml de compuesto **11** y la reacción se agitó durante 2 min. Se añadió DDTT (0.226 g) y la reacción procedió durante 30 min, a continuación se concentró al vacío a sequedad para dar 3.6 g del compuesto **12**.

Paso 4: Preparación de N-(9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-5-(2-cianoetoxi)-3,10-difluoro-9-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-12-mercapto-12-oxido-5-sulfidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-

j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-9H-purin-6-il)benzamida (**13**): Se añadió agua (60 µL) a una solución del compuesto **12** (1.8 g) en DCM (12 ml) seguido de una solución al 6 % de DCA en DCM (12 ml). Después de 10 min, la mezcla de reacción se inactivó con piridina (5 ml) y se concentró a vacío para eliminar el DCM. Se añadió una cantidad adicional de piridina (15 ml) y la mezcla se concentró a vacío hasta 10 ml. Se añadió DMOCP (292 mg) y la reacción se agitó durante 3 min, seguido de la adición de agua (266 µL) y después 3-H-1,3-benzoditiol-3-ona (130 mg). Después de 5 min, la reacción se inactivó con una solución saturada de $NaHCO_3$ (75 ml) y se extrajo con una mezcla 1:1 de éter etílico y EtOAc. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con 25 ml adicionales de mezcla 1:1 de éter etílico y EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se concentraron a vacío para dar 1.2 g de compuesto **13** bruto. La fase normal de purificación de gel de sílice (100 % DCM a DCM 90: MeOH 10) dio 50 mg del compuesto **13** como un sólido blanco (enriquecido en el diastereómero R_pR_p) y 20 mg de N-(9-((2R,3R,3aR,5S,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-5-(2-cianoetoxi)-3,10-difluoro-9-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-12-mercapto-12-oxido-5-sulfidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-9H-purin-6-il)benzamida (**13a**) enriquecido en el diastereómero R_pS_p.

Paso 5: Preparación de RR-(2´F-G)(2´F-A) (**14**) y 3'3'-RS-(2´F-G)(2´F-A) (**14a**): Una solución de del compuesto **13** enriquecido en R_PR_P (50 mg) en AMA (0.84 ml) y EtOH (0.36 ml) se calentó a 50 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se purgó con argón durante 10 min, después se concentró a vacío. La purificación por fase inversa C18 MPLC y HPLC preparativa dio 9 mg del compuesto **14** como la sal de tris-trietilamonio. LCMS-ESI: 711.30 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{22}F_2N_{10}O_9P_2S_2$: 710,05); R_t: 12,7 min (2-50 % de MeCN / NH_4OAc (20 mM) de amortiguador, 20 min, 1 mL/min, 5 µm de Acclaim 120). ^1H NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8,53 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 5,72 (dd, J = 14,0, 4,4 Hz, 1H), 5,58 (dd, J = 14,0, 4,0 Hz, 1H), 5.31 a 5.22 (m, 2H), 4,70-4,59 (m, 2H), 4.24 a 4.19 (m), 3,26 (q, J = 7,2 Hz, 21H) , 2,05 (s, 1,7H), 1,40 (t, J = 7,2 Hz, 32H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ-199,2 (td, J = 56, 24 Hz), 200,1 (td, J = 56, 24, 20 Hz), ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 54,91; 54.65. Ver Fig. 1.

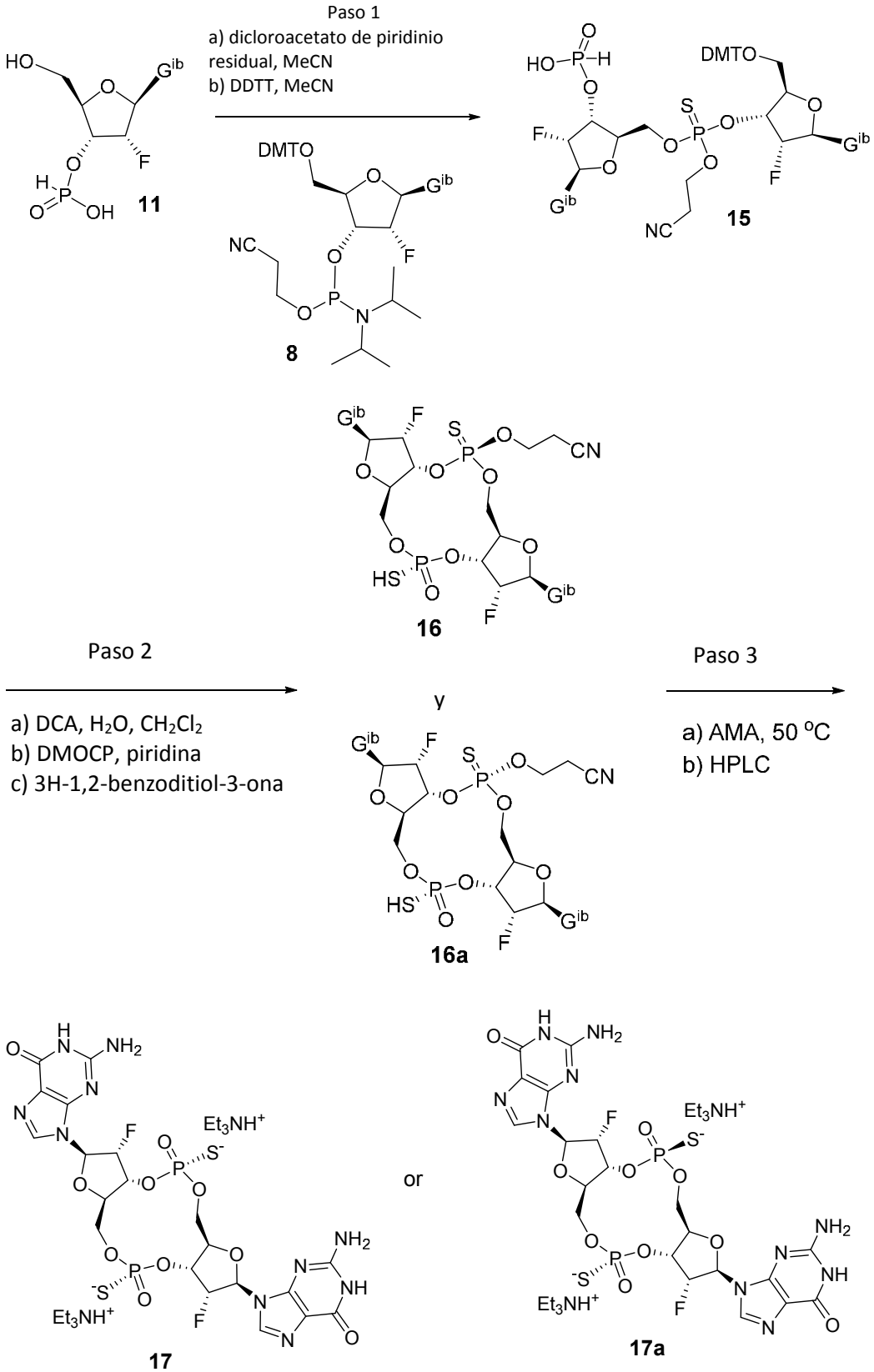
RS-(2'F-G)(2'F-A) (**14a**) se preparó de manera similar y se purificó a partir del compuesto **13a** enriquecido en el diastereómero R_PS_P. Una solución de compuesto **13a** (20 mg) en AMA (0.42 ml) y EtOH (0.18 ml) se calentó a 50 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se purgó con argón durante 10 min, después se concentró a vacío. La purificación por fase inversa C18 MPLC y HPLC preparativa

dio 6.9 mg del compuesto **14a** como la sal de tetra-trietilamonio. LCMS-ESI: 711.25 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{22}F_2N_{10}O_9P_2S_2$: 710,05); R_t: 8,7 min (2-50 % de MeCN/NH_4OAc (20 mM) de amortiguador, 20 min, 1 mL/min, 5 µm de Acclaim 120). ^1H NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8,53 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 6,62 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 6,42 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,97 (dd, J = 51,6, 4 Hz, 1H), 5,64 (dd, J = 51,6, 4 Hz, 1H), 5.27 a 5.25 (m, 2H), 4,64-4,52 (m , 2H), 4,24 (td, J = 10,8 Hz, 3,2 Hz, 2H), 3,27 (q, J = 7,2 Hz, 24H), 2,05 (s, 2H), 1,40 (t, J = 7,2 Hz, 36H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ -199,8 (td, J = 53, 18 Hz), -200,9 a 201,1 (m), ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 55,3; 54.62.

Ejemplo 3: Síntesis de 3'3'-RR- (2'F-G) (2'F-G) (17) y 3'3'-RS- (2'F-G) (2'F-G) (17a)

9,9'-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diil)bis(2-amino-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona) (**17**), también denominado 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-G) o ditio-(Rp,Rp)-cíclico-[2'F-G (3',5')p-2'F-G(3',5')p], y 9,9'-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12S,14aR)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diil)bis(2-amino-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona) (**17a**), también denominado

3'3'-RS-(2'F-G)(2'F-G) o ditio (Rp,Sp)-cíclico-[2'F-G (3',5')p-2'F-G(3',5')p], se prepararon de acuerdo con el siguiente esquema 3.


Paso 1
a) dicloroacetato de piridinio residual, MeCN
b) DDTT, MeCN
11
8
15
16
Paso 2
a) DCA, H2O, CH2Cl2
b) DMOCP, piridina
c) 3H-1,2-benzoditiol-3-ona
y
16a
Paso 3
a) AMA, 50 ºC
b) HPLC
17
or
17a

preparado de acuerdo con el Esquema 2 a partir de 3.4 g de compuesto **9**) y la reacción se agitó durante 2 min. Se añadió DDTT (0.452 g) y la reacción procedió durante 30 min, a continuación se concentró a sequedad a vacío para dar 8.14 g del compuesto **15**.

Paso 2: Preparación de N,N'-(((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-5-(2-cianoetoxi)-3,10-difluoro-12-mercapto-12-oxido-5-sulfidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diil)bis(6-oxo-6,9-dihidro-1H-purino-9,2-diil))bis(2-metilpropanamida) (**16**): A una solución del compuesto **15** bruto (8.4 g) en DCM (48 ml) se añadió agua (240 µL) seguido de una solución 6 % de DCA en DCM (48 ml). Después de 10 min, la mezcla de reacción se inactivó con piridina (20 ml) y se concentró a vacío para eliminar el DCM. Se añadió una cantidad adicional de piridina (60 ml) y la mezcla se concentró a vacío hasta 20 ml. Se añadió DMOCP (1.2 g) y la reacción se agitó durante 3 min, seguido de la adición de agua (1 ml) y después 3-H-1,3-benzoditiol-3-ona (520 mg). Después de 5 min, la reacción se inactivó con una solución saturada de $NaHCO_3$ (300 ml) y se extrajo con una mezcla 1: 1 de éter etílico y EtOAc. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con DCM. Las capas orgánicas combinadas se concentraron a vacío para dar el compuesto **16** bruto. La

purificación en gel de sílice de fase normal (100 % DCM a DCM 90: MeOH 10) dio 150 mg de **16** como un sólido blanco (enriquecido en el diastereómero R_pR_p) y 260 mg de N,N'-(((2R,3R,3aR,5S,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-5-(2-cianoetoxi)-3,10-difluoro-12-mercapto-12-oxido-5-sulfidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diil)bis(6-oxo-6,9-dihidro-1H-purino-9,2-diil))bis(2-metilpropanamida) (**16a**) enriquecido en el diastereómero R_pS_p.

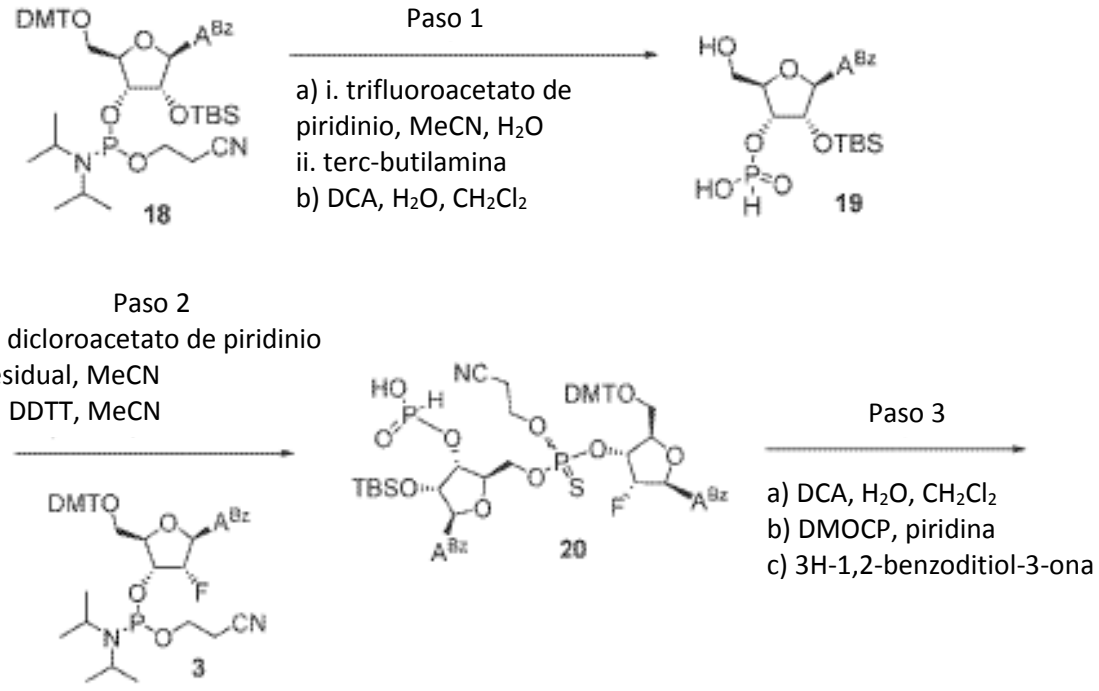
Paso 3: Preparación de 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-G) (**17**): Una solución del compuesto **16** (75 mg) en AMA (1.3 ml) y EtOH (0.54 ml) se calentó a 50 °C durante 4h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se purgó con argón durante 10 min, después se concentró a vacío. La purificación por fase inversa C18 MPLC y HPLC preparativa dio 19 mg del compuesto **17** como la sal de bis-trietilamonio. LCMS-ESI: 725.25 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{20}H_{22}F_2N_{10}O_{10}P_2S_2$: 726,04); R_t: 10.44 min (2-50 % de MeCN / NH_4OAc (20 mM) de amortiguador, 20 min, 1 mL / min, 5 µm de Acclaim 120). ^1H NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8,15 (s, 2H), 6,40 (d, J = 18,8 Hz, 2H), 5,67 (d, J = 52,0 Hz, 2H), 5,34-5,26 (m, 2H), 4,66-4,61 (m, 4H), 4.22 a 4.18 (m, 2H), 3,36 (q, J = 7,2 Hz, 10H), 1,43 (t, J = 7,2 Hz, 15H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ -199,2 a -199,4 (m), ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 54,7.

