

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 492**

51 Int. Cl.:
C07D 487/04 (2006.01)
C07H 7/06 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07759315 .0**
96 Fecha de presentación: **23.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2010537**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **COMPUESTOS DE IMIDAZOQUINOXALINA COMO INMUNOMODULADORES.**

30 Prioridad:
23.03.2006 US 785545 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.03.2012

73 Titular/es:
**NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**SUTTON, James;
XU, Feng;
VALIANTE, Nicholas y
LAN, Jiong**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 376 492 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de imidazoquinoxalina como inmunomoduladores.

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

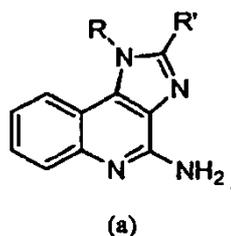
5 La presente solicitud reivindica el beneficio bajo el 35 del CPE §119(e) de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/785.545 presentada el 23 de marzo de 2006.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a potenciadores inmunitarios de moléculas pequeñas (SMIP) que son compuestos de imidazoquinoxalina novedosos y análogos de los mismos que pueden estimular o modular una respuesta inmunitaria en un sujeto. La invención también se refiere a combinaciones novedosas de antígenos con los potenciadores inmunitarios que pueden usarse en terapias con vacunas. En algunas realizaciones, los compuestos pueden usarse como agentes inmunoterapéuticos para enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, alergias y/o asma.

Antecedentes de la invención

15 Las patentes de EE.UU. concedidas nº 4.689.338, 5.389.640, 5.268.376, 4.929.624, 5.266.575, 5.352.784, 5.494.916, 5.482.936, 5.346.905, 5.395.937, 5.238.944, 5.525.612 y 6.110.929 y el documento WO 99/29693 desvelan compuestos de imidazoquinolina de la estructura general (a) para su uso como "modificadores de la respuesta inmunitaria":



20 La patente de EE.UU. nº 6.083.505 describe imidazoquinolinas específicas para su uso como adyuvantes. El documento WO 03/097641 desvela el uso de ciertas imidazoquinolinas y sales de las mismas para el tratamiento de ciertas enfermedades dependientes de proteínas cinasas y para la preparación de preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades.

Eur. J. Med. Chem., 1998, 33, pág. 943-955 desvela imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-aminas. Se dice que estos compuestos actúan de antagonistas de los receptores de la A₁-adenosina no xantina.

25 Bioorg. Med. Chem., 2004, 12, pág. 1129-1139 y Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 2006 19(3), 525-538, que se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud, desvelan ambos imidazo[1,2-a]quinoxalinas que se dice que actúan de inhibidores de PDE4.

30 El documento WO 97/19079 desvela imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-aminas que se dice que actúan de antagonistas de adenosinas. Las composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos también se desvelan y se dice que son útiles en el tratamiento de trastornos psiquiátricos y neurológicos del sistema nervioso central.

El documento US 2003/022898 desvela procedimientos para prevenir y tratar enfermedades inflamatorias e inmunorrelacionadas o trastornos usando inhibidores de la cinasa IκB (IKK). Se dice que los inhibidores de IKK son compuestos de 4(2'-aminoetil)amino-1,8-dimetilimidazo[1,2-a]quinoxalina.

35 El documento WO 99/09845 desvela compuestos de imidazoquinoxalina. Se dice que estos compuestos son útiles en el tratamiento de trastornos asociados a proteínas tirosinas cinasas tales como trastornos inmunológicos.

La respuesta inmunitaria a ciertos antígenos puede potenciarse por el uso de potenciadores inmunitarios, conocidos como adyuvantes de vacunas. Tales adyuvantes potencian la respuesta inmunitaria a antígenos específicos y, por tanto, son objeto de considerable interés y estudio dentro de la comunidad médica.

40 La investigación ha producido el desarrollo de vacunas que poseen epítopes antigénicos que previamente fueron imposibles de producir. Por ejemplo, candidatos a vacunas actualmente disponibles incluyen péptidos sintéticos que imitan numerosos antígenos bacterianos y víricos. La respuesta inmunitaria a estos antígenos purificados puede potenciarse por la coadministración de un adyuvante. Desafortunadamente, los adyuvantes de vacunas convencionales poseen varios inconvenientes que limitan su uso global y eficacia. Además, muchos de los adyuvantes actualmente disponibles tienen utilidad limitada debido a que incluyen componentes que no son metabolizados por los seres humanos. Adicionalmente, la mayoría de los adyuvantes son difíciles de preparar y

45

pueden requerir procedimientos que requieren mucho tiempo y, en algunos casos, el uso de equipo elaborado y caro para formular un sistema de vacuna y adyuvante.

5 Los adyuvantes inmunológicos se describen en "Current Status of Immunological Adjuvants", Ann. Rev. Immunol., 1986, 4, pág. 369-388, y "Recent Advances in Vaccine Adjuvants and Delivery Systems" por Derek T O'Hagan y Nicholas M. Valiante. Véanse también las patentes de EE.UU. nº 4.806.352; 5.026.543; y 5.026.546 para divulgaciones de diversos adyuvantes de vacunas que aparecen en la literatura de patente.

10 Se han hecho esfuerzos para identificar nuevos moduladores inmunitarios para su uso como adyuvantes para vacunas e inmunoterapias que vencerían los inconvenientes y las deficiencias de los moduladores inmunitarios convencionales. En particular sería altamente deseable una formulación de adyuvante que provocara potentes respuestas inmunitarias mediadas por células y humorales a un amplio intervalo de antígenos en seres humanos y animales domésticos, pero que careciera de los efectos secundarios de los adyuvantes convencionales y otros moduladores inmunitarios. Esta necesidad podría satisfacerse por potenciadores inmunitarios de moléculas pequeñas (SMIP) debido a que la plataforma de moléculas pequeñas proporciona diversos compuestos para la manipulación selectiva de la respuesta inmunitaria necesarios para aumentar el índice terapéutico de moduladores
15 inmunitarios.

20 Se necesitan agentes de una única acción novedosos con capacidades variadas para alterar los niveles y/o perfiles de producción de citocinas en células inmunitarias humanas. Los compuestos con discrepancias estructurales provocarán frecuentemente una respuesta deseada mediante un mecanismo de acción diferente, o con mayor especificidad por una diana, tal como una célula dendrítica, modulando la potencia y reduciendo los efectos secundarios cuando se administran a un paciente.

El efecto inmunosupresor de las sustancias citostáticas ha hecho que sean útiles en la terapia de enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, psoriasis y ciertas enfermedades reumáticas. Desafortunadamente, su efecto beneficioso tiene que sopesarse con graves efectos secundarios que necesitan dosificaciones que son demasiado bajas. Además, puede requerirse la interrupción del tratamiento.

25 Se necesitan agentes y/o combinaciones de sustancias activas que produzcan efectos citostáticos o citotóxicos significativamente mejorados en comparación con citostáticos convencionales, por ejemplo, vincristina, metotrexato, cisplatino, etc. Con tales agentes y combinaciones pueden ofrecerse quimioterapias que combinan eficiencia creciente con una gran reducción de efectos secundarios y dosis terapéuticas. Por tanto, tales agentes y terapias de combinación pueden aumentar la eficiencia terapéutica de fármacos citostáticos conocidos. En algunas
30 realizaciones, los compuestos de la invención se usan en combinación con compuestos que proporcionan efecto citostático o citotóxico significativamente mejorado en comparación con agentes citostáticos convencionales cuando se administran solos. Adicionalmente, las líneas celulares que son insensibles a tratamiento quimioterapéutico convencional también pueden ser susceptibles a quimioterapia usando combinaciones de sustancias activas.

35 Se necesitan procedimientos mejorados para preparar agentes terapéuticos que sirvan para aumentar las defensas naturales del huésped contra infecciones víricas y bacterianas, o contra la inducción y progresión de tumores, con citotoxicidad reducida. La presente invención proporciona tales procedimientos, y además proporciona otras ventajas relacionadas. La presente invención proporciona un procedimiento de preparación de agentes terapéuticos y profilácticos para el tratamiento de estados de enfermedad caracterizados por otras deficiencias inmunitarias, anomalías o infecciones que incluyen enfermedades autoinmunitarias e infecciones bacterianas y víricas sensibles a
40 compuestos con la capacidad para modular citocinas y/o TNF- α .

Breve resumen de la invención

45 La presente invención proporciona potenciadores inmunitarios novedosos, composiciones inmunogénicas, compuestos novedosos y composiciones farmacéuticas, y procedimientos novedosos de administrar una vacuna administrando potenciadores inmunitarios de moléculas pequeñas solos o en combinación con antígenos y/u otros agentes. La invención proporciona además compuestos novedosos y composiciones farmacéuticas para su uso en procedimientos para el tratamiento de cáncer, lesiones precancerosas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas, alergias y asma. La invención proporciona además el uso de los compuestos de la invención en la preparación de medicamentos para su uso en procedimientos para el tratamiento de cáncer, lesión precancerosa, enfermedades autoinmunitarias, alergias y asma.

50 Los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos usados en los procedimientos y composiciones de la invención son baratos de producir y fáciles de administrar. Tienen posibilidades de especificidad más precisa en comparación con inmunoestimulantes existentes, proporcionando así perfiles de eficacia y seguridad mejorados.

55 Como adyuvantes, los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos pueden combinarse con numerosos antígenos y sistemas de administración para formar una composición inmunogénica. En una realización preferida, la composición inmunogénica puede usarse en la preparación de una vacuna o un medicamento.

Como agentes inmunoterapéuticos, los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos se usan solos o en combinación con otras terapias (por ejemplo, antivíricos, antibacterianos, otros moduladores inmunitarios o en

antígenos de vacunas terapéuticas) para el tratamiento de lo siguiente: infecciones víricas persistentes o crónicas tales como, por ejemplo, aquellas producidas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus del herpes simple (VHS); infecciones bacterianas persistentes o crónicas tales como aquellas producidas por *Chlamydia*, *Pseudomonas*, gonorrea, *Treponema pallidum* (sífilis), *H. pylori*, tuberculosis, enfermedad de Lyme; infecciones fúngicas crónicas o persistentes, infecciones parasitarias crónicas o persistentes (por ejemplo, malaria); además de medicamentos para la reducción del crecimiento tumoral o la modulación de la proliferación celular anormal asociada a enfermedades tales como queratosis actínica, nevos atípicos o displásicos o lentigos premalignos.

Los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos de la presente invención pueden elegir como diana sustratos en el estado de enfermedad tales como, por ejemplo, cinasas particulares que incluyen EGFr, c-Kit, bFGF, Kdr, CHK1, CDK, cdc-2, Akt, PDGF, PI3K, VEGF, PKA, PKB, src, c-Met, Abl, Ras, RAF y MEK, entre otros.

Como agentes inmunoterapéuticos, los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos también pueden usarse en procedimientos para el tratamiento de cáncer tanto solos como en combinación con otras terapias anticancerígenas (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, mAb (anticuerpos monoclonales) u otros potenciadores inmunitarios). Además, ciertas imidazoquinoxalinas con la capacidad para inducir citocinas de tipo I (por ejemplo, IL-12, TNF- α o IFN) pueden usarse en procedimientos para el tratamiento de alergias y/o asma debido a su capacidad para dirigir la respuesta inmunitaria hacia secuelas más benignas. Los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos pueden usarse, por ejemplo, en procedimientos para el tratamiento de bacilo Calmette-Guerin (BCG), cólera, peste, fiebre tifoidea, infección por hepatitis B, gripe, poliomiелitis inactivada, rabia, sarampión, paperas, rubeola, poliomiелitis oral, fiebre amarilla, tétanos, difteria, *Haemophilus influenzae* b, infección meningocócica e infección neumocócica. Los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos pueden usarse en una cantidad eficaz anti-células proliferativas en procedimientos para el tratamiento de cáncer. Los compuestos de imidazoquinolina también pueden usarse en cantidad de citocina anti-Th2/tipo2 en procedimientos para la desviación de respuestas inmunitarias alérgicas/asmáticas.