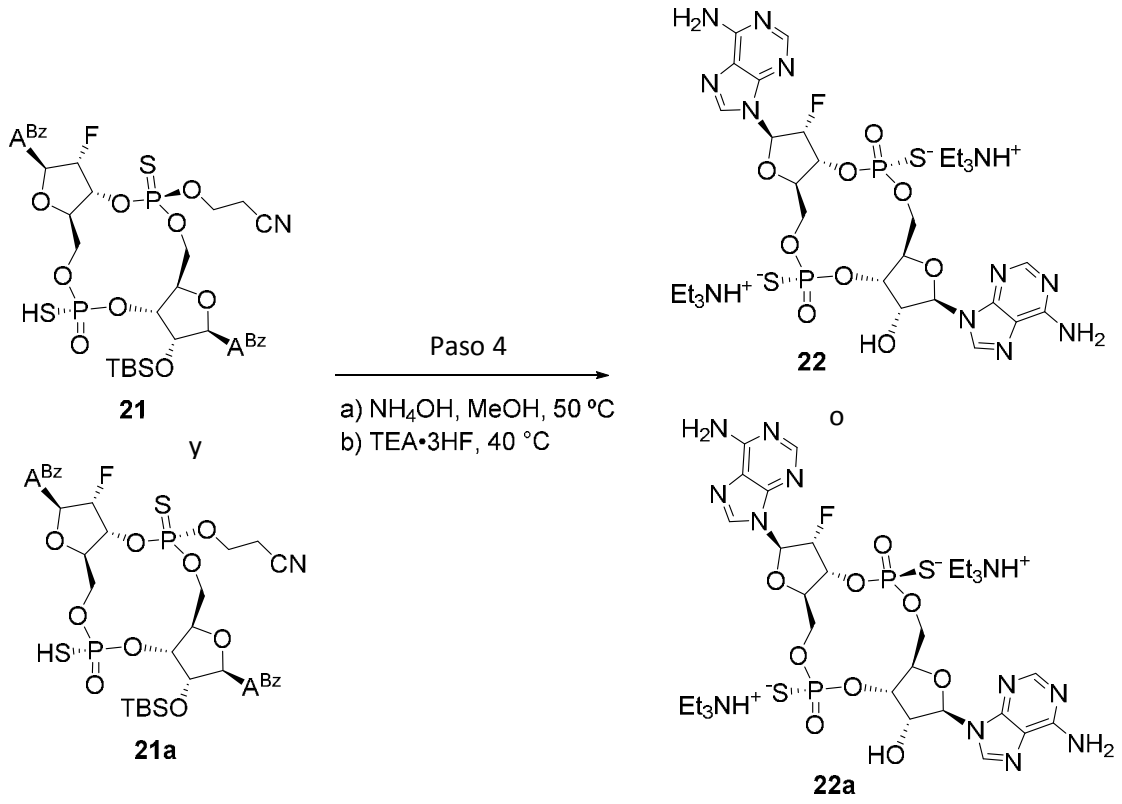
3'3'-RS-(2´F-G)(2´F-G) (**17a**) se preparó de manera similar. Una solución de compuesto **16a** (160 mg) en AMA (1.3 ml) y EtOH (0.54 ml) se calentó a 50 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se purgó con argón durante 10 min, después se concentró a vacío. La purificación por fase inversa C18 MPLC y HPLC preparativa dio 6.5 mg del compuesto **17a** en forma de sal de amonio. LCMS-ESI: 725.25 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{20}H_{22}F_2N_{10}O_{10}P_2S_2$: 726,04); R_t: 9,17 min (2-50 % de MeCN/NH_4OAc (20 mM) de amortiguador, 20 min, 1 mL/min, 5 µm de Acclaim 120). ^1H NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8,33 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,40 (dd. J = 17,6, 7,6 Hz, 2H), 6,02 (dd, J = 51,6, 3,2 Hz, 1H), 5,72 (dd, J = 51,2, 3,2 Hz, 1H), 5,39-5,29 (m, 2H), 4,66-4,52 (m, 4H), 4.25 a 4.17 (m, 2H), 2,15 (s, 1,4H).

Ejemplo 4: Síntesis de 3'3'-RR-(A)(2'F-A)(22) y 3'3'-RS-(A)(2'F-A) (22a)

5,12-dióxido de (2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aS,12R,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3-fluoro-10-hidroxi-5,12-dimercaptooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin (**22**), también denominado 3'3'-RR-(A)(2'F-A) o ditio-(Rp,Rp)-cíclico-[A(3',5')p-2'F-A(3',5')p], y 5,12-dióxido de (2R,3R,3aR,5S,7aR,9R,10R,10aS,12R,14aR)-2,9-bis(6-amino-9H-purin-9-il)-3-fluoro-10-hidroxi-5,12-dimercaptooctahidro-

2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin (**22a**), también denominado 3'3 '-RS-(A)(2'F-A) o ditio (Rp,Rp)-cíclico-[A(3',5')p-2'F-A(3',5')p], se prepararon de acuerdo con el siguiente esquema 4.





Paso 1: Preparación de fosfonato de hidrógeno de (2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-4-((tert-butildimetilsilil)oxi)-2-(hidroximetil)tetrahidrofuran-3-ilo (**19**): A una solución de (2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-((terc-butildimetilsilil)oxi)tetrahidrofuran-3-il (2-cianoetil) diisopropilfosforamidita (**18**, 2.0 g, 2.0 mmol, ChemGenes) en MeCN (10 ml) se añadió agua (0.07 ml) seguido de trifluoroacetato de piridinio (0.47 g, 2.4 mmol, 1.2 equiv, Aldrich). Después de agitar durante diez minutos, a la reacción incolora se introdujo terc-butilamina (10 ml, 95 mmol, 47 equiv, Aldrich). Después de diez minutos, la solución incolora

se concentró a vacío y se eliminó el agua como un azeótropo después de su concentración tres veces más con MeCN (30 ml) para dar una espuma incolora. La espuma incolora se disolvió en CH_2Cl_2 (25 ml), lo que resultó en una solución incolora. A esta solución incolora se añadió agua (0.36 ml) y una solución al 6 % (v/v) de DCA en CH_2Cl_2 (24 ml), que convirtió a la solución incolora en una solución de color rojo brillante. Después de diez minutos de agitación a temperatura ambiente, a la solución de color rojo se le añadió piridina (3 ml). La mezcla blanca resultante se concentró al vacío y se eliminó el agua como un azeótropo después de la concentración con MeCN (30 ml). Este proceso azeótropo se repitió tres veces más con MeCN (30 ml). En la última evaporación, la suspensión blanca resultante de compuesto **19** se mantuvo en MeCN (15 ml).

Paso 2: Preparación de fosfonato de hidrógeno de (2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-(((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluorotetrahidrofuran-3-il)oxi)(2-cianoetoxi)fosforotioil)oxi)metil)-4-((terc-butildimetilsilil)oxi)tetrahidrofuran-3-ilo (**20**): Una solución del compuesto **3** (1.8 g, 2.0 mmol, ChemGenes) en MeCN (20 ml) se secó a través de la concentración a vacío. Este proceso se repitió dos veces más con MeCN (20 ml) para eliminar el agua como un azeótropo. En el último azeótropo, a la solución de

compuesto **3** en MeCN (6 ml) se le añadieron seis tamices moleculares de 3Å y la solución se almacenó bajo una atmósfera de nitrógeno. A una mezcla agitada del compuesto **19** con dicloroacetato de piridin-1-io residual en MeCN (15 ml) se introdujo la solución de compuesto **3** en MeCN (6 ml). Después de diez minutos, se añadió DDTT (460 mg, 2.2 mmol) a la mezcla agitada. Después de 30 minutos, la mezcla de color amarillo se concentró a vacío para proporcionar el compuesto **20** como un aceite amarillo.

Paso 3: Preparación de N,N'-(((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-3-((tert-butildimetilsilil)oxi)-12-(2-cianoetoxi)-10-fluoro-5-mercapto-5-oxido-12-sulfidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diil)bis(9H-purino-9,6-diil))dibenzamida (**21**) y N,N'-(((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12S,14aR)-3-((tert-butildimetilsilil)oxi)-12-(2-cianoetoxi)-10-fluoro-5-mercapto-5-oxido-12-sulfidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diil)bis(9H-purino-9,6-diil))dibenzamida (**21a**): A una solución de color amarillo claro del compuesto **20** en CH_2Cl_2 (50 ml) se le introdujo agua (0.24 ml) y una solución de 6 % (v/v) de DCA en CH_2Cl_2 (50 ml), resultando en una solución de color rojo. Después de agitar durante diez minutos a temperatura ambiente,

a la solución de color rojo se le añadió piridina (15 ml). La mezcla amarilla resultante se concentró al vacío hasta que aproximadamente se mantuvieron 25 ml de la mezcla amarilla. A la mezcla amarilla se añadió más piridina (50 ml) y la mezcla se concentró a vacío hasta que aproximadamente se mantuvieron 30 ml de la mezcla de color amarillo. Este proceso se repitió una vez más con piridina (50 ml) hasta que se mantuvieron 30 ml de la mezcla de color amarillo. A la mezcla amarilla agitada en piridina (30 ml) se le introdujo DMOCP (1.1 g, 6.0 mmol, 3 equiv, Aldrich). Después de cinco minutos de agitación, a la solución de color naranja oscuro se añadió agua (1.0 ml), seguido inmediatamente por la adición de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona (0.5 g, 3.0 mmol, 1.5 equiv, Aldrich). Después de cinco minutos de agitación, la solución de color naranja oscuro se vertió en una solución acuosa 1 N de $NaHCO_3$ (400 ml). Después de diez minutos de agitación, la mezcla bifásica se extrajo con EtOAc (200 ml) y CH_2Cl_2 (200 ml). Después de la separación de las capas, la capa acuosa se extrajo de nuevo dos veces más con CH_2Cl_2 (400 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se concentraron a vacío. Al aceite de color amarillo concentrado se le introdujo tolueno (100 ml) y se eliminó la piridina residual a vacío. Este procedimiento se repitió una vez más con tolueno (100 ml). El aceite amarillo resultante se purificó por cromatografía en gel de sílice (0 % a 10 % de MeOH en

CH_2Cl_2) para proporcionar el compuesto **21** (270 mg, 13 %) como un sólido de color amarillo y el compuesto **21a** (120 mg).

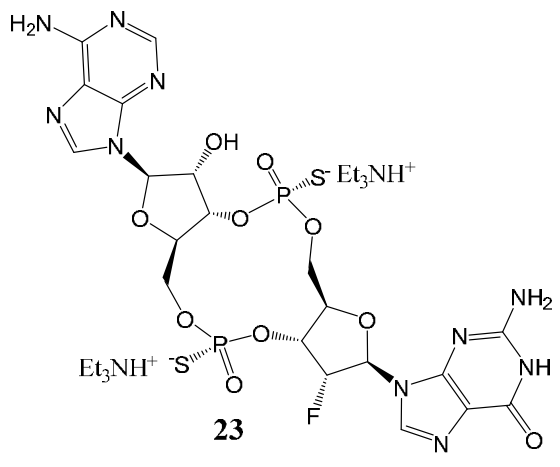
Paso 4: Preparación de 3'3 '-RR-(A)(2'F-A) (**22**) y 3'3'-RS-(A)(2'F-A) (**22a**): A una solución agitada del compuesto **21** (150 mg), enriquecido en el diasterómero Rp,Rp, en MeOH (2.0 ml) se introdujo 30 % de hidróxido de amonio acuoso (2.0 ml) y la suspensión de color amarillo se calentó a 50 °C. Después de dos horas, la solución amarilla se dejó enfriar a temperatura ambiente y la solución amarilla se concentró al vacío. Al sólido residual se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (1.2 ml, Aldrich) y la solución amarilla se calentó a 40 °C. Después de dos horas, la solución amarilla se dejó enfriar a temperatura ambiente. Esta solución de color amarillo se introdujo lentamente a una solución enfriada de TEAB 1 M (6 ml) y TEA (1.0 ml) en un baño de hielo-agua. La mezcla amarilla resultante se dejó en agitación durante 30 minutos. La mezcla de color amarillo se purificó por cromatografía de fase inversa en una columna C18 (0 % a 20 % de MeCN en 10 mM de TEAA acuoso) para obtener el compuesto **22** (24 mg, 23 %) en 96 % de pureza como una sal de tris-trietilamonio blanco después de la liofilización. LCMS-ESI: 693.25 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{23}FN_{10}O_9P_2S_2$: 692,06); R_t 12.339' min para las condiciones de HPLC (TEAA 10 mM, 2% a 20%). R_t 7,625' min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2 % a 20 %). ^1H NMR. (400 MHz, 45 °C,

D_2O) δ 8.65 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 6.58 (d, J = 16.8 Hz, 1H) , 6.33 (s, 1H), 5.69 (dd, J = 51.6, 3.6 Hz, 1H), 5.36-5.27 (m, 1H), 5.21 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 5.11 a 5.5 (m, 1H), 4.76-4.65 (m, 3H), 4.60 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.25 (dd, J = 11.8, 4,4 Hz, 2H), 3.24 (q, J = 7.2 Hz, 18H), 1.37 (t, J = 7.2 Hz, 27H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 ° C, D_2O) δ -200.73-200.93 (m). ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 54.79.

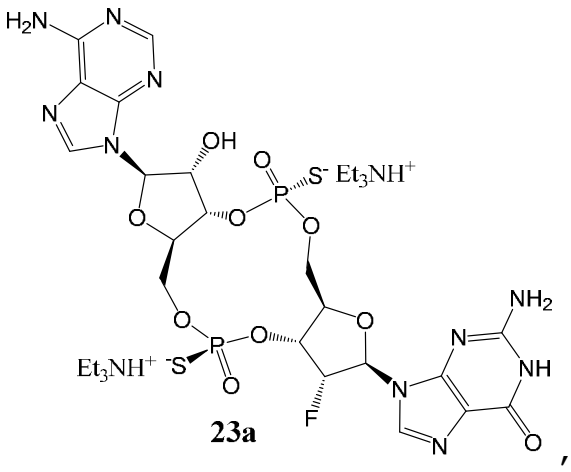
El compuesto **21a** enriquecido en el diastereómero R_pS_p reaccionó de manera similar para proporcionar el Compuesto **22a** (29 mg, 34 %) en 95 % de pureza como una sal de trietilamonio-pentakis blanca después de la purificación mediante cromatografía de fase inversa y liofilización. LCMS-ESI: 691.25 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{20}H_{23}FN_{10}O_9P_2S_2$: 692,06); R_t 10.399' min para las condiciones de HPLC (TEAA 10 mM, 2 % a 20 %). R_t 10.236' min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2% a 20%). ^1H NMR. (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8.74 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 6.62 (d, J = 16.4 Hz, 1H) , 6.36 (s, 1H), 5.93 (dd, J = 51.6, 2.8 Hz, 1H), 5.31 a 5.23 (m, 1H), 5.19 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 5.13 a 5.7 (m, 1H), 4.77-4.65 (m, H), 4.62-4.59 (m, 2H), 4.29 a 4.25 (m, 2H), 3,34 (q, J = 7.2 Hz, 30H), 1,43 (t, J = 7.2 Hz, 45H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 ° C, D_2O) δ -201.58-201.78 (m). ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 55.00.

Ejemplo 5: Síntesis de 3'3'-RR- (2'F-G)(A) (23) y 3'3'-SR-(2'F-G)(A) (23a)

2-amino-9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aS,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3-fluoro-10-hidroxi-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (23), también denominado 3'3'-RR-(2'F-G)(A) o ditio (Rp,Rp)-cíclico-[2'F-G (3', 5')p-A(3',5')p], y 2-amino-9-((2R,3R,3aR,5S,7aR,9R,10R,10aS,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3-fluoro-10-hidroxi-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (23a), también denominado 3'3'-SR-(2'F-G) (A) o ditio-(Sp,Rp)-cíclico- [2'F-G(3',5')p-A(3',5')p]



y



,

se prepararon según los métodos del Ejemplo 4, el Esquema 4. El Compuesto **18** (2.0 g, 2.0 mmol, ChemGenes) se utilizó en el paso 1, el compuesto **8** (2.0 g, 2.3 mmol, ChemGenes) se utilizó en lugar del compuesto **3** en el paso 2, y en el paso 4, se

reemplazó el hidróxido de amonio acuoso con la misma proporción de AMA, para obtener el compuesto 23 (33 mg, 99 % de pureza) como la sal de bis-trietilamonio y el compuesto **23a** (50 mg, 98 % de pureza) como la sal de tris-trietilamonio después de la purificación mediante HPLC preparativa de fase inversa y liofilización.

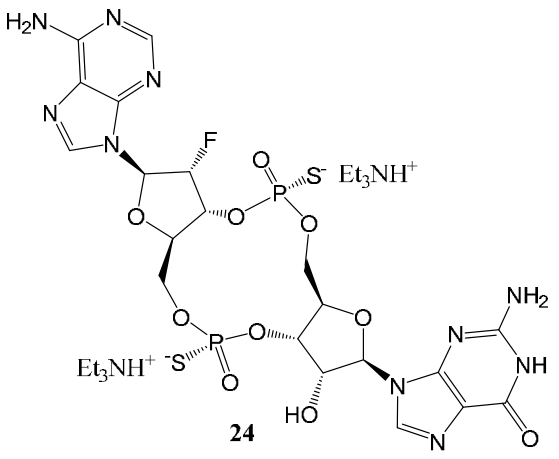
Compuesto **23**: LCMS-ESI: 707.80 $[M-H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{23}FN_{10}O_{10}P_2S_2$: 708,05); R_t 14.310 ' min para las condiciones de HPLC (TEAA 10 mM, 2 % a 20 %). R_t 7,274 ' min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2 % a 50 %). ^1H NMR. (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8.56 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 6.39 (d, J = 18.4 Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.69 (dd, J = 51.6, 4.2 Hz, 1H), 5.38-5.30 (m, 1H), 5.19 a 5.14 (m, 1H), 4.91 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.65-4.63 (m, 4H), 4.23 a 4.18 (m, 2H), 3.34 (q, J = 7.2 Hz, 12H), 1,41 (t, J = 7.2 Hz, 18H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ -199.47-199.72 (m). ^{31}P NMR (45 ° C, D_2O) δ 54.70, 54.52.

Compuesto **23a**: LCMS-ESI: 709,80 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{23}FN_{10}O_{10}P_2S_2$: 708,05); R_t 17.348' min para las condiciones de HPLC (TEAA 10 mM, 2 % a 20 %). R_t 6,354' min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2 % a 50 %). ^1H NMR. (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8.74 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 6.41 (d, J = 19.2 Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.98 (dd, J = 51.6, 4.4 Hz, 1H), 5.41-5.29 (m, 1H), 5.19 a 5.13 (m, 1H), 4.89 (d, J = 4,4 Hz,

1H), 4.63 (d, J = 9,2 Hz, 3H), 4.57 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.28 a 4.18 (m, 2H), 3,34 (q, J = 7.2 Hz, 18H), 1.42 (t, J = 7.2 Hz, 27H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ -200.11-200.36 (m). ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 55.32, 55.25, 54.66.

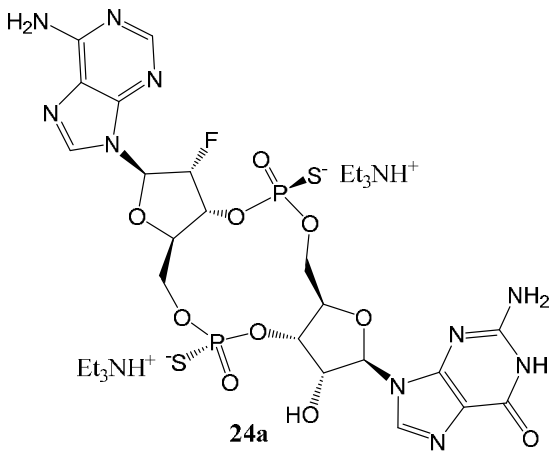
Ejemplo 6: Síntesis de 3'3'-RR- (G)(2'F-A) (24) y 3'3'-RS-(G)(2'F-A) (24a)

2-amino-9-((2R,3R,3aS,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-10-fluoro-3-hidroxi-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (**24**), también denominado 3'3'-RR-(G)(2'F-A) o ditio (Rp,Rp)-cíclico- [G(3',5') p-2'F-A(3',5')p], y 2-amino-9-((2R,3R,3aS,5R,7aR,9R,10R,10aR,12S,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-10-fluoro-3-hidroxi-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (**24a**), también denominado 3'3'-(RS-G)(2'F-A) o ditio-(Rp,Sp)-cíclico-[G(3',5')p-2'F-A(3',5')p]



24

y



24a

se prepararon según los métodos del Ejemplo 4, Esquema 4. El compuesto **3** (2.1 g, 2.4 mmol, ChemGenes) ee utilizó en lugar del compuesto **18** en el Paso 1, y (2-cianoetil) diisopropilfosforamidita de (2R,3R,4R,5R)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-((tert-butildimetilsilil)oxi)-5-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)tetrahidrofuran-3-ilo (1.6 g, 1.6 mmol, ChemGenes) se utilizó en lugar del compuesto **3** en el paso 2, para obtener el compuesto **24** (10 mg, 94 % de pureza) y el compuesto **24a** (50 mg, 96 % de pureza) como las sales de pentakis-trietilamonio después de la purificación mediante HPLC preparativa de fase inversa y liofilización.

Compuesto **24**: LCMS-ESI: 708.00 $[M-H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{23}FN_{10}O_{10}P_2S_2$: 708,05); R_t 14.878'mmin para las condiciones de HPLC (TEAA 10 mM, 2 % a 20 %). R_t 7,381' min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2 % a 50 %). ^1H NMR. (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8.52 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 6.60 (d, J =

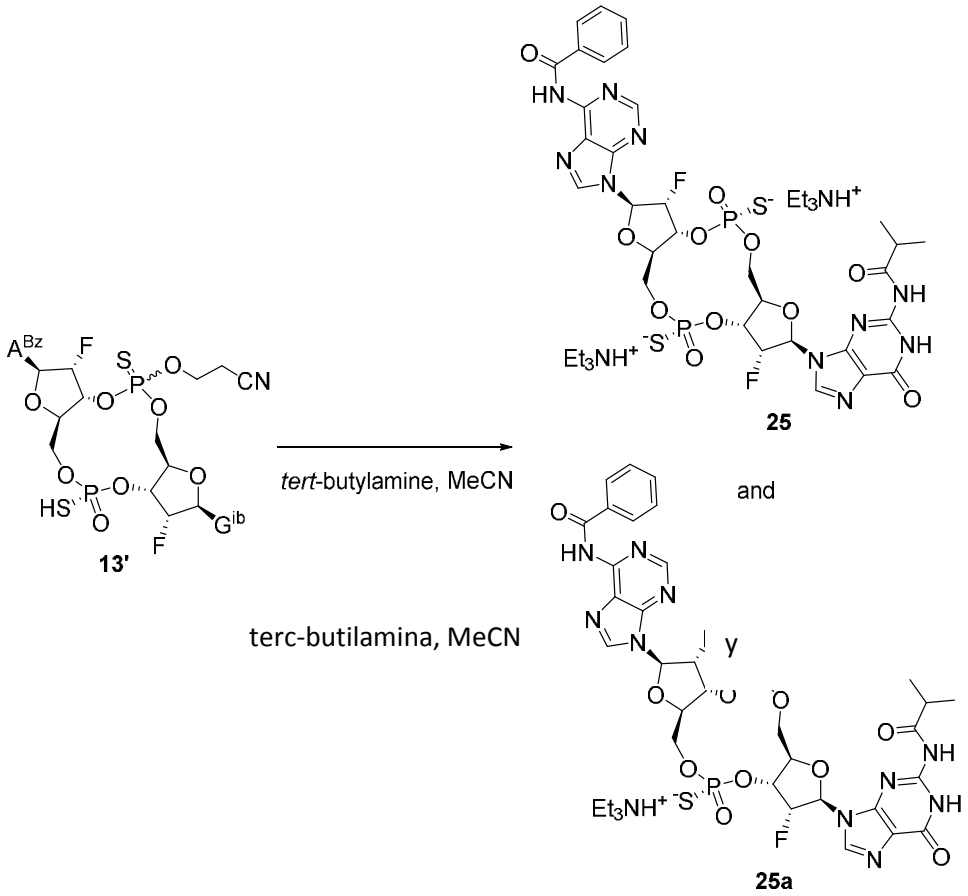
16.8 Hz, 1H), 6.13 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 5.68 (dd, J = 51.6, 4.2 Hz, 1H), 5.39-5.25 (m, 1H), 5.21 a 5.15 (m, 1H), 4.90 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 4.70-4.63 (m, 2H), 4.61-4.57 (m, 2H), 4.23 a 4.20 (m, 2H), 3.34 (q, J = 7.2 Hz, 30H), 1.43 (t, J = 7.2 Hz, 45H) . ^{19}F NMR (400 MHz, 45 ° C, D_2O) δ -200.12-200.31 (m). ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 54.9, 54.4.

Compuesto **24a**: LCMS-ESI: 710.10 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{23}FN_{10}O_{10}P_2S_2$: 708,05); R_t 12.633' min para las condiciones de HPLC (TEAA 10 mM, 2 % a 20 %). R_t 8,662' min para las condiciones de LCMS (NH_4OAc 20 mM, 2 % a 50 %). ^{1}H NMR. (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8.63 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 6.72 (d, J = 17.2 Hz, 1H), 6.23 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 51.6, 4.4 Hz, 1H), 5.47-5.32 (m, 1H), 5.31-5.24 (m, 1H), 4.98-4.90 (m, 1H), 4.87-4.85 (m, 1H), 4.84-4.78 (m, 1H), 4.69-4.65 (m, 1H), 4.63-4.56 (m, 1H), 4.38-4.28 (m, 2H), 3.34 (q, J = 7.2 Hz , 30H), 1.47 (t, J = 7.2 Hz, 45H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ -200.91-201.11 (m). ^{31}P NMR (45 °C, D_2O) δ 55.6, 55.5, 54.5.

Ejemplo 7: Síntesis de 3'3'-RR- (2'F-iBuG) (2'F-BzA) (25) y 3'3 '-RS-(2'F-iBuG) (2'F-BzA) (25a)

N-(9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-3,10-difluoro-9-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-9H-purin-6-il)benzamida (**25**), también denominado 3'3'-RR-(**2'**F-**iBuG**)(**2'**F-

BzA) o ditio-(Rp,Rp)-cíclico-[2'F-iBuG(3',5')p-2'F-BzA(3',5')p] y N-(9-((2R,3R,3aR,5S,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-3,10-difluoro-9-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-9H-purin-6-il)benzamida (**25a**), también denominado 3'3'-RS-(2´F-iBuG)(2'F-BzA) o ditio-(Rp,Sp)-cíclico-[2'F-iBuG(3',5')p-2'F-BzA(3',5')p], se prepararon de acuerdo con el siguiente Esquema 5.



A una solución del compuesto **13'** (155 mg, 0.17 mmol, 1 eq, una mezcla de diastereoisómeros **13** y **13a**, véase el Ejemplo 2) en

MeCN (0.83 ml) se añadió terc-butilamina (0.82 ml, 7.8 mmol, 47 eq). La reacción tuvo lugar durante 10 minutos y se concentró al vacío. La purificación por fase inversa C18 MPLC dio 57 mg de compuesto **25a** como la sal de trietilamonio y 41 mg de compuesto **25** como la sal de trietilamonio.

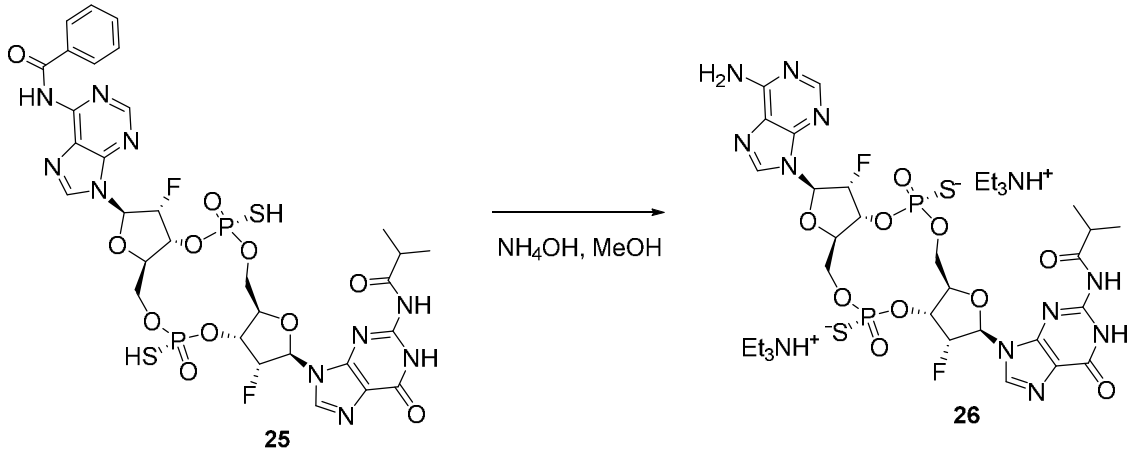
Compuesto **25**: LCMS-ESI: 883.35 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{31}H_{32}F_2N_{10}O_{11}P_2S_2$: 884,11); R_t: 5.42 min (20-100 % de MeCN/NH_4OAc (20 mM) de amortiguador, 10 min, 1 mL/min, 5 µm de Acclaim 120). ^1H NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8,85 (s, 1H), 8,80 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,13 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,82 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,73 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 6,74 (d, J = 16,8 Hz, 1H), 6,50 (s, J = 19,2 Hz, 1H), 5,84 (dd, J = 6,4, 4,8 Hz, 1H), 5,7 (dd, J = 7,6, 4,0 Hz, 1H), 5,36-5,21 (m, 2H), 4,64-4,62 (m, 2H), 4,23 (td, J = 12, 4,8 Hz, 2H), 3,35 (q, J = 7,2 Hz, 12H), 2,78-2,72 (m, 1H), 2,05 (s, 0,2H), 1,40 (t, J = 7,2 Hz, 18H), 1,19 (dd , J = 6,8 Hz, 2,4 Hz, 6H).

Compuesto **25a**: LCMS-ESI: 883.30 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{31}H_{32}F_2N_{10}O_{11}P_2S_2$: 884,11); R_t: 5.16 min (20-100 % de MeCN/NH_4OAc (20 mM) de amortiguador, 10 min, 1 mL/min, 5 µm de Acclaim 120). ^1H NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8,91 (s, 1H), 8,85 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,14 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,83 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,72 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 6,75 (d, J = 16,8 Hz, 1H), 6,50 (d, J = 20,4 Hz, 1H), 6,05 (dd, J = 50,8 Hz, 3,6 Hz, 1H), 5,9 (dd, J = 52,0 Hz, 4,4 Hz, 1H), 5,41-5,20 (m, 2H), 4,81-

4,76 (m, 2H), 4,63-4,42 (m, 2H) , 4.30 a 4.22 (m, 2H), 3,35 (q, J = 7,2 Hz, 9H), 2,52-2,43 (m, 1H), 2,05 (s, 0,5H), 1,40 (t, J = 7,2 Hz, 12H) , 1,19 (dd, J = 59,2 Hz, 6,8 Hz, 6H).

Ejemplo 8 Síntesis de 3'3'-RR- (2'F-iBuG)(2'F-A) (26)

N-(9-((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il)isobutiramida (**26**), también denominado RR-(2'F-IBuG)(2'F-A) o ditio-(Rp, Rp)-cíclico-[2'F-iBuG(3',5')p-2'F-A(3',5')p], se preparó de acuerdo con el siguiente Esquema 6.



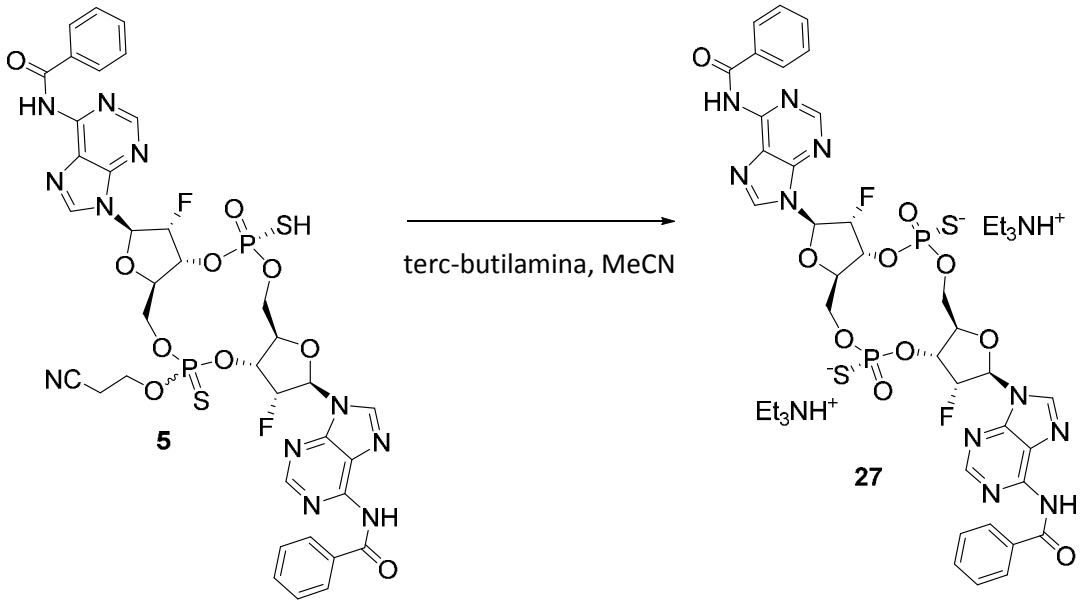
25 **26**

A una solución del compuesto **25** (20 mg, ejemplo 7, Esquema 5) en MeCN (0.83 ml) se añadió NH_4OH concentrado (0.35 ml) y MeOH (0.35 ml). La reacción procedió durante 3 h a temperatura ambiente y se concentró a vacío. La purificación por fase inversa C18 MPLC dio 6.1 mg del compuesto **26**. LCMS-ESI: 779.90

[M-H] $^-$ (calculado para $C_{24}H_{28}F_2N_{10}O_{10}P_2S_2$: 780,09); R_t: 9,01 min (2-50 % de MeCN/NH_4OAc (20 mM) de amortiguador, 10 min, 1 mL/min, 5 µm de Acclaim 120). ^1H NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8,48 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 6,36 (d, 16,4 Hz, 1H), 6,23 (d, J = 17.6 Hz 1H) 5,60 (d, J = 51,6 Hz, 1H), 5,20 (d, J = 52,0 Hz, 1H), 5.18 a 5.8 (m, 2H), 4,61 -. 4,30 (m, 4H), 4,00 (s, 3H), 3,17 (q, J = 6,0 Hz, 16H), 2,74-2,73 (m, 1H), 2,05 (s, 0,3H), 1,30 (t, J = 6,8 Hz, 24H), 1,18 (t, J = 7,6 Hz, 6H).