En algunas realizaciones se proporcionan compuestos para sus usos en procedimientos para tratar cáncer y/o lesiones precancerosas. En tales realizaciones, uno o más agentes anticancerígenos conocidos se combinan con uno o más compuestos de imidazoquinoxalina para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto. Se contemplan varios agentes anticancerígenos adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención y se describen más detalladamente en la siguiente descripción detallada.

Según otra realización se proporcionan usos de compuestos en un procedimiento para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto. El procedimiento incluye administrar a un sujeto una dosis eficaz de una combinación que comprende al menos un compuesto de imidazoquinoxalina como se describen en este documento y un anticuerpo monoclonal (mAb). La combinación puede ser más eficaz en la inhibición de tal crecimiento celular que cuando el mAb se administra por sí mismo. En algunas realizaciones de los usos en procedimientos para tratar cáncer con la combinación, un compuesto adicional de imidazoquinoxalina como se describe en este documento y/o mAb se administra al sujeto.

En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno y una imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amina eficaz para estimular una respuesta mediada por células a dicho antígeno. En algunas realizaciones, los compuestos de imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amina tienen la fórmula general descrita en este documento. Por consiguiente, en algunas realizaciones de los procedimientos y composiciones de la invención, el compuesto de imidazoquinoxalina tiene la fórmula (I):



en la que:

R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenoilo C₂-C₁₂, alquenoilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinoilo C₂-C₁₂, alquinoilo C₂-C₁₂ sustituido, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido, hidroxilo, hidroxialquilo, halógeno, haloalquilo, amino, -OR₃, -N(R₃)(R₄), -NR₃C(=O)R₄, -NR₃S(=O)_pR₄, -NR₃C(=O)NR₄R₅, -NR₃S(=O)_pNR₄R₅, -C(=O)R₄, -S(=O)_pR₄, -C(=O)NR₃R₄, -S(=O)_pNR₃R₄ y -C(=O)OR₄;

R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenoilo C₂-C₁₂, alquenoilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinoilo C₂-C₁₂, alquinoilo C₂-C₁₂ sustituido, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido, arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxilo, hidroxialquilo, halógeno, haloalquilo, amino, -OR₃, -N(R₃)(R₄), -NR₃C(=O)R₄, -

$\text{NR}_3\text{S}(=\text{O})_p\text{R}_4$, $-\text{NR}_3\text{C}(=\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$, $-\text{NR}_3\text{S}(=\text{O})_p\text{NR}_4\text{R}_5$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_4$, $-\text{S}(=\text{O})_p\text{R}_4$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_3\text{R}_4$, $-\text{S}(=\text{O})_p\text{NR}_3\text{R}_4$ y $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_4$;

5 R_3 , R_4 y R_5 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1 - C_{12} , alquilo C_1 - C_{12} sustituido, alquinilo C_2 - C_{12} , alquinilo C_2 - C_{12} sustituido, alquenilo C_2 - C_{12} , alquenilo C_2 - C_{12} sustituido, cicloalquilo C_3 - C_{12} , cicloalquilo C_3 - C_{12} sustituido, arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxilo, hidroxialquilo, halo y haloalquilo;

R_6 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, -O-alquilo C_{1-3} , haloalquilo C_{1-3} , -O-haloalquilo C_{1-3} , perhaloalquilo C_{1-3} , -O-perhaloalquilo C_{1-3} , hidroxialquilo C_{1-3} , -O-hidroxialquilo C_{1-3} , CN, $-(\text{CH}_2)_q\text{C}(=\text{O})\text{R}_7$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_q\text{C}(=\text{O})\text{R}_7$, $-(\text{CH}_2)_q\text{N}(\text{R}_8)(\text{R}_9)$, -S-alquilo C_{1-3} , $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}_{10}$ y $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}_8)(\text{R}_9)$;

10 q es 0, 1, 2 ó 3;

R_7 se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, alquilo C_{1-3} o alcoxi C_{1-3} , y

R_8 , R_9 y R_{10} son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-3} ;

con la condición de que R_1 , R_2 y R_6 no sean simultáneamente hidrógeno; y

si R_1 y R_6 son ambos H, R_2 no es butilo;

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; un tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

Se proporcionan procedimientos de preparación de los compuestos y composiciones descritos en este documento y se contempla que están dentro del alcance de la invención como es el uso de las imidazoquinoxalinas en procedimientos para preparar medicamentos para su uso en los procedimientos de la invención.

20 En las realizaciones de la invención los compuestos pueden usarse en la preparación de un medicamento para potenciar la respuesta inmunitaria a un antígeno.

25 Otras realizaciones proporcionan el uso de los compuestos de la invención en la preparación de medicamentos para la estimulación inmunitaria, y otro agente tal como un antígeno para la administración separada o secuencial simultánea. En otra realización más particular, el uso es en un procedimiento para tratar o prevenir una infección bacteriana o vírica. En otra realización, el uso es en un procedimiento para tratar cáncer. En otra realización, el uso es en un procedimiento para prevenir infección por gripe.

30 Otras realizaciones proporcionan una preparación farmacéutica o sistema que comprende (a) un compuesto de fórmula (I); y (b) un antígeno, en el que (a) y (b) están tanto en mezcla como son composiciones separadas. Los agentes son para administración separada o secuencial simultánea. En otra realización más particular, el uso es en un procedimiento para prevenir una infección vírica, bacteriana, fúngica o parasítica. En otra realización, el uso es en un procedimiento para tratar cáncer.

Otras realizaciones de la invención incluyen aquellas descritas en la descripción detallada.

Descripción detallada de los dibujos

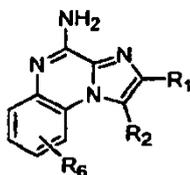
35 La FIG. 1 ilustra la actividad estimulante de los compuestos descritos en los Ejemplos 3 y 4 que se probó contra receptores TLR 7 y 8 y el receptor TLR7 de ratón.

La FIG. 2 ilustra la producción de $\text{TNF-}\alpha$ por PBMC humanas (células mononucleares de sangre periférica) en función de la concentración de los compuestos de los Ejemplos 3 y 4.

Descripción detallada de la invención

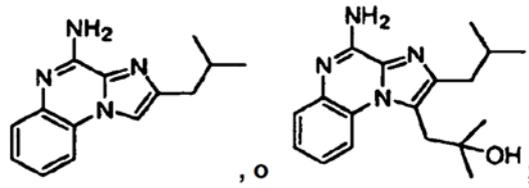
40 Los solicitantes han descubiertos procedimientos de estimulación de la actividad de citocinas en células y agentes inmunoterapéuticos y/o adyuvantes de vacunas que proporcionará tratamientos eficaces para trastornos tales como aquellos descritos en este documento y aquellos aparentes para un experto en la materia.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I):



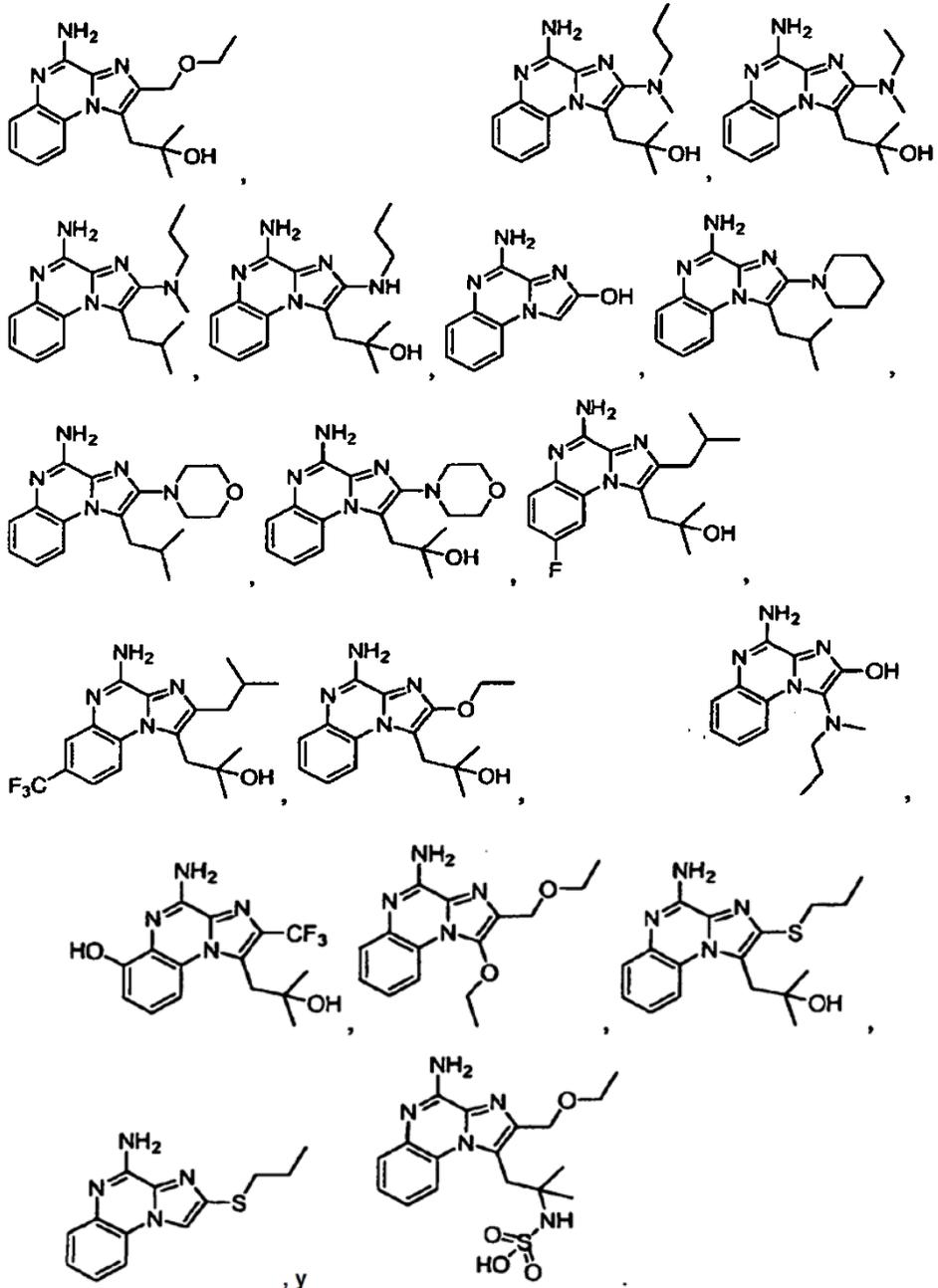
en la que:

- 5 R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido, hidroxil, hidroxialquilo, halógeno, haloalquilo, amino, -OR₃, -N(R₃)(R₄), -NR₃C(=O)R₄, -NR₃S(=O)_pR₄, -NR₃C(=O)NR₄R₅, -NR₃S(=O)_pNR₄R₅, -C(=O)R₄, -S(=O)_pR₄, -C(=O)NR₃R₄, -S(=O)_pNR₃R₄ y -C(=O)OR₄;
- 10 R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido, arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxil, hidroxialquilo, halógeno, haloalquilo, amino; OR₃, -N(R₃)(R₄), -NR₃C(=O)R₄, -NR₃S(=O)_pR₄, -NR₃C(=O)NR₄R₅, -NR₃S(=O)_pNR₄R₅, -C(=O)R₄, -S(=O)_pR₄, -C(=O)NR₃R₄, -S(=O)_pNR₃R₄ y -C(=O)OR₄;
- 15 R₃, R₄ y R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido, arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxil, hidroxialquilo, halo y haloalquilo;
- 20 R₆ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxil, -OR₃, -N(R₃)(R₄), haloalquilo C₁₋₃, -O-haloalquilo C₁₋₃, perhaloalquilo C₁₋₃, -O-perhaloalquilo C₁₋₃, hidroxialquilo C₁₋₃, -O-hidroxialquilo C₁₋₃, CN, -(CH₂)_qC(=O)R₁, -O-(CH₂)_qC(=O)R₇, -(CH₂)_qN(R₈)(R₉), -S-alquilo C₁₋₃, -S(=O)₂-R₁₀ y -S(=O)₂N(R₈)(R₉);
- q es 0, 1, 2 ó 3;
- R₇ se selecciona de hidrógeno, hidroxil, alquilo C₁₋₃ o alcoxi C₁₋₃; y
- R₈, R₉ y R₁₀ son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₃;
- con la condición de que R₁, R₂ y R₆ no sean simultáneamente hidrógeno; y
- si R₁ y R₆ son ambos H, R₂ no es butilo;
- 25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; un tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.
- En una realización preferida, si R₂ y R₆ son H, entonces R₁ no es metilo.
- En una realización preferida, si R₂ y R₆ son H, entonces R₁ no es isobutilo.
- En una realización preferida, si R₂ y R₆ son H, entonces R₁ no es fenilo.
- 30 En algunas realizaciones, R₁ es alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂ o alqueno C₂-C₁₂ sustituido. En algunas realizaciones, R₁ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido. En algunas otras realizaciones, R₁ es alquilo C₁-C₁₂. En algunas otras realizaciones, R₁ es alquilo C₁-C₆, por ejemplo, isobutilo (es decir, -CH₂-CH(CH₃)₂).
- 35 En algunas realizaciones, R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido o hidroxialquilo. En algunas realizaciones, R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o hidroxialquilo. En algunas realizaciones, R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o hidroxialquilo. En algunas realizaciones, R₂ es hidrógeno o hidroxialquilo, por ejemplo, -CH₂-C(OH)(CH₃)₂.
- 40 En algunas realizaciones, R₁ es alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂ o alqueno C₂-C₁₂ sustituido; y R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido o hidroxialquilo. En algunas realizaciones, R₁ es alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido; y R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o hidroxialquilo. En algunas realizaciones, R₁ es alquilo C₁-C₁₂; y R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o hidroxialquilo. En algunas realizaciones, R₁ es alquilo C₁-C₆; y R₂ es hidrógeno o hidroxialquilo. En algunas realizaciones, R₁ es -CH₂-CH(CH₃)₂; y R₂ es hidrógeno o hidroxialquilo, por ejemplo, -CH₂-C(OH)(CH₃)₂.
- En algunas realizaciones, R₆ es -OR₃ o -N(R₃)(R₄). En otras realizaciones, sólo uno de R₁, R₂ y R₆ es H.
- 45 En algunas de cada una de las anteriores realizaciones, R₆ es hidrógeno. En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona de



y sales farmacéuticamente aceptables, tautómeros y sales de los tautómeros del mismo.

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



5

En otra realización más particular, R₁ es -N(R₃)(R₄). Todavía más particular, R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, y alquilo C₁-C₁₂ sustituido. En otra

realización R₁ es hidroxilo.

Adicionalmente se proporcionan compuestos de fórmula (I) y mezclas de los mismos en los que cualquier átomo de carbono asimétrico puede tener tanto la configuración R como S. Los sustituyentes en un doble enlace o un anillo de los compuestos de fórmula (I) pueden estar presentes en tanto las configuraciones *cis* (-Z-) como *trans* (-E-). Por tanto, los compuestos pueden estar presentes como mezclas de isómeros, diastereómeros y enantiómeros, o pueden estar presentes como isómeros puros. En algunas realizaciones, los compuestos son enantioméricamente puros cuando sólo un enantiómero está presente. En otras realizaciones, el compuesto puede estar presente como una mezcla de enantiómeros que incluye más de un enantiómero que del otro.

Generalmente, un compuesto de la invención, o una composición que comprende un compuesto tal, se considera eficaz para provocar una respuesta inmunitaria a una concentración de 300 µM o menos en algunas realizaciones, 200 µM o menos en algunas realizaciones, 100 µM o menos en algunas realizaciones, o 20 µM o menos en algunas realizaciones, si el compuesto de la invención efectúa (a) la producción de TNF-α en un ensayo basado en células *in vitro* de células mononucleares periféricas de sangre humana, y (b) una concentración de células mononucleares periféricas de sangre humana (PBMC) de aproximadamente 500.000/ml cuando las células se exponen al compuesto durante un periodo de aproximadamente 18-24 horas, preferentemente de aproximadamente 24 horas.

El procedimiento anterior de estimular una respuesta inmunitaria local, por ejemplo, en células o tejidos seleccionados de un paciente, incluye la estimulación de una respuesta inmunitaria local en la que las células o tejidos seleccionados están infectados o son cancerígenos. En algunas realizaciones, las células o tejidos seleccionados se infectan con un hongo o bacteria. En algunas realizaciones, los tejidos seleccionados se inflaman con un alérgeno, por ejemplo, en una afección asmática. En otras realizaciones, las células seleccionadas se infectan con un virus o bacteria. En todavía otras realizaciones, el agente infeccioso es VHC, VIH, VHB, VHS, *H. pylori*, VHS tipo 1 ó 2 o virus del papiloma humano.

Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de inducir la biosíntesis del interferón en un sujeto. Tales usos en los procedimientos incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto en una cantidad suficiente para inducir la biosíntesis del interferón. En algunos usos tales en los procedimientos, un adyuvante de vacuna de fórmula (I) se administra al sujeto en una cantidad suficiente para inducir la biosíntesis del interferón.

Otra realización proporciona un compuesto de fórmula (I) en el que el compuesto se co-administra con otro agente a un paciente en necesidad del mismo. En algunas de tales realizaciones, el agente es un antígeno o una vacuna. En realizaciones en las que el compuesto de fórmula (I) se co-administra a un paciente o sujeto junto con otro agente, el compuesto de fórmula (I) puede administrarse al sujeto antes, durante o después de que el otro agente se administre al sujeto. Por tanto, en algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) se administra al sujeto al mismo tiempo que el otro agente se administra al sujeto. La localización o sitio de administración del compuesto de fórmula (I) puede ser igual o diferente de la localización de un antígeno cuando el compuesto se usa con un antígeno.

Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de modular una respuesta inmunitaria en un sujeto. Tales usos en procedimientos incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto.

Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento para inducir la producción de TNF-α en un sujeto. Tales usos en procedimientos incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) a un sujeto en una cantidad suficiente para inducir la producción de TNF-α. En alguna de tal realización de los mismos, el compuesto tiene una concentración de fármaco promedio en estado estacionario en la sangre inferior a 20 µM.

Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. La realización incluye administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria. En algunas de tales realizaciones, la respuesta inmunitaria incluye la producción de citocinas o el aumento de la producción de TNF-α. En algunas realizaciones, la inducción de una respuesta inmunitaria incluye la producción de anticuerpos que pueden ser anticuerpos neutralizantes o anticuerpos que median en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (anticuerpos de ADCC).

Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que padece una infección microbiana (vírica, bacteriana, fúngica o parasítica). Los compuestos para sus usos en un procedimiento incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria.

Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que padece una infección vírica o una afección de enfermedad producida por un virus. Los compuestos para sus usos en un procedimiento incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto. El virus puede seleccionarse de uno o más de los patógenos víricos descritos en la sección de antígenos más adelante. En algunas de tales realizaciones, el sujeto padece una infección vírica o afección de enfermedad producida por el virus de la hepatitis C (VHC). En otras

realizaciones, el sujeto padece una infección vírica o afección de enfermedad producida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

5 En otras realizaciones, la respuesta inmunitaria se induce en un sujeto que padece una infección bacteriana, fúngica o parasítica en el que la enfermedad que causa el organismo puede seleccionarse de uno o más de los patógenos bacterianos, fúngicos o parasíticos descritos en la sección de antígenos más adelante.

10 Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que padece una proliferación celular anormal o cáncer. Los compuestos para sus usos en un procedimiento incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el compuesto se administra a un sujeto que padece una enfermedad asociada a proliferación celular anormal. En algunas de tales realizaciones, la enfermedad se selecciona de neurofibromatosis, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, psoriasis, glomerulonefritis, reestenosis, retinopatía diabética proliferativa (RDP), formación de cicatrices hipertróficas, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de trasplante, angiogénesis o choque endotóxico.

15 Otras realizaciones proporcionan compuestos para sus usos en procedimientos de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que padece una enfermedad alérgica. Tales compuestos para sus usos en procedimientos incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria.

20 Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que padece asma. Los compuestos para sus usos en un procedimiento incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el asma puede tratarse dirigiendo la respuesta inmunitaria lejos de la secreción de citocinas de tipo 2 y el mecanismo efector (por ejemplo, producción de IgE y/o activación de mastocitos/basófilos).

25 Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que padece lesiones precancerosas. Los compuestos para sus usos en un procedimiento incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria. En algunas de tales realizaciones, las lesiones precancerosas son queratosis actínica. En otras realizaciones, las lesiones precancerosas se seleccionan de queratosis actínica, nevos atípicos o displásicos o lentigos premalignos. En otra realización o usos en un procedimiento, el compuesto de fórmula (I) se administra tópicamente a un sujeto.

Otras realizaciones proporcionan compuestos para sus usos en un procedimiento para inhibir una cinasa en un sujeto. Tales usos en procedimientos incluyen administrar el compuesto de fórmula (I) al sujeto.

30 Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de modular una respuesta inmunitaria en un sujeto. Los compuestos para sus usos en un procedimiento incluyen administrar un compuesto de fórmula (I) al sujeto en una cantidad suficiente para inhibir una cinasa en el sujeto. En algunas de tales realizaciones, la cinasa se selecciona de EGFr, c-Kit, bFGF, Kdr, CHKI, CDK, cdc-2, Akt, PDGF, PI3K, VEGF, PKA, PKB, src, c-Met, Abl, Ras, RAF, MEK, o combinaciones de las mismas. En otra realización o procedimiento, el compuesto de fórmula (I) se administra tópicamente a un sujeto.

35 Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende: administrar al sujeto un compuesto de fórmula (I) y un antígeno, en el que el compuesto induce o potencia una respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. Más particularmente, el antígeno puede ser uno o más de antígenos víricos, bacterianos, fúngicos, parasíticos o tumorales, u otros antígenos como se describen en este documento.

40 Otra realización proporciona una composición que comprende: el compuesto de fórmula (I) y otro agente. En algunas realizaciones, el otro agente es un antígeno. En otras realizaciones, la composición comprende el compuesto de fórmula (I) con un antígeno y un segundo adyuvante. En otra realización, la composición de la invención proporciona un compuesto de fórmula (I) y un segundo adyuvante. En otra realización, la composición comprende además poli(lactida-co-glicolida) (PLG). En otra realización, la composición comprende además MF59 u otro adyuvante.

Realizaciones, procedimientos y composiciones adicionales contemplados por ser útiles en la presente invención se desvelan en los documentos PCT/US2005/032721, PCT/US2005/022769, PCT/US2005/022520 y U.S.S.N. 10/814.480, 10/762.873, 60/582.654, 10/405.495 y 10/748.071.

50 Otra realización proporciona una composición farmacéutica que comprende: el compuesto de fórmula (I) y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 Otra realización de la presente invención proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de estimular la producción de TLR-7 que comprende administrar un compuesto de fórmula (I). Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de estimular la producción de TLR-8 que comprende administrar un compuesto de fórmula (I). Otra realización proporciona compuestos para sus usos en un procedimiento de estimular la producción de TLR-7 y de TLR-8 que comprende administrar un compuesto de fórmula (I).

Los compuestos de la presente invención producen potenciación inmunitaria y estimulan la producción de TLR-7 y TLR-8. Tales compuestos pueden usarse como activadores policlonales para la producción de antígenos. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de anticuerpos monoclonales con una especificidad por antígenos deseada que comprende poner en contacto los compuestos de la presente invención (tal como aquellos de fórmula (I)) con linfocitos B de memoria inmortalizados.

Los anticuerpos monoclonales producidos a partir de los mismos o fragmentos de los mismos pueden usarse para el tratamiento de enfermedad, para la prevención de enfermedad o para el diagnóstico de enfermedad. Los procedimientos de diagnóstico pueden incluir poner en contacto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Los procedimientos de diagnóstico también puede incluir la detección de un complejo antígeno/anticuerpo.