Ejemplo 9 Síntesis de 3'3'-RR-(2'F-BzA)(2'F-BzA) (27)

N,N'-(((2R,3R,3aR,5R,7aR,9R,10R,10aR,12R,14aR)-3,10-difluoro-5,12-dimercapto-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2,9-diil)bis(9H-purino-9,6-diil))dibenzamida (**27**), también denominado 3'3'-RR-(2'F-BzA)(2'F-BzA) o ditio (Rp,Rp)-cíclico-[2'F-BzA (3',5') p-2'F-BzA(3',5')p] se preparó de acuerdo con el siguiente Esquema 7.

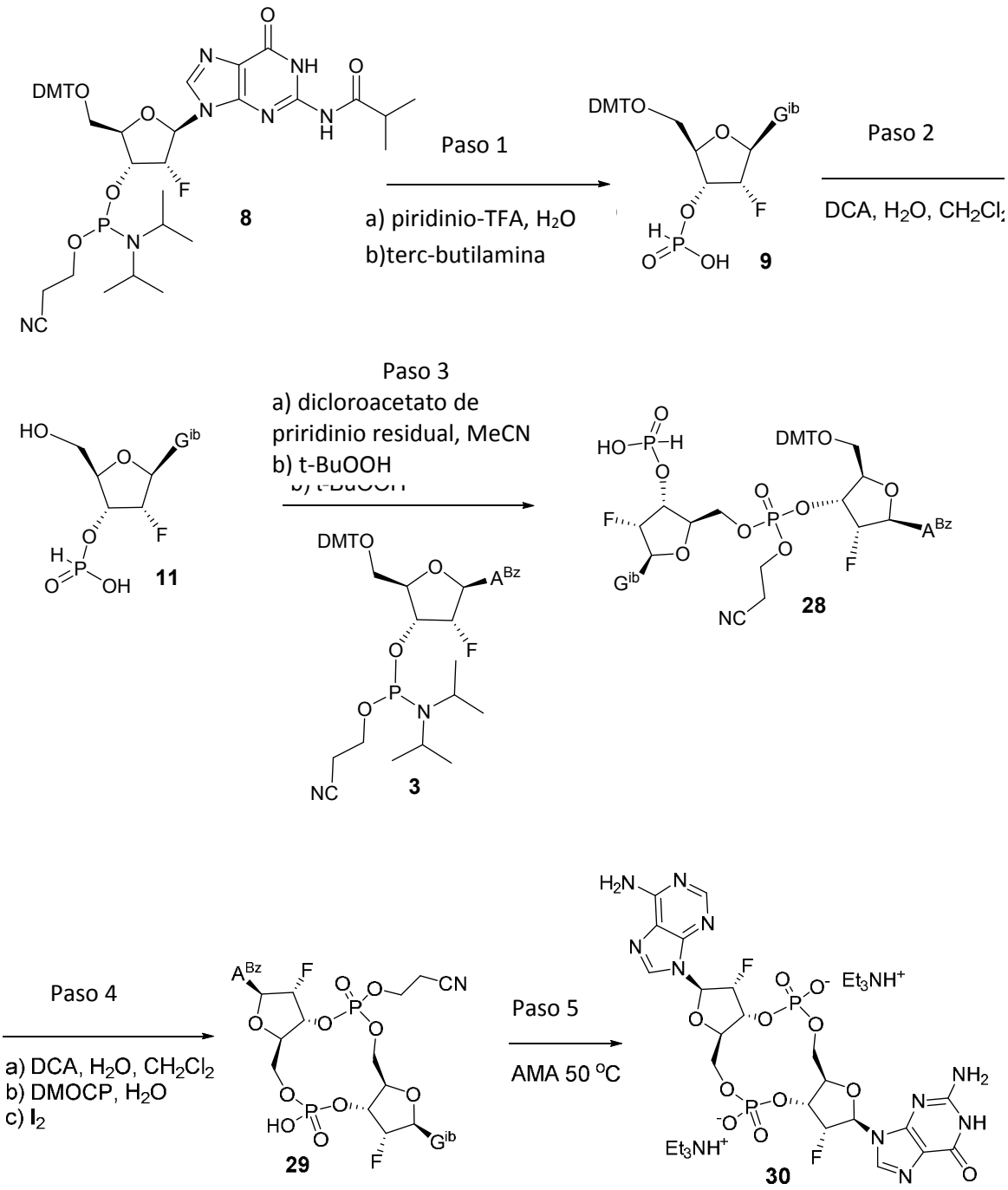


A una solución del compuesto **5** (400 mg, 0.418 mmol, 1 eq, véase por ejemplo el Ejemplo 1 Esquema 1, aislado después del Paso 3) en MeCN (2.5 ml) se añadió terc-butilamina (2.18 ml, 50 eq). La mezcla se tapó y se agitó durante 45 minutos. La mezcla se concentró a vacío para dar 282.1 mg del compuesto **27** bruto. La reacción se purificó usando una HPLC prep-C18 (75 % 10 mM TEAA a 55 % de acetonitrilo / TEAA 10 mM) para dar 4.9 mg del compuesto **27** (> 95 % puro) como la sal de trietilamonio. LCMS-ESI: 903.9 $[M+H]^+$ (Calculado para $C_{34}H_{30}F_2N_{10}O_{10}P_2S_2$: 902.10); R_t: 6,79 min (2-80 % de MeCN / NH_4OAc (20 mM) de amortiguador, 10 min, 1 mL/min, 5 µm de Acclaim 120).^{1}H NMR (400 MHz, 45 °C, MeOD) δ 8,76 (s, 2H), 8,70 (d, J = 12 Hz, 2H), 8,03 (t, J = 10 Hz, 4H), 7,60 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 6,4 Hz, 4H), 6,53 (t, J = 8,8 Hz, 2H), 5,59-5,46 (d, J = 52,4 Hz, 1H), 5.17

hasta 5.11 (m, 1H), 4,51-4,36 (m, 2H), 4,03 (d, J = 9,2 Hz, 2H). ^{19}F NMR (400 MHz, 45 ° C, MeOD) δ 201,54--201,74, ^{31}P NMR (45 °C, MeOD) δ 55.68.

Ejemplo 10: Síntesis de 3'3'-(2'F-G) (2'F-A) (30)

2-amino-9-((2R,3R,3aR,7aR,9R,10R,10aR,14aR)-9-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,10-difluoro-5,12-dihidroxi-5,12-dioxidooctahidro-2H,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona, también denominado 3'3'-(2'F-G)(2'F-A) o [2'F-G(3',5')p-2'F-A(3',5')p]-cíclico se preparó de acuerdo con el siguiente Esquema 8.



Paso 1 Preparación de fosfonato de hidrógeno de (2R,3R,4R,5R)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluoro-5-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-

il)tetrahidrofuran-3-ilo (**9**): A una solución del compuesto **8** (10 g, 10 mmol, ChemGenes, véase el Ejemplo 2) en MeCN (50 ml) y agua (360 µl) se añadió trifluoroacetato de piridinio (2.32 mg). La reacción se agitó durante 1 min seguido de la adición de terc-butilamina (50 ml). La reacción procedió durante 10 min y se concentró a vacío y co-evaporó con acetonitrilo (2 x 100 ml) a vacío para dar una mezcla del compuesto **9** y **10** ~ (4: 1, véase el Ejemplo 1).

Paso 2: Preparación de fosfonato de hidrógeno de (2R,3R,4R,5R)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-5-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)tetrahidrofuran-3-ilo (**11**): A una solución de la mezcla cruda de compuesto **9** y **10** (~ 8.5 g, 5 mmol) y DCM (60 ml) se añadió agua (0.09 ml) seguido de una solución al 6 % de DCA en DCM (60 ml). Después de 10 min, la mezcla de reacción se inactivó con piridina (7.0 ml) y después se concentró a vacío. La mezcla cruda se co-evaporó con 3 x 35 ml de MeCN anhidro dejando 7.0 ml de compuesto **11** bruto.

Paso 3: Preparación de fosfonato de hidrógeno de (2R,3R,4R,5R)-2-((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-il)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-fluorotetrahidrofuran-3-il)oxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)metil)-4-fluoro-5-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)tetrahidrofuran-3-ilo (**28**): Una solución del compuesto **3** se co-evaporó 3 x 35 ml con MeCN anhidro, dejando 20 ml de MeCN

anhidro, y se añadió a la solución en crudo del compuesto **11** y la reacción se agitó durante 2 min. Se añadió t-BuOOH (2.73 ml de una solución 5.5 M en decano) y la reacción procedió durante 30 min. Se añadió una solución acuosa de bisulfito de sodio (1.25 g en 2.5 ml de agua) y la mezcla se agitó durante 5 min. Después se concentró a sequedad a vacío para dar 22 g del compuesto **28**.

Paso 4: Preparación de N-(9-((2R,3R,3aR,7aR,9R,10R,10aR,14aR)-5-(2-cianoetoxi)-3,10-difluoro-12-hidroxi-9-(2-isobutiramido-6-oxo-1,6-dihidro-9R-purin-9-il)-5,12-dioxidooctahidro-2R,7H-difuro[3,2-d:3',2'-j][1,3,7,9]tetraoxa[2,8]difosfaciclododecin-2-il)-9H-purin-6-il)benzamida (**29**): A una solución de compuesto **28** (22 g) en DCM (120 ml) se añadió agua (600 µl) seguido de una solución 6 % de DCA en DCM (120 ml). Después de 10 min, la mezcla de reacción se inactivó con piridina (50 ml) y se concentró a vacío para eliminar el DCM. Se añadió una cantidad adicional de piridina (150 ml) y la mezcla se concentró a vacío hasta 100 ml. Se añadió DMOCP (2.92 g) y la reacción se agitó durante 3 min, seguido de la adición de agua (3.2 ml) y luego yodo (1.65 g). Después de 5 min, la reacción se inactivó con una solución de bisulfito de sodio (1 g de $NaHSO_3$ en 700 ml de agua) y se extrajo con una mezcla 1: 1 de éter etílico y EtOAc (800 ml). La capa acuosa se extrajo adicionalmente con 200 ml

adicionales de DCM. Las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío para dar 7 g de compuesto **29** bruto.

Paso 5: Preparación de 3'3'- (2'F-G) (2'F-A) (**30**): Una solución del compuesto **30** (3.15 g) en AMA (22 ml) y EtOH (9.45mL) se calentó a 50 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se purgó con argón durante 10 min. La purificación por fase inversa C18 MPLC y HPLC preparativa dio 22 mg del compuesto **30**. LCMS-ESI: 677.30 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{20}H_{22}F_2N_{10}O_{11}P_2$: 678,09); R_t: 8,73 min (2-50% MeCN / NH_4OAc (20 mM) de tampón, 20 min, 1 mL/min, 5 µm Acclaim 120). ^1H NMR (400 MHz, 45 °C, D_2O) δ 8,52 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 6,60 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 6,40 (d, J = 18,4 Hz, 1H), 5,75 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 5,62 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 5.18 a 5.10 (m, 2H), 4,66-4,52 (m, 3H), 4.31-4.25 (m, 2H), 3,35 (q, J = 7,2 Hz, 26H), 2,05 (s, 6.45H), 1,43 (t, J = 7,2 Hz, 39H).

Ejemplo 11: Análisis de unión in vitro de mono- o di-F-CDN con la proteína STING purificada

El ADN que codifica los aminoácidos 140 a 379 (numeración de aminoácidos correspondiente a Swiss Prot Q86WV6) se amplificó a partir de plásmidos que contienen la secuencia de longitud completa de los alelos STING humanos a través de la reacción en cadena de la polimerasa con los siguientes cebadores: inicial TACTTCCAATCCAATGCAGCCCCAGCTGAGATCTCTG (SEQ ID NO: 8) y posterior TTATCCACTTCCAATGTTATTATTATCAAGAGAAATCCGTGCGGAG (SEQ

ID NO: 9). Los alelos STING variantes fueron asignados de acuerdo con Yi, et ál, (2013), PLoS One, 8(10), e77846 (DOI: 10.1371/journal.pone.0077846. los productos de PCR fueron clonados en un vector de expresión bacteriano que codifica una etiqueta de afinidad hexa-histidina N-terminal (6xHIS) seguida de una secuencia pequeña modificadora de la solubilidad de tipo ubiquitina (SUMO) (Butt, et ál, (2005) Protein expression and purification 43.1, 1-9) y sitio de escisión de la proteasa del virus etch de tabaco (TEV) utilizando la la clonación independiente de ligadura (Aslanidis, et ál., (1990) Nucleic acids research, 18.20, 6069-6074).

Los plásmidos que codifican los aminoácidos 140-379 6xHIS-SUMO-TEV-STING se transformaron en células de E. coli Rosetta2 (DE3) (EMD Millipore) para la expresión de proteínas. Las células se cultivaron en caldo lysogeny a 37 °C hasta que se alcanzó una absorbancia en 600 nM de 0.6. Las células se transfirieron a continuación a 18 °C y se indujo la expresión de proteína durante la noche mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido al medio a una concentración de 0.25 mM. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 veces la gravedad durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en hielo en un amortiguador que contenía 50 mM clorhidrato de Tris (Tris-HCl) pH 7.5, cloruro de sodio 500 mM (NaCl), imidazol 20 mM, 10 % de glicerol, 1 mM clorhidrato

de tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP) y el comprimido de inhibidor de proteasa (Pierce) (Amortiguador A). Las células se lisaron usando un aparato de ultrasonidos S-450D (Emmerson industrial) en hielo. El lisado celular se centrifugó a 15.000 veces la gravedad durante 30 minutos a 4 °C. El material soluble se aplicó a níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) acoplado a Sefarosa CL-6B (Qiagen) durante 1 hora con balanceo suave a 4 °C. Después de la transferencia a una columna de poli-prep de flujo por gravedad (Bio-Rad), la resina se lavó extensivamente en amortiguador A. La proteína se eluyó de la columna en un amortiguador que contenía Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, imidazol 300 mM, 10 % de glicerol y TCEP 0.5 mM. Para quitar el marcador 6XHIS-SUMO la proteína eluida se mezcló con proteasa TEV (Sigma) en una proporción de 1: 250 (p:p) y se dializó durante la noche contra un amortiguador que contenía 20 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM, imidazol 5 mM, 10 % de glicerol y TCEP 0.5 mM. Las etiquetas de la proteasa TEV y 6xHIS-SUMO se agotaron mediante la adición de resina Ni-NTA (Qiagen) a la muestra, los aminoácidos purificados 140-379 de STING se recogieron mediante extracción de la resina usando una columna de poli-prep. Los AA140-379 de STING se concentraron con una centrífuga concentradora con un corte de peso molecular de 10.000 Dalton (EMD Millipore) a una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml. La proteína

se dividió en alícuotas, se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

La fluorometría de barrido diferencial (DSF) es una técnica que mide la capacidad de los ligandos de unirse a y estabilizar proteínas purificadas (Niesen, et ál, (2007) Nature protocols 2.9, 2212-2221). La proteína se calienta en presencia de un colorante que se une a y emite fluorescencia en entornos hidrófobos. La proteína se desnaturaliza térmicamente por calentamiento, lo que genera un aumento de unión del colorante a la proteína desplegada y de la fluorescencia. El punto medio de la temperatura (T_m) de una desnaturalización de proteínas se establece mediante el cálculo del valor máximo medio de la curva de desnaturalización. El punto medio de temperatura de la proteína en presencia de un ligando está directamente relacionado con la afinidad del ligando con la proteína y, por lo tanto, su capacidad de estabilizar la proteína a temperaturas más altas.