Los linfocitos B de memoria que van a transformarse pueden proceder de diversas fuentes (por ejemplo, de sangre completa, de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), de cultivo de sangre, de médula ósea, de órganos, etc.), y procedimientos adecuados para obtener los linfocitos B humanos son muy conocidos en la técnica. Las muestras pueden incluir células que no son linfocitos B de memoria u otros glóbulos sanguíneos. Una subpoblación de linfocitos B de memoria humanos específicos que presentan una especificidad por antígenos deseada puede seleccionarse antes de la etapa de transformación usando procedimientos conocidos en la técnica. En una realización, la subpoblación de linfocitos B de memoria humanos tiene especificidad por un virus, por ejemplo, los linfocitos B se toman de un paciente que padece o se ha recuperado del virus. En otra realización, los linfocitos B se toman de sujetos con enfermedad de Alzheimer e incluyen linfocitos B con especificidad por B-amiloide (por ejemplo Mattson & Chan (2003) Science 301:1 847-9; etc.).

Otra realización proporciona compuestos para su uso en un procedimiento para producir linfocitos B de memoria inmortalizados que comprende la etapa de transformar los linfocitos B de memoria usando el virus de Epstein Barr en presencia de un compuesto de la presente invención, tal como un compuesto de fórmula (I). Véase el documento WO 04/76677.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de los compuestos o realizaciones anteriormente mencionados de fórmula (I). Tales composiciones pueden incluir otros componentes farmacéuticamente aceptables tales como uno o más de excipientes, vehículos y similares muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

Se contempla que la invención englobe todas las posibles combinaciones de las realizaciones precedentes. En algunas realizaciones de cada uno del compuesto y procedimientos descritos en este documento, R_6 de los compuestos de fórmula (I) es hidrógeno.

Los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos pueden usarse con o sin un antígeno en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, usos en procedimientos para tratar cáncer o enfermedades infecciosas. Los compuestos de imidazoquinolina también pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos tales como agentes antivíricos y anticuerpos monoclonales en diferentes aplicaciones terapéuticas.

Una realización del procedimiento de inducir un efecto inmunoestimulante en un paciente se refiere a administrar una composición inmunogénica que comprende un antígeno en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria tal como una respuesta inmunitaria mediada por células y, como un adyuvante de vacuna, un compuesto de imidazoquinolina, en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria tal como la respuesta inmunitaria mediada por células al antígeno.

Los agentes combinados con los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos contemplados por ser útiles en el tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas incluyen aquellos muy conocidos en la técnica tales como, pero no se limitan a, anestésicos, sedantes hipnóticos, ansiolíticos, antiepilépticos, antiflogísticos, antipiréticos, estimulantes, amins despertadoras, fármacos antiparkinsonianos, agentes para psiconeurosis, agentes para el sistema nervioso central, relajantes del músculo esquelético, agentes para el sistema nervioso autónomo, agentes antiespásticos, agentes citotóxicos, anticuerpos monoclonales, fármacos para el ojo, fármacos para la nariz y el oído, fármacos antivertiginosos, cardiotónicos, fármacos antiarrítmicos, diuréticos, fármacos reductores de la tensión, vasoconstrictores, vasodilatadores coronarios, fármacos vasodilatadores periféricos, fármacos hiperlipidémicos, estimulantes de la respiración, fármacos antitusivos y expectorantes, broncodilatadores, fármacos para alergia, fármacos antidiarreicos, fármacos para trastornos intestinales, fármacos para úlceras peptídicas, digestivos estomacales, antiácidos, colagogos, fármacos para la hormona pituitaria, hormonas de las glándulas salivares, fármacos para la hormona tiroidea, fármacos antitiroideos, esteroides anabolizantes, corticosteroides, fármacos andrógenos, fármacos estrógenos, fármacos para hormonas del cuerpo lúteo, hormonas mixtas, fármacos para órganos urinarios/genitales, fármacos para el ano, esterilizaciones/antisépticos quirúrgicos, protectores para heridas, agentes externos para enfermedades purulentas, analgésicos, antipruríticos, astringentes, antiflogísticos, agentes externos para enfermedades de la piel por parásitos, fármacos para el ablandamiento de la piel, cáusticos, fármacos dentales/orales, vitaminas, preparaciones inorgánicas, líquidos suplementarios, hemostáticos, fármacos anticoagulantes, fármacos para enfermedades del hígado, antidotos, fármacos para intoxicación habituales, fármacos para el tratamiento de gota, preparaciones enzimáticas, fármacos diabéticos, antioncóticos, antihistamínicos, antibióticos (tales como cetólidas, aminoglucósidos, sulfonamidas y/o beta-

lactamas), agentes quimioterapéuticos, preparaciones biológicas, antihelmínticos, antiprotozoicos, fármacos para preparaciones, medios de contraste de rayos X y fármacos de diagnóstico.

Se proporcionan otros aspectos de la invención en los que las composiciones descritas en este documento se usan en procedimientos para el tratamiento de cáncer y la reducción del crecimiento tumoral. En un aspecto, un compuesto de imidazoxaquinolina de la invención se combina con un mAb conocido para su uso en un procedimiento para el tratamiento de cáncer. En una realización tal, un anticuerpo y un compuesto de imidazoxaquinolina se administran a un sujeto en necesidad del mismo. En algunas de tales realizaciones, el anticuerpo, individualmente, tiene un efecto inhibitor del crecimiento de células tumorales, y el compuesto de imidazoxaquinolina induce la producción de citocinas.

Según otra realización de la presente invención se proporciona una composición terapéutica para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto. Tales composiciones incluyen una cantidad eficaz de una combinación de al menos un compuesto de imidazoquinoloxalina de la invención, al menos un mAb y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En tales realizaciones se espera que la combinación sea más eficaz en la inhibición del crecimiento de ciertas células tumorales de mamífero que cualquiera de los agentes cuando se administran individualmente.

En otra realización se proporcionan compuestos para sus usos en procedimientos para tratar cáncer en los que agentes anticancerígenos conocidos se combinan con compuestos de imidazoquinoloxalina y análogos de los mismos de la invención para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto. Se contemplan varios agentes anticancerígenos adecuados para su uso en tales procedimientos. De hecho, la presente invención contempla, pero no se limita a, la administración de numerosos agentes anticancerígenos que incluyen, pero no se limitan a: fenretinida, vatalanib, SU-11248, SU 5416, SU 6668, oxaliplatino, bortezomib, R 115777, CEP-701, ZD-6474, mIN-518, lapatinib, gefitinib (Iressa), erlotinib (Tarceva), perifosina, CYC-202, LY-317615, escualamina, UCN-01, midostaurina, irofulven, estaurosporina, alvocidib, genisteína, DA-9601, avicina, docetaxel, 1M 862, SU 101 y tetratiomolibdato, además de otros agentes que inducen apoptosis tales como, pero no se limitan a, polinucleótidos (por ejemplo, ribozimas); polipéptidos (por ejemplo, enzimas); fármacos; miméticos biológicos; alcaloides; agentes alquilantes; antibióticos antitumorales; antimetabolitos; hormonas; compuestos de platino; anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos anticancerígenos, toxinas y/o radionúclidos; modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferones [por ejemplo, IFN- α , etc.] e interleucinas [por ejemplo, IL-2, etc.], etc.); agentes de inmunoterapia adoptiva; factores de crecimiento hematopoyéticos; agentes que inducen la diferenciación de células tumorales (por ejemplo, ácido all-trans-retinoico, etc.); reactivos para terapia con el gen 30; reactivos para terapia antisentido y nucleótidos; vacunas tumorales; e inhibidores de la angiogénesis, y similares. Se conocerán y serán evidentes numerosos otros ejemplos de compuestos quimioterapéuticos y terapias anticancerígenas adecuadas para la co-administración con los compuestos de imidazoquinoloxalina desvelados y análogos de los mismos para aquellos expertos en la materia.

En algunas realizaciones, los agentes anticancerígenos comprenden agentes que inducen o estimulan la apoptosis. Los agentes que inducen la apoptosis incluyen, pero no se limitan a, radiación (por ejemplo, W); inhibidores de cinasas (por ejemplo, inhibidor de cinasas del receptor del factor de crecimiento epidérmico [EGFR]; inhibidor de cinasas del receptor del factor de crecimiento vascular [VGFR], inhibidor de cinasas del receptor del factor 5 de crecimiento de fibroblastos [FGFR], inhibidor de cinasas I del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas [PGFR], inhibidores de cinasas de EGFR y Bcr-Abl tales como Gleevec, Iressa, y Tarceva); moléculas antisentido; anticuerpos [por ejemplo, Herceptin y Rituxan]; antiestrógenos [por ejemplo, raloxifeno y tamoxifeno]; antiandrógenos [por ejemplo, flutamida, bicalutamida, finasterida, aminoglutetamida, ketoconazol y corticosteroides]; inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) [por ejemplo, Celecoxib, meloxicam, NS-398, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE)]; y fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer [por ejemplo, CPT-11, fludarabina (Fludara), dacarbazina (DTIC), dexametasona, mitoxantrona, Milotarg, cisplatino, 5-FU, doxorubicina, Taxotere o taxol]; moléculas de señalización celular; ceramidas y citocinas; y similares también pueden administrarse a sujetos conjuntamente con las imidazoquinoloxalinas de fórmula (I).

En otras realizaciones se proporcionan compuestos para sus usos en procedimientos para tratar alergias. Tales compuestos para sus usos en procedimientos incluyen administrar un compuesto de imidazoquinoloxalina solo o en combinación con otro agente conocido por ser eficaz contra alergias. En tales realizaciones, la combinación es más eficaz en el tratamiento de una afección alérgica que el (los) agente(s) conocido(s) sin la adición del compuesto de imidazoquinoloxalina. En algunas de tales realizaciones, el agente conocido es un antihistamínico y/o un inhibidor de leucotrieno. En otras realizaciones, la afección alérgica es asma. En otras realizaciones, la afección alérgica se selecciona de rinitis alérgica, dermatosis o urticaria. En algunas de tales realizaciones, la combinación se administra al sujeto enteralmente, parenteralmente, intranasalmente, subcutáneamente o intraarterialmente.

Las composiciones contempladas por estar dentro del alcance de la presente invención puede incluir (un) adyuvante(s) adicional(es) y u otro compuesto inmunoestimulante.

Adyuvantes

Las vacunas o composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse conjuntamente con otros

agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones pueden incluir un adyuvante. Los adyuvantes para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes expuestos más adelante:

Composiciones que contienen minerales

5 Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. (por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de Vaccine Design. (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.), o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso de fosfato), tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción a la(s) sal(es). Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica (documento WO00/23105).

Las sales de aluminio pueden incluirse en vacunas de la invención de forma que la dosis de Al^{3+} esté entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

15 En una realización, el adyuvante basado en aluminio para su uso en la presente invención es alumbre (sulfato de aluminio y potasio ($AlK(SO_4)_2$)), o un derivado del alumbre tal como el formado *in situ* mezclando un antígeno en tampón fosfato con alumbre, seguido de valoración y precipitación con una base tal como hidróxido de amonio o hidróxido sódico.

20 Otro adyuvante basado en aluminio para su uso en formulaciones de vacuna de la presente invención es el adyuvante de hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$) u oxihidróxido de aluminio cristalino ($AlOOH$), que es un excelente adsorbente, que tiene un área superficial de aproximadamente 500 m^2/g . Alternativamente se proporciona el adyuvante de fosfato de aluminio ($AlPO_4$) o hidroxifosfato de aluminio que contienen grupos fosfato en lugar de alguno o todos los grupos hidroxilo del adyuvante de hidróxido de aluminio. Los adyuvantes de fosfato de aluminio preferidos proporcionados en este documento son amorfos y solubles en medios ácidos, básicos y neutros.

25 En otra realización, el adyuvante de la invención comprende tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio. En una realización más particular de la misma, el adyuvante tiene una mayor cantidad de fosfato de aluminio que el hidróxido de aluminio, tal como una relación de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o superior a 9:1 en peso de fosfato de aluminio con respecto a hidróxido de aluminio. Todavía más particular, las sales de aluminio en la vacuna están presentes a 0,4 a 1,0 mg por dosis de vacuna, o 0,4 a 0,8 mg por dosis de vacuna, o 0,5 a 0,7 mg por dosis de vacuna, o aproximadamente 0,6 mg por dosis de vacuna.

30 Generalmente, el (los) adyuvante(s) basado(s) en aluminio preferido(s), o relación de múltiples adyuvantes basados en aluminio tales como fosfato de aluminio con respecto a hidróxido de aluminio, se selecciona por la optimización de la atracción electrostática entre moléculas de forma que el antígeno lleve una carga opuesta a la del adyuvante al pH deseado. Por ejemplo, el adyuvante de fosfato de aluminio (iep = 4) se adsorbe a lisozima, pero no a albúmina a pH 7,4. Si la albúmina debiera ser la diana, se seleccionaría el adyuvante de hidróxido de aluminio (iep 11,4).
35 Alternativamente, el pretratamiento de hidróxido de aluminio con fosfato reduce su punto isoeléctrico, haciendo que sea un adyuvante preferido para antígenos más básicos.

Emulsiones de aceite

40 Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua tales como MF59 (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85, formuladas en emulsiones de partículas submicrométricas usando un microfluidizador). Véase el documento WO90/14837. Véanse también Podda, "The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine", Vaccine (2001) 19: 2673-2680; Frey y col., "Comparison of the safety, tolerability, and immunogenicity of a MF59-adjuvanted influenza vaccine and a non-adjuvanted influenza vaccine in non-elderly adults", Vaccine (2003) 21:4234-4237. MF59 se usa como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente contra el virus de la gripe FLUAD™.

45 Adyuvantes particularmente preferidos para su uso en las composiciones son emulsiones de aceite en agua submicrométricas. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para su uso en este documento son emulsiones de escualeno/agua que opcionalmente contienen cantidades variables de MTP-PE tales como una emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene 4-5% peso/volumen de escualeno, 0,25-1,0% peso/volumen de Tween 80™ (poli(monoleato de oxietilensorbitano)) y/o 0,25-1,0% de Span 85™ (trioleato de sorbitano) y opcionalmente N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión de aceite en agua submicrométrica conocida como "MF59" (publicación internacional nº WO90/14837; patentes de EE.UU. nº 6.299.884 y 6.451.325, y Ott y col., "MF59 - Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. y Newman, M.J. eds.) Plenum Press, Nueva York, 1995, pág. 277-296). MF59
55 contiene 4-5% peso/volumen de escualeno (por ejemplo 4,3%), 0,25-0,5% peso/volumen de Tween 80™ y 0,5% peso/volumen de Span 85™ y opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador de modelo 110Y (Microfluidics, Newton,

MA). Por ejemplo, MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500 µg/dosis, más preferentemente de 0-250 µg/dosis y lo más preferentemente de 0-100 µg/dosis. Como se usa en este documento, el término "MF59-0" se refiere a la emulsión aceite en agua submicrométrica anterior que carece de MTP-PE, mientras que el término MF59-MTP denota una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100 µg de MTP-PE por dosis, etc. MF69, otra emulsión de aceite en agua submicrométrica para su uso en este documento, contiene 4,3% peso/volumen de escualeno, 0,25% peso/volumen de Tween 80TM y 0,75% peso/volumen de Span 85TM y opcionalmente MTP-PE. Todavía otra emulsión de aceite en agua submicrométrica es MF75, también conocida como SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80TM, 5% de polímero L121 bloqueado con Pluronic y thr-MDP, también microfluidizado en una emulsión submicrométrica. MF75-MTP denota una formulación de MF75 que incluye MTP, tal como de 100-400 µg de MTP-PE por dosis.

Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas, los procedimientos de preparación de las mismas y los agentes inmunoestimulantes tales como muramiltéptidos para su uso en las composiciones se describen en detalle en la publicación internacional nº WO90/14837 y las patentes de EE.UU. nº 6.299.884 y 6.451.325.

También puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) como adyuvantes en la invención.

Los adyuvantes de emulsiones de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:

(1) Una emulsión submicrométrica de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente el 5% de escualeno, aproximadamente el 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5% de Span 85. En términos de peso, estas relaciones se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [documento WO90/14837. Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203. Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.], como se describe en más detalle en el Capítulo 10 de la ref. *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) y el Capítulo 12 de la ref. *Adjuvants of vaccines: Preparation Methods and Research Protocols* (volumen 42 de *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato de sodio 10 mM.

(2) Una emulsión de escualeno, un tocoferol y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10% de tocoferol y del 0,3 al 3% de Tween 80, y la relación de peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤ 1 ya que ésta proporciona una emulsión más estable. Una emulsión tal puede prepararse disolviendo Tween 80 en PBS para dar una disolución al 2%, luego mezclando 90 ml de esta disolución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), luego microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm.

(3) Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100).

(4) Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("PluronicTM L121"). La emulsión puede formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para muramildipéptidos y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25] (0,05-1% de Thr-MDP, 5% de escualano, 2,5% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). También puede usarse sin Thr-MDP, como el adyuvante "AF" [Hariharan y col. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.

Las emulsiones se mezclan preferentemente con agentes adicionales (tales como un antígeno) extemporáneamente en el momento de la administración. Por tanto, el adyuvante y el antígeno se mantienen normalmente por separado en una vacuna envasada o distribuida lista para su formulación final en el momento de uso. El antígeno estará generalmente en una forma acuosa, de forma que la vacuna se prepara finalmente mezclando dos líquidos. La relación de volumen de los dos líquidos para la mezcla puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5), pero es generalmente aproximadamente 1:1.

Si una composición incluye un tocoferol, puede usarse cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero se prefieren los α -tocoferoles. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Pueden usarse D- α -tocoferol y DL- α -tocoferol. Los tocoferoles se incluyen ventajosamente en vacunas para su uso en pacientes ancianos (por ejemplo, de 60 años de edad o mayores) debido a que se ha informado que la vitamina E tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmunitaria en este grupo de pacientes [Han y col. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference*, París, 9-10 de junio de 2005]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [documento US-6630161]. Un α -tocoferol preferido es DL- α -tocoferol, y la sal preferida del este tocoferol es el succinato. Se ha encontrado que la sal de succinato coopera con ligandos relacionados con TNF *in vivo*. Además, se sabe que el

succinato de α -tocoferol es compatible con las vacunas de la gripe y es un conservante útil como alternativa a compuestos mercuriales.

Formulaciones de saponina

5 Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroles y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas
10 tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como ISCOM.

Las composiciones de saponina se han purificado usando cromatografía en capa fina de alta resolución (HP-TLC) y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la patente de EE.UU. nº 5.057.540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles tal como colesterol (véase el documento WO96/33739).
15

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM). Los ISCOM normalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en los documentos EP0109942, WO96/11711 y WO96/33739. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergente(s) adicional(es). Véase el documento 00/07621.
20

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponinas puede encontrarse en Barr y col., "ISCOMs and other saponin based adjuvants", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:247-271. Véase también Sjolander y col., "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:321-338.
25

Virosomas y partículas similares a virus (VLP)

Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas víricos nativos. Las proteínas víricas pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como proteínas de núcleo o de cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la glosopeda, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Los VLP se tratan adicionalmente en los documentos WO03/024480, WO03/024481, y Niikura y col., "Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes", *Virology* (2002) 293:273-280; Lenz y col., "Papillomavirus-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells", *Journal of Immunology* (2001) 5246-5355; Pinto y col., "Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16 L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles", *Journal of Infectious Diseases* (2003) 188:327-338; y Gerber y col., "Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG", *Journal of Virology* (2001) 75(10):4752-4760. Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, Gluck y col., "New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future", *Vaccine* (2002) 20:B10-B16. Los virosomas de la gripe reconstituidos potenciadores de la inmunidad (IRIV) se usan como sistema de administración de antígeno de subunidad en el producto trivalente intranasal INFLEXAL™ {Mischler & Metcalfe (2002) *Vaccine* 20 Suppl 5:B17-23} y el producto INFLUVAC PLUS™.
30
35
40
45

Derivados bacterianos o microbianos

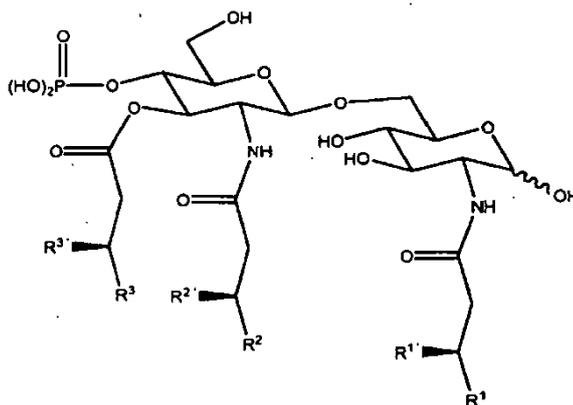
Adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como:

50 (1) *Derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS)*

Tales derivados incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en el documento EP 0 689 454. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son demasiado pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros (véase el documento EP 0 689 454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529. Véase Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
55

3dMPL se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota*. Activa células del linaje de los monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas que incluyen IL-1, IL-12, TNF- α y GM-CSF (véase también la ref. Thompson y col. (2005) J Leukoc Biol 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'). La preparación de 3dMPL se describió originariamente en referencia a la solicitud de patente de RU GB-A-2220211.

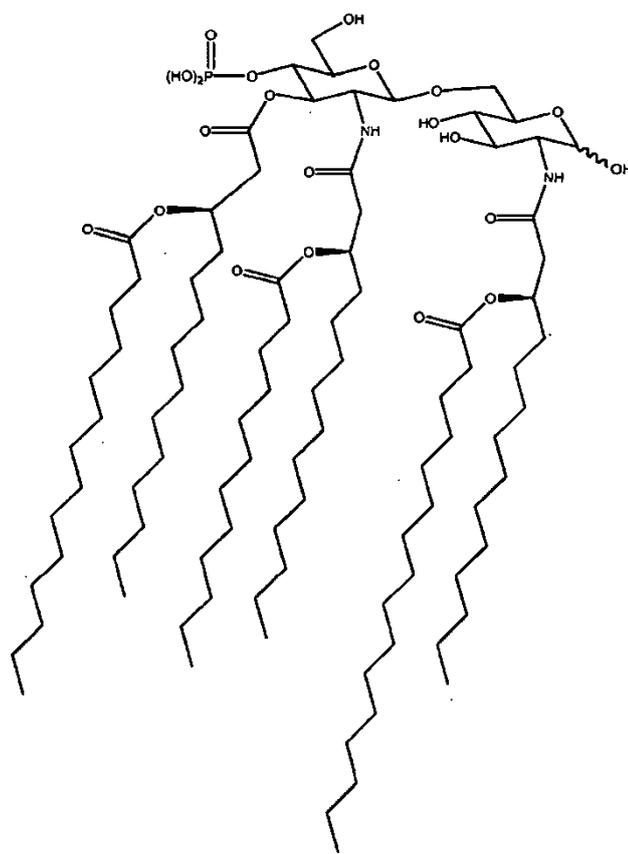
3dMPL puede tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, variables por su acilación (por ejemplo, que tienen 3, 4, 5 ó 6 cadenas de acilo que pueden ser de diferentes longitudes). Los dos monosacáridos de glucosamina (también conocidos como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-acilados en sus carbonos en la posición 2 (es decir, en las posiciones 2 y 2'), y también hay O-acilación en la posición 3'. El grupo unido al carbono 2 tiene la fórmula -NH-CO-CH₂-CR¹R¹. El grupo unido al carbono 2' tiene la fórmula -NH-CO-CH₂-CR²R². El grupo unido al carbono 3' tiene la fórmula -O-CO-CH₂-CR³R³. Una estructura representativa es:



Los grupos R¹, R² y R³ son cada uno independientemente -(CH₂)_n-CH₃. El valor de n es preferentemente entre 8 y 16, más preferentemente entre 9 y 12, y lo más preferentemente es 10. Los grupos R¹, R² y R³ pueden ser cada uno independientemente: (a) -H; (b) hidroxilo; o (c) -O-CO-R⁴ en la que R⁴ es tanto -H como -(CH₂)_m-CH₃ en la que el valor de m es preferentemente entre 8 y 16, y es más preferentemente 10, 12 ó 14. En la posición 2, m es preferentemente 14. En la posición 2', m es preferentemente 10. En la posición 3', m es preferentemente 12. Por tanto, los grupos R¹, R² y R³ son preferentemente grupos -O-acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Si todos de R¹, R² y R³ son -H, entonces 3dMPL sólo tiene 3 cadenas de acilo (una en cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Si sólo dos de R¹, R² y R³ son -H, entonces 3dMPL puede tener 4 cadenas de acilo. Si sólo uno de R¹, R² y R³ es -H, entonces 3dMPL puede tener 5 cadenas de acilo. Si ninguno de R¹, R² y R³ es -H, entonces 3dMPL puede tener 6 cadenas de acilo. El adyuvante 3dMPL usado según la invención puede ser una mezcla de estas formas, con de 3 a 6 cadenas de acilo, pero se prefiere incluir 3dMPL con 6 cadenas de acilo en la mezcla, y en particular para garantizar que la forma de cadena de hexaacilo constituya al menos el 10% en peso del 3dMPL total, por ejemplo, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$ o más. Se ha encontrado que 3dMPL con 6 cadenas de acilo es la forma más activa del adyuvante.