La DSF se realizó en una reacción de 20 µl que comprende 20 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM, dilución 1: 500 de SYPRO Orange (Life Technologies), 1 mg/ml de proteína STING AA140-379 purificada y el ligando a una concentración de 1 mM. Las muestras se colocaron en una placa de envoltura rígida para PCR (Bio-Rad). Se registró la fluorescencia en función de la temperatura en una máquina de PCR CFX 96 en tiempo real (Bio-

Rad) de lectura en el canal de HEX, excitación 450 a 490, 560 a 580 nm de emisión. El gradiente de temperatura fue de 15 a 80 °C, con un aumento gradual de 0.5 °C cada 15 segundos y registrando cada 0.5 °C. Después de la resta de la señal de fondo de una muestra que carece de proteína y ligando. El punto medio de la temperatura (T_m) se calculó mediante el ajuste de las curvas de la fluorescencia en función de la temperatura en una función Boltzmann sigmoidal (Graph Pad Prism). El cambio en la estabilidad térmica de los AA140-379 de STING en presencia del ligando (cambio T_m) se calcula restando la T_m (proteína y ligando) de la T_m (proteína sola).

Los compuestos de CDN [A(3’,5’)p A(3’,5’)p] (CDA, 3’3’-(A)(A))-cíclico, ditio-(Rp,Rp)-[A(3’,5’)p-A(3’,5’)p](3’3’-RR-(A)(A))-cíclico, ditio-(Rp,Rp)-[2’F A(3’,5’)p-2’F-A(3’,5’)p](3’3’-RR-(2’F-A)(2’F-A)-cíclico, [G(3’,5’)p-A(3’,5’)p] (cGAMP, 3’3’-(G)(A))-cíclico, [G(2’,5’)pA(3’,5’)p] (ML cGAMP, 2’3’-(G)(A)) cíclico y ditio (Rp, Rp)[2'F-G (3', 5') p-2'F-A (3', 5') p] (3'3'-RR-(2'F-G) (2'F-A))-cíclico se evaluaron para determinar su capacidad de unirse a las proteínas STING purificadas por DSF.

Las Figs. 2 y 3 muestran que los compuestos CDN sustituidos por flúor 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) mostraron un mayor cambio de T_m con respecto a los compuestos no sustituidos con flúor 3'3'-(A)(A),3'3'-RR-(A)(A), 3'3'-

(G)(A) y el ligando celular endógeno 2'3´-(G)(A). El aumento del cambio de T_m de los compuestos sustituidos con flúor 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) demostró que aumentan la estabilidad térmica de las proteínas hSTING (REF) (Fig. 2) y hSTING (WT) (Fig. 3), lo que indica una interacción de unión reforzada entre hSTING (WT), hSTING (REF) y los compuestos de CDN sustituidos con flúor . La Fig. 2 además demostró que los CDN que contienen enlaces fosfato intra nucleótidos (3',5')p (3',5')p con sustituciones 2',2''-difluoro-ditio-(Rp, Rp) pudieron unirse fuertemente a una variante que se une poco mediante CDN no modificados que contienen enlaces fosfato intra-nucleótidos (3',5')p(3 ', 5')p.

Cada uno de los alelos hSTING, HAQ hSTING y REF hSTING de tipo silvestre también fueron utilizados con cada uno de los compuestos de referencia y los compuestos de la invención como se enumeran en la siguiente Tabla 4. Estos resultados demuestran una mejor unión de 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A), 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-G) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) en relación con cada una de sus referencias OH, es decir, 3'3'-RR-(A)(A), 3'3'-RR-(G)(G), y 3'3'-RR-(G)(A), respectivamente, en los tres hSTING, con el 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A), lo que muestra la mejora de la unión sobre el 2'3'-(G)(A) producido naturalmente. Los compuestos

3'3'-RR-(2'F-BzA) (2'F-BzA), 3'3'-RR-(2'F-iBuG)(2'F-BzA) y 3'3'-RR-(2'F-iBuG)(2'F-A), que tienen un grupo protector en uno o ambos de los grupos base amino, también mostraron una mejora en la unión en relación con 3'3 '-RR-(A)(A) o 3'3'-RR-(G)(A) cuando se mide con el alelo REF. Los derivados mono-F 3'3'-RR-(2'F-G)(A) y 3'3'-RR-(G)(2'F-A) también mostraron una mejor unión con respecto a la referencia OH 3'3'-RR-(G)(A) en los tres hSTING.

Tabla 4: Cambios en la T_m en WT, alelo HAQ y alelo REF hSTING.

Ejemplo / Compuesto	Nombre del compuesto	Cambio de T_m hSTING (°C)		
		WT	HAQ	REF
Referencia	3’3’-(A)(A)	4.5	10.2	2.0
Referencia	3’3’- (2’F-A)(2’F-A)	12.6	20.6	6.4
Referencia	3’3’-RR-(A)(A)	9.6	15.5	5,7
Ejemplo 1 Compuesto 6	3’3’-RR- (2’F-A) (2’F-A)	19.3	32.4	9.1
Ejemplo 1 Compuesto 6a	3’3’-RS-(2’F-A)(2’F-A)	*	*	*

Ejemplo 4 Compuesto 22	3’3’-RR-(A)(2’F-A)	9.4	16.0	5.4
Ejemplo 4 Compuesto 22a	3’3’-RS-(A)(2’ F-A)	6.4	11.4	4.3
Ejemplo 9 Compuesto 27	3’3’-RR-(2’F-BzA) (2’F-BzA)	8.9	10.1	8.7
Ejemplo 1 Compuesto 7	3’3’-RR-(2’βF-A) (2’ βF-A)	3.1	11.2	0,3
Ejemplo 1 Compuesto 7a	3’3’-RS-(2’ βF-A)(2’ βF-A)	0,1	3.1	0
Referencia	3’3’-(G)(G)	6.1	9.97	6.1
Referencia	3’3’-RR-(G)(G)	9.5	15.3	10.3
Ejemplo 3 Compuesto 17	3’3’- RR- (2’F-G)(2’F-G)	12.6	22.6	11.4
Ejemplo 3 Compuesto 17a	3’3’- RS- (2’F-G)(2’F-G)	*	*	*
Referencia	2’3’- (G)(A)	16.1	26.8	7.0

Referencia	3’3’- (G)(A)	2	10.5	2.5
Referencia	3’3’-RR-(G)(A)	11.1	21.0	7.2
Ejemplo 2 Compuesto 14	3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-A)	19.3	34.2	12.5
Ejemplo 2 Compuesto 14a	3’3’-RS-(2’F-G)(2’F-A)	*	*	*
Ejemplo 5 Compuesto 23	3’3’-RR- (2’F-G)(A)	14.7	25.9	9.5
Ejemplo 5 Compuesto 23a	3’3’-SR-(2’F-G)(A)	10.6	16.5	7.8
Ejemplo 6 Compuesto 24	3’3’-RR-(G)(2’F-A)	15.9	28.8	9.7
Ejemplo 6 Compuesto 24a	3’3’-RS-(G)(2’F-A)	9.3	15.3	7.0
Ejemplo 10 Compuesto 30	3’3’- (2’F-G)(2’F-A)	14.3	27.7	7.8
Ejemplo 7 Compuesto 25	3’3’-RR-(2’F-iBuG)(2’F-BzA)	10.6	14.7	8.6
Ejemplo 7 Compuesto 25a	3’3’-RS-(2’F-iBuG)(2’F-BzA)	6.8	8.9	5.4
Ejemplo 8 Compuesto 26	3’3’-RR-(2’F-iBuG)(2’F-A)	13.3	18.4	10.5

* Compuesto no compatible con el ensayo.

Ejemplo 12: activación de moléculas derivadas de 3'3'-di-F-CDN de la señalización de STING humana en células HEK293T

Para evaluar la capacidad de señalización de dos variantes conocidas de STING humanas naturales, hSTING (WT) y hSTING (REF), en respuesta a los compuestos CDN naturales y sustituidos con flúor, se midió la actividad de un IFN-β-reportero en líneas de células 293T de riñón embrionario humano (HEK) que expresan hSTING (WT) o hSTING (REF) de forma estable. La secuencia del alelo hSTING (REF) se ha descrito (*Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). Nature 455, 674-678*) y tiene la secuencia de referencia NCBI NP_938023 (Fig 6). Las secuencias de las variantes de alelos hSTING (WT) y hSTING (REF) fueron también descritas en Yi, et ál, 2013, PLoS One, 8 (10), e77846 (DOI.:*10.1371 / journal.pone.0077846*.

La línea celular HEK293T original no expresa STING endógena funcional, por lo que la capacidad de respuesta de los alelos de STING exógenamente expresados frente a diversos compuestos de CDN puede ser evaluada utilizando líneas celulares HEK293T estables que expresan STING. Estas líneas se generaron con plásmidos retrovirales MSCV2.2 que contienen ADNc de longitud completa de STING con una etiqueta de epítopo HA de extremo c clonado corriente arriba de un IRES en el marco con la proteína verde fluorescente (GFP). Los vectores retrovirales se transfectaron en la línea celular de empaquetamiento

anfotrópica FPhoenix usando Lipofectamine (Invitrogen). Después de dos días se recogieron los sobrenadantes virales y se usaron para la transducción de las células HEK293T.

Las células GFP positivas fueron ordenadas usando un clasificador de células Mo Flo en el Centro de Investigación del Cáncer del Laboratorio de Citometría de Flujo de la Universidad de Berkeley. 10^4 células STING HEK293T se sembraron en placas de 96 pocillos y se transfectaron transitoriamente (usando Lipofectamine 2000) con 50 ng de un plásmido reportero de IFN-β humano (pLuc-IFN-β) que expresan el promotor humano IFN-β corriente arriba de un gen reportero de luciferasa de luciérnaga (Fitzgerald et ál, 2003, Nature Immunology, 4(5): 491-496) y 10 ng de plásmido que expresa un gen reportero de luciferasa de Renilla *reniformis* (Promega) de timidina cinasa (TK) constitutivamente activo para la normalización. 24 horas después, las células se estimularon con moléculas naturales y sintéticas de derivados de CDN utilizando digitonina de permeabalizacion para asegurar la absorción uniforme. Cada línea celular STING se estimuló en 25 ul de amortiguador de digitonina (HEPES 50 mM, KCL 100 mM, MgCl2 3 mM, DTT 0.1 mM, sacarosa 85 mM, 0.2 % de BSA, ATP 1 mM, GTP 0.1 mM, 10 ug/ml de digitonina) con diluciones de 2 veces de 0.1 µM a 100 µM de cada uno de los siguientes compuestos de CDN: [A(3’,5’)p-A(3’,5’)p](CDA, 3’3’-(A)(A))-cíclico, ditio-

(*R*p,*R*p)-[A(3’,5’)p-A(3’,5’)p](3’3’-RR-(A)(A))-cíclico, ditio-(*R*p,*R*p)-[2’F-A(3’,5’)p-2’F-A(3’,5’)p](3’3’-RR-(2’F-A)(2’F-A))-cíclico, [G(3’,5’)p-A(3’,5’)p](3’3’-(G)(A))-cíclico, [G(2’,5’)p-A(3’,5’)p](2’3’-(G)(A))-cíclico y ditio-(*R*p,*R*p)-[2’F-G(3’,5’)p-2’F-A(3’,5’)p] (3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-A))-cíclico.

Después de 20 min, las mezclas de estimulación se retiraron y se añadieron 200 ul de medio DMEM suplementado con 10 % (vol/vol) de suero fetal bovino, 1 % de L-glutamina, y penicilina/estreptomicina 1 %. Las células se incubaron durante6 horas adicionales (37 °C, 5 % CO_2) y, a continuación, se prepararon lisados celulares y se midió la actividad del gen reportero en un luminómetro Spectramax M3 usando el sistema de ensayo Dual-Glo Luciferase (Promega, n° de catálogo E2920) como lo describe el fabricante. La actividad del gen reportero IFNβ de la luciferasa de luciérnaga se normalizó a la actividad del gen de la luciferasa de Renilla TK y se representa como el número de veces de inducción sobre la actividad en las células no estimuladas (media +/- s.e.m.).

Como se muestra en la Fig. 5A (curso de la dosis) y 5B (6.25 µM de CDN), el compuesto CDN sustituido con flúor 3'3'-RR- (2'F -A)(2'F -A) indujo niveles más altos de actividad de reportero IFNß mediante hSTING (WT) que los compuestos no sustituidos con flúor 3'3'-(A)(A) y el compuesto derivado OH de referencia

ditio-(Rp, Rp), 3'3'-RR-(A)(A), a las dosis analizadas. 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) también estimuló niveles más altos de la actividad del reportero IFNß mediante hSTING (WT) en comparación con el ligando celular endógeno 2'3'-(G)(A). El compuesto CDN sustituido con flúor 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F -A) también indujo fuertemente la actividad del reportero IFNß mediante hSTING (WT), a dosis más bajas, 3'3'-RR-(2'F -G)(2'F -A) indujo más fuertemente la actividad del reportero IFNß mediante hSTING (WT) que el compuesto 3'3'-(G)(A). Como se muestra en 6A (curso de la dosis) y 6B (6.25 µM CDN), las células HEK 293T que expresan hSTING (REF) respondieron mal a la estimulación con 3’3’-(A)(A), 3’3’-RR-(A)(A) y 3’3’-(G)(A), todos los cuales contienen enlaces fosfato intra-nucleótidos (3',5')p (3',5')p canónicos. Por el contrario, los compuestos CDN sustituidos con flúor 3'3'-RR- (2'F-A) (2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F -G) (2'F -A) indujeron fuertemente la actividad del reportero de IFNβ, hasta un nivel similar al ligando celular endógeno 2'3'-(G)(A) que tiene un enlace fosfato intra-nucleótido (2',5') p-(3',5')p. Estos resultados indican que los compuestos CDN que contienen enlaces fosfato intra-nucleótidos (3 ', 5') p-(3',5')p canónicos con sustituciones 2',2''-difluoro-ditio-(Rp,Rp) activan potentemente hSTING (REF), un alelo que es típicamente refractario a la

estimulación por CDN que contienen enlaces fosfato intra-nucleótidos (3',5')p(3',5')p canónicos.

Tomados en conjunto, los datos en las Figs. 5A, B y 6A, B demuestran que los CDN sustituidos con flúor, 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A), son capaces de activar fuertemente hSTING (REF) y hSTING (WT) y, por lo tanto, permitir la señalización de STING humano a través de una amplia gama de la población humana que expresan diferentes variantes de STING.

Ejemplo 13: Inducción de interferón de tipo I mediante CDN

La inducción de interferón de tipo I se midió en células mononucleares primarias de sangre humana (hPBMC) para evaluar la potencia de los compuestos mono- o di-F-CDN como se describe en la presente. Se han usado hPBMC de dos donantes únicos: un donante era homocigoto para el alelo de tipo silvestre (WT) de STING ($STING^{WT/WT}$) y el otro donante era homocigoto para el alelo de STING denominado de referencia (REF) ($STING^{REF/REF}$). El genotipo STING de estos donantes se determinó mediante amplificación por PCR y secuenciación: el ADN genómico se aisló de 10^4 hPBMC usando una solución de extracción de ADN Quick Extract (Epicentre) y se utilizó para amplificar las regiones del exón 3, 6, y 7 del gen de STING humano. Los cebadores para la amplificación y secuenciación fueron: hSTING exon3F GCTGAGACAGGAGCTTTGG (SEQ ID NO: 10), hSTING exon3R

AGCCAGAGAGGTTCAAGGA (SEQ ID NO: 11), hSTING exon6F GGCCAATGACCTGGGTCTCA (SEQ ID NO: 12), hSTING exon6R CACCCAGAATAGCATCCAGC (SEQ ID NO: 13), hSTING exon7F TCAGAGTTGGGTATCAGAGGC (SEQ ID NO: 14), hSTING exon7R ATCTGGTGTGCTGGGAAGAGG (SEQ ID NO: 15). Los alelos variantes de STING fueron asignados de acuerdo con Yi, et ál, 2013, PLoS One, 8 (10), e77846 (DOI.: 10.1371/journal.pone.0077846).