Por tanto, la forma más preferida de 3dMPL para la inclusión en composiciones de la invención es:



en la que 3dMPL se usa en forma de una mezcla, por lo que las referencias a cantidades o concentraciones de 3dMPL en las composiciones de la invención se refieren a las especies de 3dMPL combinadas en la mezcla.

5 En condiciones acuosas, 3dMPL puede formar agregados o partículas micelares con diferentes tamaños, por ejemplo, con un diámetro <150 nm o >500 nm. Cualquiera o ambos de éstos pueden usarse con la invención, y las mejores partículas pueden seleccionarse por ensayo rutinario. Se prefieren partículas más pequeñas (por ejemplo, suficientemente pequeñas para dar una suspensión acuosa clara de 3dMPL) para su uso según la invención debido a su actividad superior [documento WO 94/21292]. Las partículas preferidas tienen un diámetro medio inferior a 220 nm, más preferentemente inferior a 200 nm o inferior a 150 nm o inferior a 120 nm, e incluso pueden tener un diámetro medio inferior a 100 nm. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el diámetro medio no será inferior a 50 nm. Estas partículas son suficientemente pequeñas para ser adecuadas para la esterilización por filtración. El diámetro de partícula puede evaluarse por la técnica rutinaria de dispersión de la luz dinámica, que revela un diámetro de partícula medio. Si se dice que una partícula tiene un diámetro de x nm, generalmente tendrá una distribución de partículas alrededor de esta media, pero al menos 50% en número (por ejemplo, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, o más) de las partículas tendrá un diámetro dentro del intervalo $x \pm 25\%$.

3dMPL puede usarse ventajosamente en combinación con una emulsión de aceite en agua. Sustancialmente, todos los 3dMPL pueden localizarse en la fase acuosa de la emulsión. El 3dMPL puede usarse por sí mismo o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, se conoce usar 3dMPL en combinación con la saponina QS21 [documento WO94/00153] (incluyendo una emulsión de aceite en agua [documento WO95/17210]), con un oligonucleótido inmunoestimulante, con tanto QS21 como un oligonucleótido inmunoestimulante, con fosfato de aluminio [documento WO96/26741], con hidróxido de aluminio [documento WO93/19780], o con tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio.

Derivados del lípido A

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en Meraldi y col., "OM-174, a New Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei*", Vaccine (2003) 21:2485-2491; y Pajak y col., "The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo", Vaccine (2003) 21:836-842.

Oligonucleótidos inmunoestimulantes

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias

de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina sin metilar seguida de guanosa y ligada por un enlace fosfato a una guanosa). También se ha mostrado que los ARN bicatenarios bacterianos u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimulantes.

- 5 Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Opcionalmente, la guanosa puede sustituirse con un análogo tal como 2'-desoxi-7-deazaguanosa. Véanse Kandimalla y col., "Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles", *Nucleic Acids Research* (2003) 31(9): 2393-2400; documentos WO02/26757 y WO99/62923 para ejemplos de posibles sustituciones de análogos. El efecto del adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?", *Nature Medicine* (2003) 9(7): 831-835; McCluskie y col., "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002) 32:179-185; documento WO98/40100; patente de EE.UU. nº 6.207.646; patente de EE.UU. nº 6.239.116 y patente de EE.UU. nº 6.429.199.
- 10
- 15 La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT. Véase Kandimalla y col., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 654-658. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1 tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en Blackwell y col., "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha", *J. Immunol.* (2003) 170(8):4061-4068; Krieg, "From A to Z on CpG", *TRENDS in Immunology* (2002) 23(2): 64-65 y el documento WO01/95935. Preferentemente, CpG es CpG-A ODN.
- 20

Ejemplos de nucleótidos de CpG incluyen las siguientes secuencias, que pueden contener enlaces internucleotídicos modificados con fosforotioato:

- 25 TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826); TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758); ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG; TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006); y TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668). Véase el documento WO 05/25614.

- Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, Kandimalla y col., "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", *BBRC* (2003) 306:948-953; Kandimalla y col., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3):664-658; Bhagat y col., "CpG penta- and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents" *BBRC* (2003) 300:853-861, y el documento WO03/035836.
- 30

35 *Toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas*

- Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en el documento WO95/17211 y como adyuvantes parenterales en el documento WO98/42375. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-192G. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las siguientes referencias: Beignon y col., "The LTR72 Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli* Enhances the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+ T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin", *Infection and Immunity* (2002) 70(6):3012-3019; Pizza y col., "Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants", *Vaccine* (2001) 19:2534-2541; Pizza y col., "LTK63 and LTR72, two mucosal adjuvants ready for clinical trials" *Int. J. Med. Microbiol* (2000) 290(4-5):455-461; Scharton-Kersten y col., "Transcutaneous Immunization with Bacterial ADP-Ribosylating Exotoxins, Subunits and Unrelated Adjuvants", *Infection and Immunity* (2000) 68(9):5306-5313; Ryan y col., "Mutants of *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular Pertussis Vaccine: Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells" *Infection and Immunity* (1999) 67(12):6270-6280; Partidos y col., "Heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and its site-directed mutant LTK63 enhance the proliferative and cytotoxic T-cell responses to intranasally co-immunized synthetic peptides", *Immunol. Lett.* (1999) 67(3):209-216; Peppoloni y col., "Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines", *Vaccines* (2003) 2(2):285-293; y Pine y col., (2002) "Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from *Escherichia coli* (LTK63)" *J. Control Release* (2002) 85(1-3):263-270. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en Domenighini y col., *Mol. Microbiol* (1995) 15(6):1165-1167.
- 40
- 45
- 50
- 55

Bioadhesivos y mucoadhesivos

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas (Singh y col. (2001) J. Cont. Rele. 70:267-276) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención. Por ejemplo, el documento WO99/27960.

Micropartículas

Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30 µm de diámetro, y lo más preferentemente ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxi-butírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico tal como CTAB).

Liposomas

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en la patente de EE.UU. nº 6.090.406, la patente de EE.UU. nº 5.916.588 y el documento EP 0 626 169.

Formulaciones de polioxietiléneteres y polioxietilénésteres

Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen polioxietiléneteres y polioxietilénésteres. Documento WO99/52549. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207), además de tensioactivos de polioxietilentalquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO01/21152).

Los polioxietiléneteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en Andrianov y col., "Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", Biomaterials (1998) 19(1-3):109-115 y Payne y col., "Protein Release from Polyphosphazene Matrices", Adv. Drug. Delivery Review (1998) 31(3):185-196.

Muramilpéptidos

Ejemplos de muramilpéptidos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

Inmunopotenciadores de moléculas pequeñas (SMIP)

Compuestos de imidazoquinolina

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolina adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen imiquimod y sus análogos descritos adicionalmente en Stanley, "Imiquimod and the imidazoquinolines: mechanism of action and therapeutic potential" Clin Exp Dermatol (2002) 27(7):571-577; Jones, "Resiquimod 3M", Curr Opin Investig Drugs (2003) 4(2):214-218; Wu y col. (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83 Vasilakos y col. (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74, patentes de EE.UU. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.

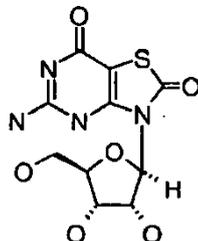
SMIP preferidos incluyen:

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;

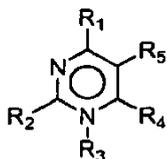
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
 1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
 5 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol;
 acetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etilo;
 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona;
 N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
 10 N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
 N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
 1-{4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il}-2-metilpropan-2-ol;
 1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol;
 15 N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina.

Análogos de nucleósidos

Un análogo de nucleósido tal como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):

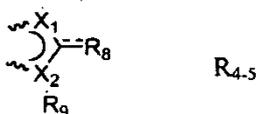


- 20 y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en las referencias US 6.924.271 a US2005/0070556, US 5.658.731; (f) un compuesto que tiene la fórmula:



en la que:

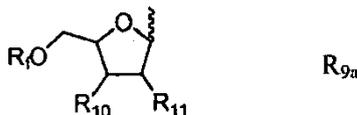
- R₁ y R₂ son cada uno independientemente H, halógeno, -NR_aR_b, hidroxil, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₆ sustituido;
 25 R₃ está ausente, es H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;
 R₄ y R₅ son cada uno independientemente H, halógeno, heterociclilo, heterociclilo sustituido, -C(O)-R_d, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, o se unen juntos para formar un anillo de 5 miembros como en R₄₋₅:



consiguiéndose la unión en los enlaces indicados por ~~~~~

X₁ y X₂ son cada uno independientemente N, C, O, o S; R₈ es H, halógeno, hidroxilo, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, hidroxilo, -NR_aR_b, -(CH₂)_n-O-R_c, -O-(alquilo C₁₋₆), -S(O)₆R_e o -C(O)-R_d;

- 5 R₉ es H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R_{9a}, en la que R_{9a} es:



consiguiéndose la unión en el enlace indicado por ~~~~~

R₁₀ y R₁₁ son cada uno independientemente H, halógeno, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NR_aR_b o hidroxilo;

- 10 cada R_a y R_b es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, arilo C₆₋₁₀;
- cada R_c es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C₁₋₆, o alquilo C₁₋₆ sustituido;
- cada R_d es independientemente H, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆), -NH(alquilo C₁₋₆ sustituido), -N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆ sustituido)₂, arilo C₆₋₁₀, o heterociclilo;
- 15 cada R_e es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;
- cada R_f es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, fosfato, difosfato o trifosfato;
- cada n es independientemente 0, 1, 2 ó 3;
- cada p es independientemente 0, 1 ó 2; o
- 20 o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero;

Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [patente de EE.UU. 5.011.828].

Compuestos tiosemicarbazona

- 25 Ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, además de procedimientos de formulación, preparación y cribado para los compuestos, todos adecuados para uso como adyuvantes en la invención, incluyen aquellos descritos en el documento WO04/60308. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas tales como TNF-α.

Compuestos de triptantrina

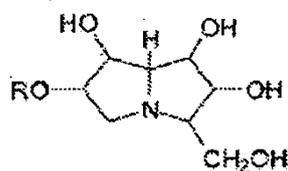
- 30 Ejemplos de compuestos de triptantrina, además de procedimientos de formulación, preparación y cribado para los compuestos, todos adecuados para uso como adyuvantes en la invención, incluyen aquellos descritos en el documento WO04/64759. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas tales como TNF-α.

SMIP adicionales

- 35 (i) Compuestos desvelados en la referencia WO2004/87153 que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazol-quinolinona (ABIQ) [documentos US 6.605.617, WO02/18383], compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de quinacilina, compuestos de pirrol [documento WO2004/018455], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina,
- 40 compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol [documento WO03/082272].

(ii) 5'-monofosfato de metil-inosina ("MIMP") [Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86].

(iii) Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilado [documento WO2004/064715], tal como uno que tiene la fórmula:



5 en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenoilo, alquínilo y arilo saturados o insaturados, lineales o ramificados, sin sustituir o sustituidos, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de los mismos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc.

(iv) Una gamma-inulina [Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80] o derivado de la misma, tal como algamulina.

Inmunomoduladores humanos

15 Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

Las sales de aluminio y MF59 son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas inyectables. Las toxinas bacterianas y los bioadhesivos son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas administradas a la mucosa tales como vacunas nasales.

20 Moduladores/agonistas de TLR

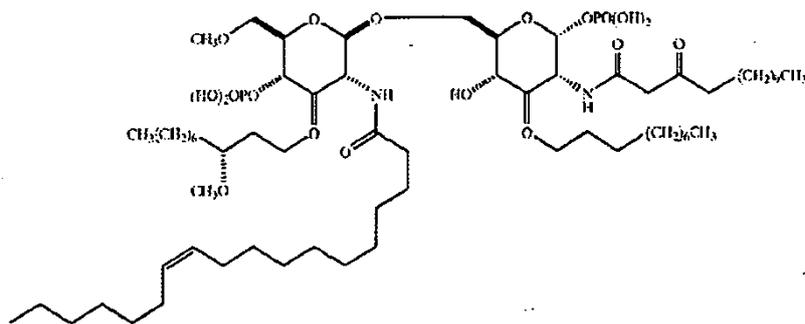
Por "agonista de TLR" se indica un componente que puede provocar una respuesta de señalización mediante una ruta de señalización de TLR, tanto como un ligando directo como indirectamente mediante la generación de ligando endógeno o exógeno (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5). Los agonistas de TLR de la presente invención incluyen agonistas de los siguientes:

25 (1) TLR1: lipopéptidos triacilados (LP); modulina soluble en fenol; LP de *Mycobacterium tuberculosis*; S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S) Lys(4)-OH, LP de triclohidrato (Pam3Cys) que imita el extremo amino acetilado de una lipoproteína bacteriana y OspA LP de *Borrelia burgdorferi*;

30 (2) TLR2: uno o más de un lipopéptido bacteriano de *M. tuberculosis*, *B. burgdorferi*, *T. pallidum*; peptidoglicanos de especies que incluyen *Staphylococcus aureus*; ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos, porinas de *Neisseria*, fimbrias bacterianas, factores de virulencia de *Yersinia*, viriones del CMV, hemaglutinina de sarampión y zimosano de levadura;

(3) TLR3: ARN bicatenario, o ácido poliinosínico – policitidílico (poli IC), un patrón de ácido nucleico molecular asociado a infección vírica;

35 (4) TLR4: uno o más de un lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas, o fragmentos de las mismas; proteína de choque térmico (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 ó 90; proteína A de tensioactivo, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparano, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensina-2. En una realización, el agonista de TLR es HSP 60, 70 ó 90. En una realización alternativa, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-4 es un derivado no tóxico de LPS. El monofosforil lípido A (MPL) y 3D-MPL como se ha descrito anteriormente es un derivado no tóxico tal. Otros adyuvantes y moduladores de TLR4 incluyen lípidos ligados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato tal como el antagonista de TLR4 E5564 [Wong y col. (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42, US2005/0215517]:



(5) TLR5: que incluye flagelina bacteriana;

(6) TLR6: que incluye lipoproteína micobacteriana, LP di-acilado y modulina soluble en fenol. Otros agonistas de TLR6 se describen en el documento W02003043572;

5 (7) TLR7: que incluye loxoribina, un análogo de guanosina en las posiciones N7 y C8, isatoribina, ANA-971, ANA-975, o un compuesto de imidazoquinolina, o derivado del mismo. En una realización, el agonista de TLR es imiquimod o resiquimod. Otros agonistas de TLR7 se describen en el documento W002085905;

10 (8) TLR8: una molécula de imidazoquinolina, por ejemplo, resiquimod (R848); resiquimod también puede ser reconocido por TLR-7. Otros agonistas de TLR-8 que pueden usarse incluyen aquellos descritos en el documento W02004071459; y/o

(9) TLR9: en una realización, el agonista de TLR que puede provocar una respuesta de señalización por TLR-9 es HSP90, o un ADN que contiene nucleótido de CpG sin metilar, en particular contextos de secuencias descritos anteriormente con motivos de CpG.

15 Los moduladores de TLR preferidos son agonistas de TLR7 (por ejemplo, imidazoquinolinas) y/o TLR9 (por ejemplo, oligonucleótidos de CpG).

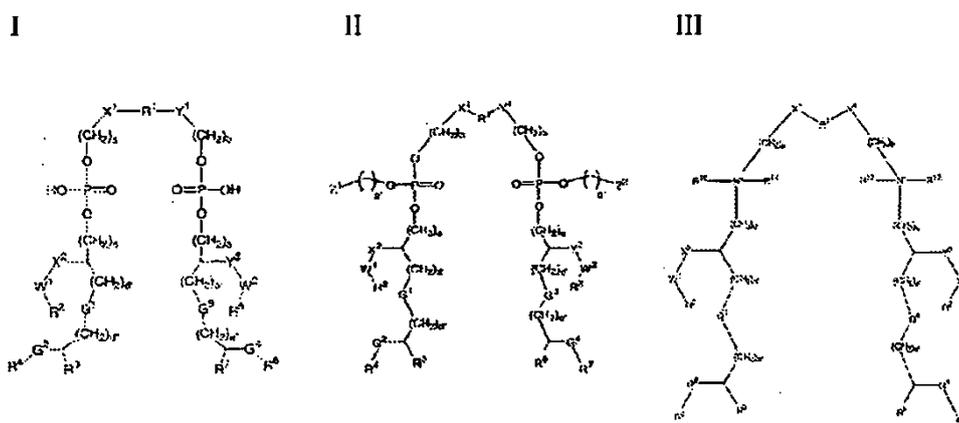
Lípidos que contienen fosfo

Compuestos desvelado en la referencia PCT/US2005/022769.

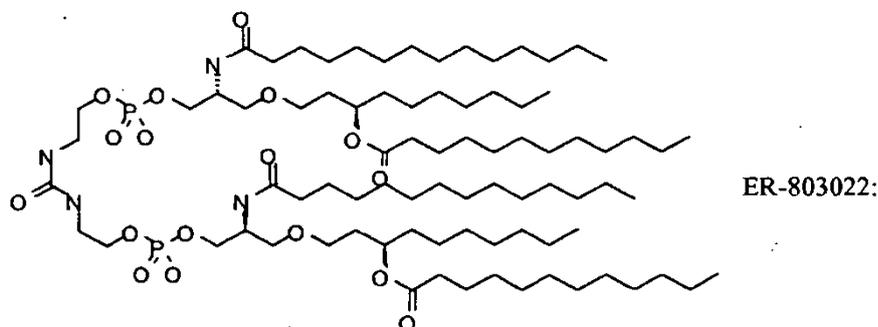
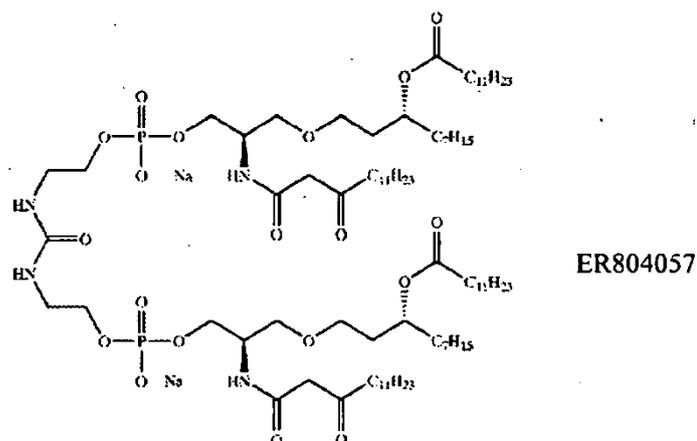
Derivados de fosfatidilcolina y moléculas que contienen fosforilcolina.

Un compuesto de fórmula (I), (II) o (III), o una sal del mismo:

20



como se define en la referencia WO03/011223, tal como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', ER 803022 o 'ER 804057', por ejemplo:



Un derivado de fosfato de aminoalquilglucosaminida, tal como RC-529 [Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278, Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229].

- 5 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvante pueden usarse en la invención:
- (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (documento WO99/11241);
 - (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) (véase el documento 94/00153);
 - 10 (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol;
 - (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un estero) (documento WO98/57659);
 - 15 (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véanse las solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231);
 - (6) SAF, que contiene 10% de escualano, 0,4% de Tween 80, 5% polímero de bloque de Pluronic L121, y thr-MDP, tanto microfluidizada en una emulsión submicrométrica como agitada con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula.
 - 20 (7) sistema de adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); y
 - (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado de LPS no tóxico (tal como 3dPML).
 - 25 (9) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulante (tal como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo de CpG).

Los adyuvantes descritos en este documento pueden añadirse a la composición en diversas etapas durante su producción. Por ejemplo, el adyuvante puede estar dentro de o rodear una composición de antígeno, y esta mezcla

5 puede entonces ser/añadirse a una emulsión de aceite en agua. Como alternativa, el antígeno y/adyuvante pueden estar dentro de una emulsión de aceite en agua, en cuyo caso el agente puede tanto añadirse a los componentes de emulsión antes de la emulsión como puede añadirse a la emulsión después de la emulsión. Similarmente, el agente puede coacervarse dentro de las gotitas de la emulsión. La localización y distribución del adyuvante dentro de la composición final dependerán de sus propiedades hidrófilas/lipófilas, por ejemplo, el agente puede localizarse en la fase acuosa, en la fase aceitosa y/o en la superficie de separación aceite-agua.

10 Además, el adyuvante descrito en este documento puede conjugarse con un agente separado tal como un antígeno (por ejemplo, CRM197) o directamente con cualquier composición susceptible de la presente invención. Una revisión general de técnicas de conjugación para moléculas pequeñas se proporciona en Thompson y col. (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266. Procedimientos de conjugación preferidos implican acoplar directamente mediante aminación reductora o mediante un ligador tal como ácido adípico o escuarato. Como alternativa, los adyuvantes pueden asociarse no covalentemente a agentes adicionales tales como a modo de interacciones hidrófobas o iónicas.

15 La invención también se refiere a procedimientos de administrar las composiciones inmunogénicas de la invención, en los que la composición inmunogénica puede incluir en una realización uno o más adyuvantes y antígenos como se describe en este documento en combinación con un compuesto de fórmula (I) o (II). En algunas realizaciones, la composición inmunogénica se administra al sujeto en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria. La cantidad que constituye una cantidad eficaz depende, entre otras cosas, de la composición inmunogénica particular usada, el compuesto de adyuvante particular que se administra y la cantidad del mismo, la respuesta inmunitaria que va a potenciarse (humoral o mediada por células), el estado del sistema inmunitario (por ejemplo, suprimido, comprometido, estimulado) y el resultado terapéutico deseado. Por consiguiente, no es práctico exponer generalmente la cantidad que constituye una cantidad eficaz de la composición inmunogénica. Sin embargo, aquellos expertos en la materia pueden determinar fácilmente la cantidad apropiada con la debida consideración de tales factores.

25 Las composiciones de la invención pueden administrarse a diversos sujetos animales que incluyen mamíferos tales como sujetos humanos y no humanos que incluyen, por ejemplo, mascotas de bolsillo, aves de corral y similares según procedimientos convencionales muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

30 Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse en la preparación de una vacuna. Vacunas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cualquier material que fomente una cualquiera o ambas respuestas inmunitarias humorales o mediadas por células. Vacunas adecuadas pueden incluir antígenos víricos y bacterianos vivos, y antígenos víricos, derivados de tumor, protozoicos, derivados de organismo, fúngicos y bacterianos inactivados, toxoides, toxinas, polisacáridos, proteínas, glicoproteínas, péptidos y similares, de los cuales se describen numerosos ejemplos a continuación.

Antígenos:

35 Las composiciones de la invención pueden administrarse conjuntamente con uno o más antígenos para su uso en procedimientos terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico de la presente invención. Antígenos preferidos incluyen los enumerados a continuación. Adicionalmente, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir infecciones producidas por cualquiera de los patógenos enumerados a continuación. Además de la combinación con los antígenos descritos a continuación, las composiciones de la invención también pueden combinarse con un adyuvante como se describe en este documento.