Las hPBMC crioconservadas se descongelaron y 10^6 células se dejaron sin tratar o fueron tratadas con compuestos de referencia 3'3'-RR-(A)(A), 3'3'-RR-(G)(G), 2'3'-(G)(A), 3'3'-(G)(A) o 3'3'-RR-(G)(A), o compuestos de mono- o di-F-3'3' RR-(2'F-A) (2'F-A), 3'3'-RR-(2'F-A)(A), 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-G), 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A), 3'3'-RR- (2'F-G) (A), y 3'3'-RR-(G)(2'F-A), en RMPI suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 1 % de L-glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 con concentraciones que van de 100 µM a 0.1 µM de cada CDN. Después de 2 horas (Figs. 7 y 8) o 2 horas y 6 horas (Figs. 9-13) de estimulación, las células se recogieron por centrifugación y se lavaron una vez con solución salina amortiguada con fosfato. El ARN celular se aisló utilizando el kit Aurum Total RNA 96 y el ADNc fue sintetizado utilizando el kit iScript cDNA Synthesis. Se evaluó la expresión del gen diana y de referencia mediante qRT-PCR en tiempo real utilizando los ensayos con sondas PrimePCR y el

ciclador de genes CFX96 (todos los reactivos y equipos de BioRad). La expresión normalizada de IFNß se expresó con relación a las células no tratadas. Los genes diana incluyeron el interferón de tipo I (IFNß), citocinas asociadas a Th1 (IFNγ, IL-12p40) y citocinas inflamatorias dependientes de NF-kB (TNFα, IL-6). Los genes de referencia incluyeron GUSB solo (Figs. 7 y 8) o GUSB y HSP90AB1 (Figs. 9-13).

Las Figs. 7A y 8A (curso de dosis) y 7B y 8B (6.25 µM de CDN) muestran la expresión relativa de IFNß normalizada mediante hPBMC homocigotos para el alelo de STING WT (Fig. 7A, 7B) o para el alelo de STING REF (Fig. 8A, 8B). En cuanto a hPBMC $STING^{WT/WT}$, tanto 3'3'-RR-(A)(A) como 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) indujeron niveles similares de IFNß; sin embargo, ambos derivados indujeron niveles más altos de transcripción de IFNß en comparación con el compuesto 3'3'-(A)(A), que era el agonista de STING WT menos potente en este ejemplo. En todas las dosis, 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) estimuló mayores niveles de transcripción IFNß mediante hPBMC $STING^{WT/WT}$ si se compara con 2'3'-(G)(A) no canónico producido de forma natural por las células de mamíferos. Además, 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) fue el inductor más potente de interferón de tipo I en hPBMC $STING^{WT/WT}$, provocando ~ 10-100 veces mayores niveles de IFNß en comparación con el compuesto cGAMP original en el intervalo de dosis analizado. En cuanto a hPBMC $STING^{REF/REF}$, 3'3'-(A)(A),

3'3'-RR-(A)(A) y 3'3'-(G)(A) no estimularon la producción de niveles de transcripción de IFNß perceptibles en las dosis analizadas. Por el contrario, 2'3'-(G)(A), 3'3'-RR- (2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) estimularon la producción dependiente de la dosis de la transcripción de IFNß mediante hPBMC $STING^{REF/REF}$.

En el rango de dosis analizado en las Figs. 7 y 8, tanto 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) como 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) fueron inductores más potentes de la transcripción de IFNß en hPBMC $STING^{REF/REF}$ que 2'3'-(G)(A). 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) fue un estimulador extremadamente potente del alelo de STING REF, ya que que los niveles de transcripción de IFNß fueron de 12 a 70 veces más altos cuando las células se estimularon con 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) en comparación con las células dosificadas de manera similar con 2'3'-(G)(A). Estos resultados demostraron que los derivados 2',2''-diF-RR de CDA y cGAMP fueron estimuladores más potentes de células humanas homocigotas para STING WT o REF que sus compuestos originales correspondientes o 2'3'-(G)(A) no canónico producido de forma natural. Estos resultados también demostraron que los compuestos que contienen enlaces fosfato intra-nucleótido R(3',5')pR(3',5')p canónicos con modificaciones 2',2''-difluoro-ditio-(Rp,Rp) podrían estimular la producción de IFNß mediante las células humanas homocigotas para el alelo STING

REF que es típicamente refractario a la estimulación por CDN que contienen enlaces canónicos.

Los resultados para mono- o di-F CDN 3'3'-RR-(2'F-G)(A), 3'3'-RR- (G) (2'F-A) y 3'3'-RR- (2'F-G) (2'F-A) con 3'3 '(G) (A) y 3'3'-RR-(G)(A) como referencia; 3'3'-RR-(2'F-A)(A) y 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) con 3'3'-RR-(A)(A) como referencia; y 3'3'-RR (2'F-G)(2'F-G) con 3'3'-RR (G) (G) como referencia, se muestran en la Fig. 9A (IFNß, WT / WT), Fig. 9B (IFNß, REF / REF), Fig. 10 A (TNFa, WT / WT), Fig. 10B (TNFa, REF / REF), la figura 11A (IL-6, WT / WT), la Fig. 11B (IL-6, REF / REF), Fig. 12A (IFNγ, WT / WT), Fig. 12B (IFNγ, REF / REF), Fig.13A (IL-12p40, WT / WT) y la fig. 13B (IL-12p40, REF / REF). En cuanto a las hPBMC $STING^{WT/WT}$, con la excepción de 3'3'-RR-(G)(G), todos los compuestos analizados provocaron respuestas de citocinas dependientes de la dosis potentes. En función de las citocinas, las respuestas en las hPBMC $STING^{WT / WT}$ fueron mayores a las 2 horas (IFNß, TNFα) o 6 horas (IFNγ) de la estimulación. Las respuestas de IL-6 e IL-12p40 fueron similares en las hPBMC $STING^{WT/WT}$ en ambos puntos temporales. En cuanto a las hPBMC $STING^{REF/REF}$, el compuesto producido de forma natural por los mamíferos 2'3'-(G)(A) indujo respuestas sólidas dependientes de la dosis para todas las citocinas que alcanzaron su punto máximo a las 6 horas de la estimulación. En comparación con los compuestos de referencia 3'3'-(G)(A) y 3'3'-RR-(G)(A),

3'3'-RR-(2'F-G)(A), 3'3'-RR-(G)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) indujeron respuestas más sólidas dependientes de la dosis de cada una de las citocinas analizadas. La presencia de sustituciones 2'F tanto en la adenina y la guanina dio las respuestas más sólidas, y una sustitución mono2'F en la base adenina provocó respuestas más potentes que una substitución mono 2'F en la base guanina. En comparación con el compuesto de referencia 3'3'-RR-(A)(A), 3'3'RR-(2'F-A)(2'F-A) di-F sustituido indujo respuestas más sólidas de todas las citocinas analizadas, donde las respuestas de IFNß y TNFα alcanzaron un máximo después de 2 horas de estimulación. Aunque menos robusto que el compuesto di-F, el compuesto mono-F sustituido 3'3'RR-(2'F-A)(A) también fue capaz de provocar respuestas de citocinas a las 6 horas de la estimulación con 100 µM de compuesto. Los compuestos mono- y di-F-CDN muestran generalmente una respuesta robusta de citocinas en hPBMC, en particular, 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2 'F-A), lo que demuestra una respuesta más robusta que su compuesto de referencia OH en $STING^{REF/REF}$, con respuestas similares a, o en algunos casos más robustas que, el 2'3'-(G)(A) producido naturalmente.

Ejemplo 14: Activación del compuesto mono- y di-F-CDN de la señalización de STING humano en células THP1

Para determinar el nivel relativo de interferón de tipo I inducido en células humanas por cada uno de mono- o di-F-CDN como señal de la potencia adyuvante, se activaron 100,000 células THP1-Dual (una línea celular de monocitos humanos que contiene el alelo hSTING HAQ transfectado con un gen reportero de luciferasa secretada inducible por IRF-3 (Invivogen), que expresan la luciferasa secretada bajo el control de un promotor compuesto de cinco elementos de respuesta estimulados por IFN) con 30 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato durante la noche en una placa de 96 pocillos. Las células se lavaron con medio fresco y se incubaron durante 30 min a 37 °C con 5 % de CO_2 con compuestos en pasos de titulación de 3 veces a partir de 2,000 a 0.0338 µM en amortiguador PB (50 mM ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico, 100 mM de KCl, 3 mM $MgCl_2$, 0.1 mM de ditiotreitol, sacarosa 85 mM, ATP 1 mM, GTP 0.1 mM y 0.2 % de albúmina de suero bovino). Después de 30 minutos, las células se lavaron y se añadió medio fresco que contenía RPMI 10 % de FBS, y se incubaron las células a 37 °C con 5 % de CO_2. Los sobrenadantes de cultivo de células de cada muestra se recogieron después de la incubación durante la noche, y se añadieron 10 µl de los sobrenadantes de cultivo celular a 50 µl de reactivo QUANTI-Luc (Invivogen). La activación del interferón de tipo I se determinó midiendo los niveles de luciferasa secretadas en un espectrofotómetro SpectraMax M3

(Molecular Devices). El valor de EC50 se determinó a partir de la curva de dosis-respuesta para las 10 concentraciones de la dilución en serie de los compuestos de referencia y los compuestos de la invención evaluados en este ensayo como se indica en la Tabla 5. Estos resultados demuestran una mejor actividad para los compuestos diF 3’3’-RR-(2’F-A)(2’F-A), 3’3’-RS-(2’F-A)(2’F-A), 3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-G), 3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-A), 3’3’-RS-(2’F-G)(2’F-A) y 3’3’-RR-(2’F-iBuG)(2’F-A) en relación con cada uno de sus compuestos de referencia OH. Los derivados mono-F 3'3'-RR-(2’F-G)(A) y 3'3 '-RR-(G)(2’F-A) también mostraron una mejor actividad con respecto a la referencia OH 3'3'-RR-(G)(A).

Tabla 5: EC50 sin digitonina en células THP1 (alelo HAQ).

Ejemplo / Compuesto	Nombre del compuesto	EC50 (µM)
Referencia	3’3’-RR-(A)(A)	25
Ejemplo 1 Compuesto 6	3’3’-RR-(2’F-A)(2’F-A)	19
Ejemplo 1 Compuesto 6a	3’3’-RS-(2’F-A)(2’F-A)	8
Ejemplo 4 Compuesto 22	3’3’-RR-(A)(2’F-A)	59

Ejemplo 4 Compuesto 22a	3’3’-RS-(A)(2’F-A)	99
Ejemplo 9 Compuesto 27	3’3’-RR-(2’F-BzA)(2’F-BzA)	> 150
Ejemplo 1 Compuesto 7	3’3’-RR-(2’βF-A)(2’βF-A)	284
Ejemplo 1 Compuesto 7a	3’3’-RS-(2’βF-A)(2’βF-A)	> 150
Referencia	3’3’-RR-(G)(G)	75
Ejemplo 3 Compuesto 17	3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-G)	8
Ejemplo 3 Compuesto 17a	3’3’-RS-(2’F-G)(2’F-G)	> 150
Referencia	2’3’-(G)(A)	242
Referencia	3’3’-RR-(G)(A)	28
Ejemplo 2 Compuesto 14	3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-A)	3
Ejemplo 2 Compuesto 14a	3’3’-RS-(2’F-G)(2’F-A)	18
Ejemplo 5 Compuesto 23	3’3’-RR-(2’F-G)(A)	15

Ejemplo 5 Compuesto 23a	3’3’-SR-(2’F-G)(A)	25
Ejemplo 6 Compuesto 24	3’3’-RR-(G)(2’F-A)	13
Ejemplo 6 Compuesto 24a	3’3’-RS-(G)(2’F-A)	89
Ejemplo 10 Compuesto 30	3’3’-(2’F-G)(2’F-A)	10
Ejemplo 7 Compuesto 25	3’3’-RR-(2’F-iBuG)(2’F-BzA)	78
Ejemplo 7 Compuesto 25a	3’3’-RS-(2’F-iBuG)(2’F-BzA)	> 150
Ejemplo 8 Compuesto 26	3’3’-RR-(2’F-iBuG)(2’F-A)	23

Ejemplo 15: Los derivados di-F-CDN inducen inmunidad antitumoral mediada por linfocitos T

Para determinar si las moléculas derivadas provocan inmunidad anti-tumoral, a ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas de edad (8 ratones por grupo) se les implantaron células B16.SIY ($5x10^5$ células en 100 µl de PBS). Los ratones se trataron con el compuesto de referencia 3'3'-RR-(A)(A) y el compuesto di-F 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) (5, 50, 100 µg en un volumen total de 40 µl de HBSS), o vehículo de control HBSS. Los tratamientos

se iniciaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100 mm^3, el día 9 posterior a la implantación del tumor. Los compuestos de CDN fueron administrados por inyección subcutánea en el centro del tumor (IT) usando una aguja de calibre 27. Se extrajo sangre de los ratones el día 16 posterior a la implantación del tumor y las PBMC se aislaron por gradiente de Ficoll (Miltenyi Biotech). $1x10^5$ PBMC se pre-incubaron con anticuerpo monoclonal anti-CD16/32 para bloquear la unión potencial no específica, y se marcaron con pentámero clase PE-MHC I (ProImmune) que consta del péptido murino H-2Kb en complejo con SIYRYYGL (SIY, SEQ ID NO: 16), anti-TCRβ-AF700 (H57-597), anti-CD8-Pacific Blue (53-6.7), antiCD4-Pacífic Orange (RM4-5) (todos, anticuerpos de BioLegend) y el colorante de Viabilidad corregible eFluor 450 (eBioscience). Se analizaron las células teñidas mediante citómetro FACS Versa con el software FACSDiva (BD). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star).

Como se muestra en la Fig. 14A, a diferencia del compuesto de referencia OH 3'3'-RR-(A)(A), todos los ratones tratados con el compuesto 3'3'-RR- (2'F-A)(2'F-A) rechazaron el crecimiento de melanomas B16-SIY establecidos en todas las dosis. Para demostrar que el efecto es mediado por las respuestas inmunitarias adaptativas de los linfocitos T, 7 días posteriores a la inyección IT, las PBMC se evaluaron, para

valorar el porcentaje de linfocitos T $CD8^+$específicos de SIY mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura 14B, las PBMC aisladas de ratones tratados con 5 µg del compuesto de referencia OH 3'3'-RR-(A)(A) o bien el compuesto di-F 3'3'RR-(2'F-A)(2'F-A) provocaron significativamente linfocitos T $CD8^+$ específicos de SIY, en comparación con el grupo de control tratado con HBSS (** $p < 0.01$, prueba t de Student). Estos datos demuestran la capacidad del compuesto derivado di-F 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) para obtener inmunidad antitumoral mediada por linfocitos T, de manera específica del antígeno.

Ejemplo 16: Los derivados di-F de CDN inducen eficacia antitumoral potente en diversos modelos de tumores murinos.

Para evaluar la capacidad de los compuestos fluorados derivados de fomentar la inmunidad anti-tumoral en diversos modelos de tumores murinos, se implantaron células tumorales (en 100 µl de PBS) por vía subcutánea en la región lumbar de ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas de edad. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100 mm^3, aproximadamente en el día 14 después de la implantación del tumor (véase la tabla siguiente para el tipo de tumor, el número de células, y el día de la inyección IT). Los compuestos de CDN se administraron por inyección IT (10 o 100 µg en un volumen total de 40 µl de HBSS), y se repitieron cada tres días para un total de tres inyecciones.

Se dosificaron Los compuestos 3'3'-RR- (2'F-A) (2'F-A) y 3'3'-RR- (2'F-G) (2'F-A) y los ratones de control que sólo recibieron vehículo (40 µl HBSS). Los tumores se midieron dos veces por semana.

Tipo de tumor	**Descripción**	**# Células implantadas**	**días IT CDN**
B16.F10	melanoma B16	$5x10^4$	14, 17, 22
MC38	carcinoma de colon	$1x10^5$	10, 14, 18

Como se muestra en la figura 15A, en el modelo agresivo de melanoma B16.F10, los compuestos 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) indujeron inhibición tumoral significativa en comparación con HBSS, donde la molécula 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) provoca la regresión completa del tumor a la dosis de 100 µg. En el modelo de carcinoma de colon MC38, como se muestra en la Fig. 15B, ambos compuestos provocaron la regresión completa del tumor a todas las dosis analizadas, en comparación con el control de HBSS. Estos datos demuestran los efectos generales anti-tumorales de los derivados fluorados en diversos modelos de tumores.

Ejemplo 17: Inmunogenicidad comparativa de los derivados di-F-CDN

Para determinar si los derivados fluorados podrían provocar respuestas de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ específicos de HIVgag , los ratones BALB/c (n=4) fueron inmunizados por vía subcutánea con 0 µg (sin CDN), 1 µg o 5 µg de CDN formulados en 2 % de escualeno y agua (AddaVax, Invivogen) con 5 µg de la proteína p55 HIVgag. Siete días después de la vacunación, se recogieron los bazos de los ratones y se prepararon los esplenocitos. Se estimularon 2 x 10^5 esplenocitos durante la noche en un ensayo IFNγ ELISPOT con medio solo (no estimulado) o con 1 µM de péptidos $CD4^+$ y $CD8^+$ específicos de HIVgag p55. IFNγ ELISPOT se desarrollaron y se cuantificaron utilizando un lector de placas de CTL y el software ImmunoSpot. 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) y 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) se evaluaron para determinar su capacidad para inducir respuestas inmunitarias específicas de HIVgag.

Como se muestra en Fig.16A, las moléculas tanto 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) como 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) fueron capaces de provocar respuestas significativas de linfocitos T $CD4^+$ contra p55 HIVgag, en comparación con el grupo de control sin CDN AddaVax + proteína (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, prueba t de Student). Como se muestra en la Fig. 16B, el compuesto 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) también provocó una respuesta significativa de linfocitos T $CD8^+$ contra p55 HIVgag, en comparación con el

grupo de control sin CDN (*P <0.05, prueba t de Student). Estos datos demuestran la capacidad de los compuestos fluorados de actuar como potentes adyuvantes en un entorno de vacuna contra un inmunógeno pertinente.

Ejemplo 18: Unión de mono- y di-F-CDN a hSTING WT

La unión de los compuestos mono- y di-F CDN se evaluó mediante resonancia de plasmones superficiales para determinar una constante de unión. Se preparó un constructo de expresión de *E. coli* (STING humano [E149-S379] H232R) que alberga la secuencia proteica:

MSGLNDIFEAQKIEWHEEKGNFNVAHGLAWSYYIGILRLILPELQARIRTYNQHYNNL LRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYEL LENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPES QNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPEL LISGMEKPLPLRTDFSLEHHHHHH (SEQ ID NO: 17)

Se indujo la expresión de STING humano[E149-S379]H232R en *E. coli* a 18 °C y la proteína se purificó posteriormente usando tanto cromatografía de afinidad de níquel como cromatografía de exclusión por tamaño. Las alícuotas se prepararon y almacenaron a -80 °C en 30 mM Tris pH 7.5/NaCl 100 mM/10 % de glicerol.

La proteína de extremo N STING humana(E149-S379)H232R etiquetada con avi- fue inmovilizada (~ 2500 RU) en un chip de estreptavidina a 15 °C en un Biacore T200 (GE Healthcare).

Las titulaciones de dinucleotidos cíclicos (CDN como se indica en la Tabla 6) en Tris 30 mM pH 7.5 / 50 mM de NaCl / 0.005 % de Tween 20/1 mM de DTT/2 % de DMSO, se perfilaron (30 µLs/min, 180 segundos para el contacto de la muestra/120 segundos para la disociación) contra hSTING a 15 °C. El análisis cinético de los datos se realizó utilizando el software de evaluación Biacore T200. El análisis del estado estacionario de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6.0, usando un algoritmo de unión específica del sitio (ecuación es Y = Bmáx*X/(Kd + X)). Kd (unidades de micromolar) se presentan en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6: Kd para mono- y di-F CDN medida por resonancia de plasmones superficiales.

Ejemplo / Compuesto	Nombre del compuesto	Kd (µM)
Referencia	3'3'-(2'F-A)(2'F-A)	0,011
Ejemplo 1 Compuesto 6	3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A)	0,001
Ejemplo 1 Compuesto 6a	3'3'-RS-(2'F-A)(2'F-A)	0,029
Ejemplo 4 Compuesto 22	3'3'-RR-(A)(2'F-A)	1.282

Ejemplo 2 Compuesto 14	3’3’-RR-(2’F-G)(2’F-A)	0,093
Ejemplo 2 Compuesto 14a	3’3’-RS-(2’F-G)(2’F-A)	0,098
Ejemplo 5 Compuesto 23	3’3’-RR-(2’F-G)(A)	0,311
Ejemplo 6 Compuesto 24	3’3’-RR-(G)(2’F-A)	0,037
Ejemplo 6 Compuesto 24a	3’3’-RS-(G)(2’F-A)	0,684

Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención se adapta correctamente para llevar a cabo sus objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos inherentes a esta. Los ejemplos proporcionados en la presente son representativos de las modalidades preferidas, son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Se ha de entender que la invención no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y a las disposiciones de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención permite modalidades adicionales a las descritas y permite llevarse a la práctica de varias maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y

terminología empleada en la presente, así como el resumen, tienen fines de descripción y no debe ser consideradas como limitantes.

De este modo, los expertos en la técnica apreciarán que la concepción sobre la que esta divulgación se basa se puede utilizar fácilmente como base para el diseño de otras estructuras, métodos y sistemas para llevar a cabo los varios propósitos de la presente invención. Es importante, por lo tanto, que las reivindicaciones sean consideradas como que incluyen tales construcciones equivalentes en la medida en que no se aparten del espíritu y alcance de la presente invención. Aunque la invención se ha descrito y ejemplificado con suficiente detalle para que los expertos en esta técnica la lleven a cabo y utilicen, diversas alternativas, modificaciones y mejoras deberían ser evidentes sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Los ejemplos proporcionados en la presente son representativos de las modalidades preferidas, son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Las modificaciones en estay otros usos se les ocurrirán a los expertos en la técnica. Estas modificaciones se incluyen dentro del espíritu de la invención y se definen por el alcance de las reivindicaciones.

Será fácilmente evidente para una persona experta en la técnica que se pueden hacer diversas sustituciones y modificaciones a

la invención descrita en la presente sin apartarse del alcance y espíritu de la invención.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Todas las patentes y publicaciones se incorporan a la presente mediante referencia en la misma medida que si cada publicación individual se indicara específica e individualmente como incorporada mediante referencia.

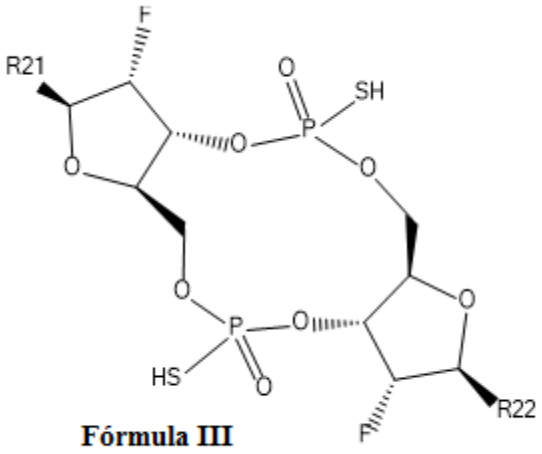
La invención ilustrativamente descrita en la presente puede llevarse a la práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen específicamente en la presente. Así, por ejemplo, en cada caso en la presente memoria, cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede sustituir con cualquiera de las otras dos expresiones. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de que en el uso de tales términos y expresiones se excluya ningún equivalente de las características que se muestran y describen o partes de estas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se debe entender que, aunque la presente invención se ha descrito específicamente

mediante modalidades preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos descritos en la presente , y que tales modificaciones y variaciones se considerarán dentro del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Otras modalidades se exponen en las siguientes reivindicaciones.

Reivindicaciones

1. Un compuesto de Fórmula III:

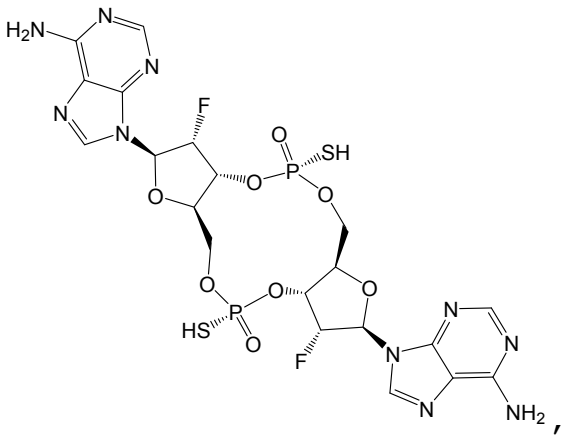
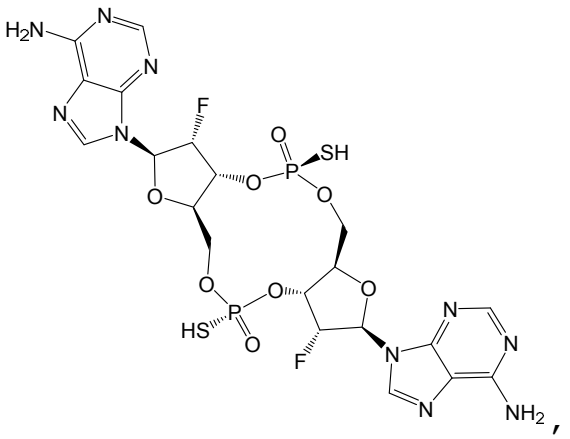
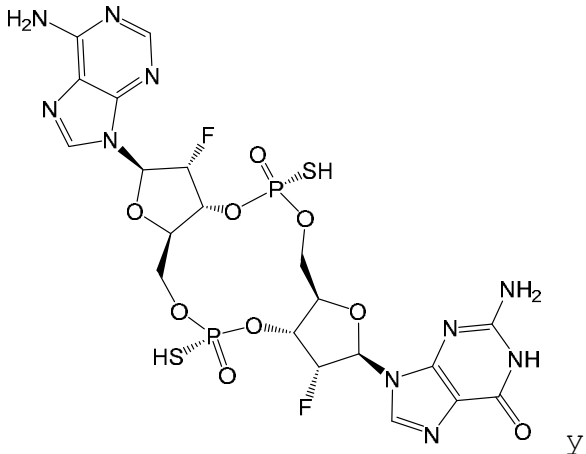
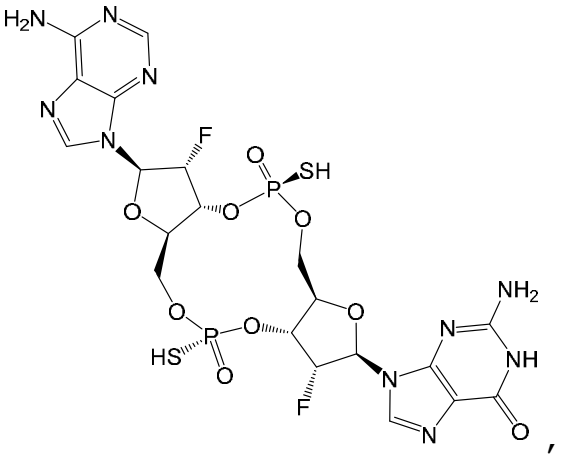


Fórmula III

,

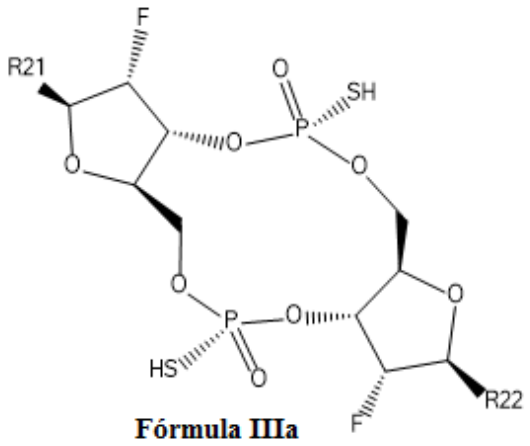
o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, donde R21 y R22 son independientemente una guanina o adenina unida a la estructura a través de la posición N9, con la condición de que R21 y R22 no sean ambos guanina.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:




y


o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente o hidrato aceptable farmacéuticamente de este.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la estructura de Fórmula IIIa:



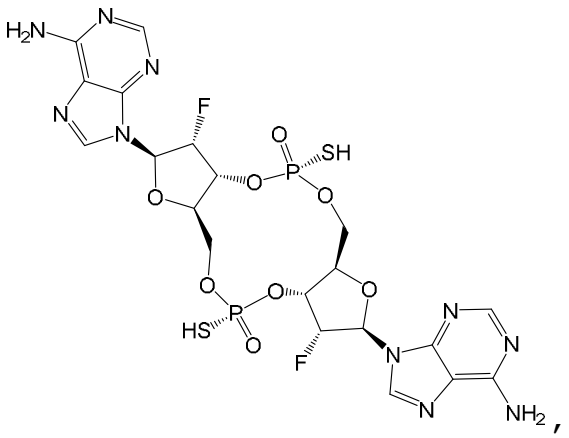
Fórmula IIIa

o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, donde R21 y R22 son como se definen en la reivindicación 1.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde R21 y R22 son ambos adenina.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde R21 es adenina y R22 es guanina.

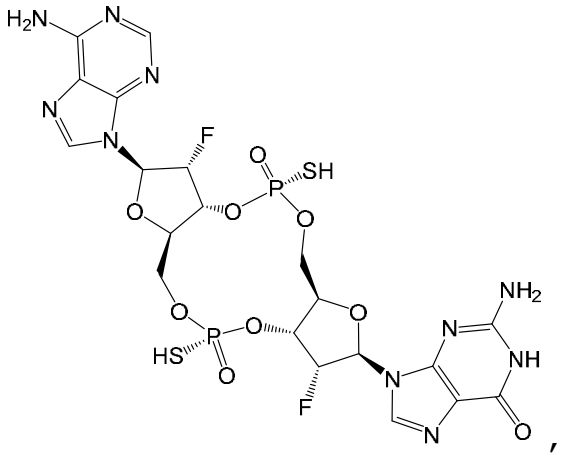
6. Un compuesto 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

7. Un compuesto 3'3'-RR-(2'F-G)(2'F-A) que tiene la estructura:



,

o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

8. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el compuesto es la sal de sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, aluminio, amonio, dietilamina, olamina, benzatina, benetamina, trometamina (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol), morfolina, epolamina, piperidina, picolina, diciclohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, 2-hidroxietilamina, tri-(2-hidroxietil) amina, cloroprocaína, colina, deanol, imidazol,

dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), procaína, dibencilpiperidina, dehidroabietilamina, glucamina, colidina, quinina, quinolona, erbumina, lisina o arginina de este.

9. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el compuesto es la sal de sodio de este.

10. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, otro agente terapéutico y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Un método para tratar a un individuo que padece cáncer, que comprende:

administrar por vía no parenteral o parenteral al individuo una cantidad eficaz del compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o la composición de acuerdo con la reivindicación 10 u 11.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde el método comprende además la administración de una o más terapias contra el cáncer al individuo, donde una o más terapias contra el cáncer adicionales se seleccionan del grupo que consiste en

terapia de radiación, cirugía, quimioterapia o una inmunoterapia.

14. Un método de tratamiento de una enfermedad en un individuo, que comprende: administrar al individuo que lo necesita i) una cantidad eficaz del compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o la composición de acuerdo con la reivindicación 10 u 11; y ii) una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos terapéuticos que inducen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, rechazo agudo de trasplante de órganos, diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoida, psoriasis, enfermedad de Crohn, restenosis y asma alérgica.

15. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento de un cáncer.

16. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, rechazo agudo de trasplante de órganos, diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, reestenosis y asma alérgica.

RESUMEN

La presente invención proporciona estimuladores inmunitarios di-nucleótidos-cíclicos- (CDN) de gran actividad que activan DC a través de un receptor citoplasmático descubierto recientemente conocido como STING (Estimulador de genes de interferón). En particular, los CDN de la presente invención se proporcionan en forma de una composición que comprende uno o más dinucleótidos cíclicos de purina que inducen la producción de interferón de tipo I dependiente de STING humano, donde los dinuclotidas cíclicos de purina presentes en la composición son CDN bis-3',5' 2'-fluoro sustituidos, y más preferiblemente uno o más CDN bis-3’,5’ 2’,2’’-diF-Rp,Rp.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WHITTAKER, Michael, A.
Acuity Law Group, P.C.
12707 High Bluff Drive, Suite 200
San Diego, CA 92130
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
15 August 2017 (15.08.2017)

Applicant's or agent's file reference
ANZ-1004-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2016/021597

International filing date *(day/month/year)*
09 March 2016 (09.03.2016)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
LEONG, Justin
2175 Decoto Rd., Apt 134
Union City, CA 94587
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
LEONG, Justin
35128 Garcia St.
Union City, CA 94587
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Authorized officer
Cruz Juan
e-mail pct.team1@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: Michael A. Whittaker
Acuity Law Group, P.C.
12707 High Bluff Drive, Suite 200
San Diego, CA 92130
United States of America

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	10 JUN 2016
Applicant's or agent's file reference ANZ-1004-PCT	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US16/21597	09 March 2016 (09.03.2016)	10 March 2015 (10.03.2015)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - A61K 39/12, 39/39; C07H 21/02 (2016.01)
CPC - A61K 39/12, 39/39; C07H 21/02

Applicant ADURO BIOTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/	Date of completion of this opinion	Authorized officer
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	12 May 2016 (12.05.2016)	Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US16/21597

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a)).

3. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US16/21597

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 10-16

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☒ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. 10-16 are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 10-16

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing in the form of an Annex C/ST.25 text file, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.

☐ furnish a sequence listing on paper or in the form of an image file complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13*ter*.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US16/21597

Box No. V **Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7, 8/1-7, 9/1-7	YES
	Claims	NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims	NONE	YES
	Claims	1-7, 8/1-7, 9/1-7	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7, 8/1-7, 9/1-7	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-7, 8/1-7 and 9/1-7 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2008/0286296 A1 to Ebensen, et al. (hereinafter 'Ebensen') in view of US 2014/0205653 A1 to (Aduro Biotech, Inc.) (hereinafter 'Aduro').

Regarding Claim 1, Ebensen discloses a compound of Formula III: as shown (formula I (formula III) wherein Y and Y' are O and each A, each X and each Z is O; paragraph [0037]-[0041]), or a pharmaceutically acceptable salt, pharmaceutically acceptable solvate or pharmaceutically acceptable hydrate thereof (or salts or solvates thereof; paragraph [0048]), wherein R21 and R22 are independently a guanine or adenine bound to the structure via the N9 position, provided that R21 and R22 are not both guanine (formula I wherein one purine reside is guanine (R21) and one purine residue is adenine (R22); paragraphs [0037]-[0041], [0050]), but Ebensen does not disclose wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups. However, Aduro discloses wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings (cyclic dinucleotides include substitution of fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings; paragraphs [0070], [0083]) and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups (dinucleotide wherein X1 and X2 are each sulfur; figure 1). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the compound, as previously disclosed by Ebensen, in order to have provided wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups, as previously disclosed by Aduro, for providing dinucleotides for use in the treatment of cancerous conditions diseases (Ebensen; abstract; Aduro; paragraph [0017]).

Regarding Claim 2, Ebensen and Aduro, in combination, disclose the compound according to claim 1, and Ebensen further discloses wherein the compound is selected from the group consisting of: any of the recited compounds (formula I (first recited compound) wherein Y and Y' are O, each A is O, each X is O, each Z is O and both purine residues are adenine; paragraphs [0037]-[0041], [0050]), or a pharmaceutically acceptable salt, pharmaceutically acceptable solvate or pharmaceutically acceptable hydrate thereof (or salts or solvates thereof; paragraph [0048]), but Ebensen does not disclose wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups. However, Aduro discloses wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings (cyclic dinucleotides include substitution of fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings; paragraphs [0070], [0083]) and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups (dinucleotide wherein X1 and X2 are each sulfur; figure 1). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the compound, as previously disclosed by Ebensen, in order to have provided wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups, as previously disclosed by Aduro, for providing dinucleotides for use in the treatment of cancerous conditions diseases (Ebensen; abstract; Aduro; paragraph [0017]).

Regarding Claim 3, Ebensen and Aduro, in combination, disclose the compound according to claim 1, and Ebensen further discloses wherein the compound has the structure of Formula IIIa: as shown (formula I (formula IIIa) wherein Y and Y' are O and each A, each X and each Z is O; paragraph [0037]-[0041]), or a pharmaceutically acceptable salt pharmaceutically acceptable solvate or pharmaceutically acceptable hydrate thereof (or salts or solvates thereof; paragraph [0048]), wherein R21 and R22 are as defined in claim 1 (formula I wherein one purine reside is guanine (R21) and one purine residue is adenine (R22); paragraphs [0037]-[0041], [0050]), but Ebensen does not disclose wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups. However, Aduro discloses wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings (cyclic dinucleotides include substitution of fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings; paragraphs [0070], [0083]) and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups (dinucleotide wherein X1 and X2 are each sulfur; figure 1). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the compound, as previously disclosed by Ebensen, in order to have provided wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups, as previously disclosed by Aduro, for providing dinucleotides for use in the treatment of cancerous conditions diseases (Ebensen; abstract; Aduro; paragraph [0017]).

Regarding Claim 4, Ebensen and Aduro, in combination, disclose the compound according to claim 3, and Ebensen further discloses wherein R21 and R22 are both adenine (formula I wherein both purine resides are adenine (R21 and R22); paragraphs [0037]-[0041], [0050]).

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US16/21597

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**
Continuation of:

-***-Continued from Box V: Citations and Explanations-***-

Regarding Claim 5, Ebensen and Aduro, in combination, disclose the compound according to claim 3, and Ebensen further discloses wherein R21 is adenine and R22 is guanine (formula I wherein one purine reside is guanine (R21) and one purine residue is adenine (R22); paragraphs [0037]-[0041], [0050]).

Regarding Claim 6, Ebensen discloses a compound analogous to 3'3'-RR-(2'F-A)(2'F-A) having the structure: as shown (formula I wherein Y and Y' are O, each A is O, each X is O, each Z is O and both purine residues are adenine; paragraphs [0037]-[0041], [0050]), or a prodrug, pharmaceutically acceptable salt, pharmaceutically acceptable solvate or pharmaceutically acceptable hydrate thereof (or salts or solvates thereof; paragraph [0048]), but Ebensen does not disclose wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups. However, Aduro discloses wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings (cyclic dinucleotides include substitution of fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings; paragraphs [0070], [0083]) and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups (dinucleotide wherein X1 and X2 are each sulfur; figure 1). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the compound, as previously disclosed by Ebensen, in order to have provided wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups, as previously disclosed by Aduro, for providing dinucleotides for use in the treatment of cancerous conditions diseases (Ebensen; abstract; Aduro; paragraph [0017]).

Regarding Claim 7, Ebensen discloses a compound analogous to 3'3' -RR-(2'F-G)(2'F-A) having the structure: as shown (formula I wherein Y and Y' are O, each A is O, each X is O, each Z is O, one purine residue is adenine and one purine residue is guanine; paragraphs [0037]-[0041], [0050]), or a prodrug, pharmaceutically acceptable salt, pharmaceutically acceptable solvate or pharmaceutically acceptable hydrate thereof (or salts or solvates thereof; paragraph [0048]), but Ebensen does not disclose wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups. However, Aduro discloses wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings (cyclic dinucleotides include substitution of fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings; paragraphs [0070], [0083]) and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups (dinucleotide wherein X1 and X2 are each sulfur; figure 1). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the compound, as previously disclosed by Ebensen, in order to have provided wherein said compound comprises fluorine atoms at the 2' positions of the ribose rings and wherein the hydroxide groups are replaced with thiol groups, as previously disclosed by Aduro, for providing dinucleotides for use in the treatment of cancerous conditions diseases (Ebensen; abstract; Aduro; paragraph [0017]).

Regarding Claims 8/1-7, Ebensen and Aduro, in combination, disclose the compound according to any one of claims 1-7, and Ebensen further discloses wherein the compound is the sodium salt thereof (compound is in the form of a sodium salt; paragraph [0101]).

Regarding Claims 9/1-7, Ebensen and Aduro, in combination, disclose the compound according to any one of claims 1-7, and Ebensen further discloses wherein the compound is the sodium salt thereof (compound is in the form of a sodium salt; paragraph [0101]).

Claims 1-7, 8/1-7 and 9/1-7 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WHITTAKER, Michael, A.
Acuity Law Group, P.C.
12707 High Bluff Drive, Suite 200
San Diego, CA 92130
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
15 August 2017 (15.08.2017)

Applicant's or agent's file reference
ANZ-1004-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2016/021597

International filing date *(day/month/year)*
09 March 2016 (09.03.2016)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
GLICKMAN, Laura Hix
36 Rydal Ct.
Oaklandc, CA 94611
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
GLICKMAN, Laura Hix
36 Rydal Ct.
Oakland, CA 94611
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Authorized officer
Cruz Juan
e-mail pct.team1@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WHITTAKER, Michael, A.
Acuity Law Group, P.C.
12707 High Bluff Drive, Suite 200
San Diego, CA 92130
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
15 August 2017 (15.08.2017)

Applicant's or agent's file reference
ANZ-1004-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2016/021597

International filing date *(day/month/year)*
09 March 2016 (09.03.2016)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
ADURO BIOTECH, INC.
626 Bancroft Way, 3c
Berkeley, CA 94710-2224
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
ADURO BIOTECH, INC.
740 Heinz Avenue
Berkeley, California 94710
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address: docketing@acuitylg.com
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Authorized officer
Cruz Juan
e-mail pct.team1@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ADURO BIOTECH, INC.
KATIBAH, George Edwin
KANNE, David
SUNG, Leonard
GAUTHIER, Kelsey
GLICKMAN, Laura Hix
LEONG, Justin
MCWHIRTER, Sarah M.
DUBENSKY, Jr., Thomas W.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA ACTIVAR LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DEL "ESTIMULADOR DEL GEN DE INTERFERON"

<130> ANZ-1004-PCT

<150> US 62/131,235
<151> 2015-03-10

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser

```
65                  70                  75                  80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
                85                  90                  95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
            100                 105                 110

Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
        115                 120                 125

Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
    130                 135                 140

Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160

Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
                165                 170                 175

Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
            180                 185                 190

Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
        195                 200                 205

Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
    210                 215                 220

Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240

Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
                245                 250                 255

Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
```

260 265 270

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
325 330 335

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
340 345 350

Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
355 360 365

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
370 375

<210> 2
<211> 440
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácido de cadena pesada de nivolumab

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

```
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            100                 105                 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
        115                 120                 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
    130                 135                 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
                165                 170                 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
            180                 185                 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
        195                 200                 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
    210                 215                 220
```

```
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225                 230                 235                 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
                245                 250                 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
            260                 265                 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
        275                 280                 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
    290                 295                 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305                 310                 315                 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
                325                 330                 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
            340                 345                 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
        355                 360                 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
    370                 375                 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385                 390                 395                 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
                405                 410                 415
```

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácido de cadena liviana de nivolumab

<400> 3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencias de aminoácido de cadena pesada de pembrolizumab

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

```
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
    210                 215                 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240
```

```
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            340                 345                 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        355                 360                 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430
```

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 5
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencias de aminoácido de cadena liviana de pembrolizumab

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácido de cadena pesada

<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácido de cadena liviana

<400> 7

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: cebador directo

<400> 8
tacttccaat ccaatgcagc cccagctgag atctctg 37

<210> 9
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: cebador inverso

<400> 9
ttatccactt ccaatgttat tattatcaag agaaatccgt gcggag 46

<210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: hSTING exon3F

<400> 10
gctgagacag gagctttgg 19

<210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: hSTING exon3R

<400> 11
agccagagag gttcaagga 19

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: hSTING exon6F

<400> 12
ggccaatgac ctgggtctca 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: hSTING exon6R

<400> 13
cacccagaat agcatccagc 20

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: hSTING exon7F

<400> 14
tcagagttgg gtatcagagg c 21

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: hSTING exon7R

<400> 15
atctggtgtg ctgggaagag g 21

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 16

Ser Ile Tyr Arg Tyr Tyr Gly Leu
1 5

<210> 17
<211> 256
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: constructo de expresión de E.coli

<400> 17

Met Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
1 5 10 15

Glu Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln Ala Arg Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly Ala Val Ser
50 55 60

Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp Asn

```
65                  70                  75                  80

Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys Leu Pro Gln
                85                  90                  95

Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr Ser Asn Ser
            100                 105                 110

Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr Cys Val Leu
        115                 120                 125

Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln Tyr Ser
    130                 135                 140

Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys Leu Phe
145                 150                 155                 160

Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu Ser Gln Asn
                165                 170                 175

Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp Ser Ser Phe
            180                 185                 190

Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu Glu Lys Glu
        195                 200                 205

Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro Ser Thr Ser
    210                 215                 220

Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Lys Pro
225                 230                 235                 240

Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser Leu Glu His His His His His His
                245                 250                 255
```

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference ANZ-1004-PCT	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US16/21597	International filing date *(day/month/year)* 09 March 2016 (09.03.2016)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 10 March 2015 (10.03.2015)
Applicant ADURO BIOTECH, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.

   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.

   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

   ☐ as suggested by the applicant.

   ☒ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

   ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

   b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/21597

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/21597

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 10-16
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/21597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/12, 39/39; C07H 21/02 (2016.01)
CPC - A61K 39/12, 39/39; C07H 21/02
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8): A61K 39/12, 39/39; C07H 21/02 (2016.01)
CPC: A61K 39/12, 39/39; C07H 21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, Other Countries (INPADOC), RU, AT, CH, TH, BR, PH); EBSCO; Google/Google Scholar, IP.com: cyclic, purine, dinucleotide, adenine, guanine, STING, CDN, cytoplasmic, interferon

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2008/0286296 A1 (EBENSEN, T et al.) 20 November 2008; paragraphs [0037]-[0041], [0048], [0050], [0101]	1-7, 8/1-7, 9/1-7
Y	US 2014/0205653 A1 (ADURO BIOTECH, INC.) 24 July 2014; figure 1; paragraphs [0070], [0083]	1-7, 8/1-7, 9/1-7
A	US 7,592,326 B2 (KARAOLIS, DKR) 22 September 2009; entire document	1-7, 8/1-7, 9/1-7
A	US 7,709,458 B2 (KARAOLIS, DKR et al.) 04 May 2010; entire document	1-7, 8/1-7, 9/1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 May 2016 (12.05.2016)	10 JUN 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
15 September 2016 (15.09.2016)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2016/145102 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/12 (2006.01) *C07H 21/02* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2016/021597

(22) International Filing Date:
9 March 2016 (09.03.2016)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
62/131,235 10 March 2015 (10.03.2015) US

(71) Applicant: **ADURO BIOTECH, INC.** [US/US]; 626 Bancroft Way, 3c, Berkeley, CA 94710-2224 (US).

(72) Inventors: **KATIBAH, George Edwin**; 34812 Candice Court, Fremont, CA 94555 (US). **KANNE, David**; 5 Flying Cloud Course, Corte Madera, CA 94925 (US). **SUNG, Leonard**; 25 Rolling Hills Avenue, San Mateo, CA 94403 (US). **GAUTHIER, Kelsey**; 1531 Lafayette St #2, Alameda, CA 94501 (US). **GLICKMAN, Laura Hix**; 36 Rydal Ct., Oaklandc, CA 94611 (US). **LEONG, Justin**; 2175 Decoto Rd., Apt 134, Union City, CA 94587 (US). **MCWHIRTER, Sarah, M.**; 1010 Peralta Ave., Albany, CA 94706 (US). **DUBENSKY, Jr., Thomas, W.**; 25 Tanglewood Road, Berkeley, CA 94705 (US).

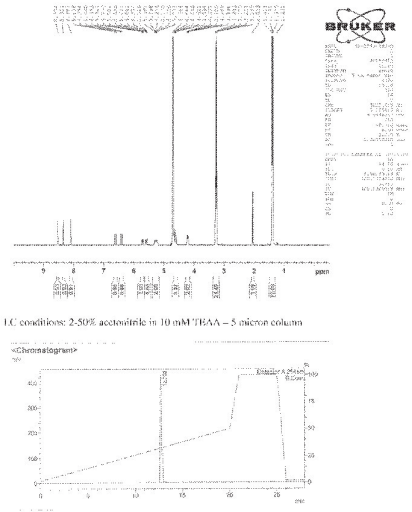
(74) Agent: **WHITTAKER, Michael, A.**; Acuity Law Group, P.C., 12707 High Bluff Drive, Suite 200, San Diego, CA 92130 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ACTIVATING "STIMULATOR OF INTERFERON GENE" -DEPENDENT SIGNALLING

FIG. 1



(57) Abstract: The present invention provides highly active cyclic-di-nucleotide (CDN) immune stimulators that activate DCs via a recently discovered cytoplasmic receptor known as STING (Stimulator of Interferon Genes), In particular, the CDNs of the present invention are provided in the form of a composition comprising one or more cyclic purine dinucleotides induce human STING-dependent type I interferon production, wherein the cyclic purine dinuclotides present in the composition are 2'-fluoro substituted, bis-3',5'CDNs, and most preferably one or more 2',2"-diF-Rp,Rp, bis-3',5'CDNs.

WO 2016/145102 A1

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*