Los antígenos para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes antígenos expuestos a continuación, o antígenos derivados de uno o más de los patógenos expuestos a continuación:

A. Antígenos bacterianos

45 Antígenos bacterianos adecuados para uso en la invención incluyen proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos y vesículas de la membrana externa que pueden aislarse, purificarse o derivarse de una bacteria. Además, los antígenos bacterianos pueden incluir lisados bacterianos y formulaciones de bacterias inactivadas. Los antígenos bacterianos pueden producirse por expresión recombinante. Los antígenos bacterianos incluyen preferentemente epítopes que se exponen sobre la superficie de las bacterias durante al menos una fase de su ciclo vital. Los antígenos bacterianos se conservan preferentemente a través de múltiples serotipos. Los antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de una o más de las bacterias expuestas a continuación, además de los ejemplos de antígenos específicos identificados a continuación.

55 *Neisseria meningitidis*: los antígenos de *Meningitidis* pueden incluir proteínas (tales como aquellas identificadas en las referencias 1 - 7), sacáridos (incluyendo un polisacárido, oligosacárido o lipopolisacárido), o vesículas de la membrana externa [Referencias 8, 9, 10, 11] purificadas o derivadas de un serogrupo de *N. meningitidis* tal como A, C, W135, Y y/o B. Los antígenos de proteína de *Meningitidis* pueden seleccionarse de adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de Fe y proteínas asociadas a la membrana (preferentemente proteínas integrales de membrana externa).

- 5 *Streptococcus pneumoniae*: los antígenos de *Streptococcus pneumoniae* pueden incluir un sacárido (incluyendo un polisacárido o un oligosacárido) y/o proteína de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de sacárido pueden seleccionarse de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Los antígenos de proteína pueden seleccionarse, por ejemplo, de una proteína identificada en los documentos WO 98/18931, WO 98/18930, la patente de EE.UU. nº 6.699.703, la patente de EE.UU. nº 6.800.744, los documentos WO 97/43303 y WO 97/37026. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* pueden seleccionarse de la familia Poly Histidine Triad (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncados de CbpX-truncados de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 o Sp133.
- 10 *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A): los antígenos de *Streptococcus* del grupo A pueden incluir una proteína identificada en los documentos WO 02/34771 o WO 2005/032582 (incluyendo GAS 40), fusiones de fragmentos de proteínas GAS M (incluyendo aquellas descritas en el documento WO 02/094851, y Dale, Vaccine (1999) 17:193-200, y Dale, Vaccine 14(10): 944-948), proteína de unión a fibronectina (Sfb1), proteína asociada a hemo estreptocócico (Shp) y estreptolisina S (SagA).
- 15 *Moraxella catarrhalis*: los antígenos de *Moraxella* incluyen antígenos identificados en los documentos WO 02/18595 y WO 99/58562, antígenos de proteína de membrana externa (HMW-OMP), antígeno C y/o LPS.
- Bordetella pertussis*: los antígenos de *Pertussis* incluyen holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3.
- 20 *Staphylococcus aureus*: los antígenos de *Staph. aureus* incluyen polisacáridos capsulares de tipo 5 y 8 de *S. aureus* opcionalmente conjugados con exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante no tóxica tal como StaphVAX™, o antígenos derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, cinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben la asfixia fagocítica (cápsula, proteína A), carotenoides, producción de catalasa, proteína A, coagulasa, factor de coagulación y/o toxinas que dañan la membrana (opcionalmente desintoxicadas) que lisan membranas de células eucariotas (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina).
- 25 *Staphylococcus epidermidis*: los antígenos de *S. epidermidis* incluyen antígeno asociado a ceno (SAA).
- Clostridium tetani* (tétanos): los antígenos del tétanos incluyen toxoide tetánico (TT), usado preferentemente como una proteína portadora junto con/conjugada con las composiciones de la presente invención.
- 30 *Corynebacterium diphtheriae* (difteria): los antígenos de la difteria incluyen toxina diftérica, preferentemente desintoxicados, tales como CRM₁₉₇. Antígenos adicionales que pueden modular, inhibir o asociarse a una ribosilación de ADP se contemplan para la combinación/coadministración/conjugación con las composiciones de la presente invención. Los toxoides de la difteria pueden usarse como proteínas portadoras.
- Haemophilus influenzae B* (Hib): los antígenos de *Hib* incluyen un antígeno de sacárido de Hib.
- 35 *Pseudomonas aeruginosa*: los antígenos de *Pseudomonas* incluyen endotoxina A, proteína Wzz, LPS de *P. aeruginosa*, más particularmente LPS aislada de PAO1 (serotipo O5) y/o proteínas de membrana externa, que incluyen proteínas F de membrana externa (OprF) (Infect Immun. 2001 May; 69(5):3510-3515).
- Legionella pneumophila*: los antígenos bacterianos pueden derivarse de *Legionella pneumophila*.
- 40 *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B): los antígenos de *Streptococcus* del grupo B incluyen un antígeno de proteína o de sacárido identificado en los documentos WO 02/34771, WO 03/093306, WO 04/041157 o WO 2005/002619 (que incluye proteínas GBS 80, GBS 104, GBS 276 y GBS 322, y que incluye antígenos de sacárido derivados de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII).
- 45 *Neisseria gonorrhoeae*: los antígenos de *gonorrhoeae* incluyen proteína Por (o porina) tal como PorB (véase Zhu y col., Vaccine (2004) 22:660 - 669), una proteína de unión a transferrina tal como TbpA y TbpB (véase Price y col., Infection and Immunity (2004) 71(1):277 - 283), una proteína de opacidad (tal como Opa), una proteína modificable por reducción (Rmp) y preparaciones de vesículas de la membrana externa (OMV) (véase Plante y col., J Infectious Disease (2000) 182:848 - 855), véanse también, por ejemplo, los documentos WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280, WO02/079243).
- 50 *Chlamydia trachomatis*: los antígenos de *Chlamydia trachomatis* incluyen antígenos derivados de los serotipos A, B, Ba y C (agentes de tracoma, una causa de ceguera), serotipos L₁, L₂ y L₃ (asociados a linfogranuloma venéreo) y serotipos, D-K. Los antígenos de *Chlamydia trachomatis* también pueden incluir un antígeno identificado en los documentos WO 00/37494, WO 03/049762, WO 03/068811 o WO 05/002619 que incluye PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), ADNK (CT396), CT398, similar a OmpH (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823) y MurG (CT761).
- Treponema pallidum* (sífilis): los antígenos de la sífilis incluyen el antígeno TmpA.
- Haemophilus ducreyi* (que produce chancroide): los antígenos de *Ducreyi* incluyen proteína de membrana externa

(DsrA).

Enterococcus faecalis o *Enterococcus faecium*: los antígenos incluyen una repetición de trisacáridos u otros antígenos derivados de *Enterococcus* proporcionados en la patente de EE.UU. nº 6.756.361.

Helicobacter pylori: los antígenos de *H. pylori* incluyen Cag, Vac, Nap, HopX, HopY y/o antígeno de ureasa.

5 *Staphylococcus saprophyticus*: los antígenos incluyen la hemaglutinina de 160 kDa del antígeno de *S. saprophyticus*.

Yersinia enterocolitica: los antígenos incluyen LPS (Infect Immun. 2002 August; 70(8): 4414).

10 *E. coli*: los antígenos de *E. coli* pueden derivarse de cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Bacillus anthracis (ántrax): los antígenos de *B. anthracis* están opcionalmente desintoxicados y puede seleccionarse de componentes A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), ambos de los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA).

15 *Yersinia pestis* (plaga): los antígenos de plagas incluyen antígeno capsular F1 (Infect Immun. 2003 Jan. 71(1): 374-383, LPS (Infect Immun. 1999 Oct; 67(10): 5395), antígeno V de *Yersinia pestis* (Infect Immun. 1997 Nov; 65(11): 4476-4482).

20 *Mycobacterium tuberculosis*: los antígenos de *Tuberculosis* incluyen lipoproteínas, LPS, antígenos BCG, una proteína de fusión de antígeno 85B (Ag85B) y/o ESAT-6 opcionalmente formulado en vesículas de lípido catiónico (Infect Immun. 2004 October; 72(10): 6148), antígenos asociados a isocitrato deshidrogenasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Aug 24; 101(34): 12652) y/o antígenos de MPT51 (Infect Immun. 2004 July; 72(7): 3829).

Rickettsia: los antígenos incluyen proteínas de membrana externa que incluyen la proteína de membrana externa A y/o B (OmpB) (Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 1;1702(2):145), LPS y antígeno de proteína de superficie (SPA) (J Autoimmun. 1989 Jun; 2 Suppl:81).

25 *Listeria monocytogenes*: los antígenos bacterianos pueden derivarse de *Listeria monocytogenes*.

Chlamydia pneumoniae: los antígenos incluyen aquellos identificados en el documento WO 02/02606.

Vibrio cholerae: los antígenos incluyen antígenos de proteínasa, LPS, particularmente lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos O-específicos O1 Inaba, *V. cholera* O139, antígenos de la vacuna JEM108 (Infect Immun. 2003 Oct;71(10):5498-504) y/o toxina de *Zonula occludens* (Zot).

30 *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea): los antígenos incluyen polisacáridos capsulares preferentemente conjugados (Vi, por ejemplo, vax-TyVi).

35 *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme): los antígenos incluyen lipoproteínas (tales como OspA, OspB, Osp C y Osp D), otras proteínas de superficie tales como proteínas relacionadas con OspE (Erps), proteínas de unión a decorina (tales como DbpA) y proteínas VI antigénicamente variables tales como antígenos asociados a P39 y P13 (una proteína de membrana integral, Infect Immun, 2001 May; 69(5): 3323-3334) y proteína de variación antigénica VlsE J Clin Microbiol. 1999 Dec; 37(12):3997).

Porphyromonas gingivalis: los antígenos incluyen la proteína de membrana externa de *P. Gingivalis* (OMP).

Klebsiella: los antígenos incluyen una OMP, que incluye OMP A, o un polisacárido opcionalmente conjugado con toxoide tetánico.

40 Otros antígenos bacterianos de la invención pueden ser antígenos capsulares, antígenos de polisacárido o antígenos de proteína de cualquiera de los anteriores. Otros antígenos bacterianos también pueden incluir una preparación de vesículas de la membrana externa (OMV). Adicionalmente, los antígenos incluyen versiones vivas, atenuadas y/o purificadas de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas. Los antígenos de la presente invención pueden derivarse de bacterias Gram-negativas o Gram-positivas. Los antígenos de la presente invención
45 pueden derivarse de bacterias aerobias o anaerobias.

50 Adicionalmente, cualquiera de los sacáridos derivados de bacterianos anteriores (polisacáridos, LPS, LOS u oligosacáridos) puede conjugarse con otro agente o antígeno tal como una proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇). Tal conjugación puede ser conjugación directa efectuada por la aminación reductora de restos carbonilo sobre los grupos sacárido con respecto a amino sobre la proteína, como se proporciona en la patente de EE.UU. nº 5.360.897 y Can J Biochem Cell Biol. 1984 May;62(5):270-5. Alternativamente, los sacáridos pueden conjugarse mediante un ligador tal como con succinamida u otros enlaces proporcionados en Bioconjugate Techniques, 1996 y

CRC, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, 1993.

B. Antígenos víricos

Los antígenos víricos adecuados para uso en la invención incluyen virus inactivados (o destruidos), virus atenuados, formulaciones de virus fraccionados, formulaciones de subunidades purificadas, proteínas víricas que pueden aislarse, purificarse o derivarse de un virus, y partículas similares a virus (VLP). Los antígenos víricos pueden derivarse de virus propagados en cultivo celular u otro sustrato. Alternativamente, los antígenos víricos pueden expresarse recombinantemente. Los antígenos víricos incluyen preferentemente epítopes que se exponen sobre la superficie del virus durante al menos una fase de su ciclo vital. Los antígenos víricos se conservan preferentemente a través de múltiples serotipos o cepas aisladas. Los antígenos víricos incluyen antígenos derivados de uno o más de los virus expuestos a continuación, además de los ejemplos de antígenos específicos identificados a continuación.

Ortomixovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un ortomixovirus tal como la gripe A, B y C. Los antígenos de ortomixovirus pueden seleccionarse de una o más de las proteínas víricas que incluyen hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína de membrana (M2), uno o más de los componentes de transcriptasa (PB1, PB2 y PA). Los antígenos preferidos incluyen HA y NA.

Los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas de gripe interpandémica (anuales). Alternativamente, los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas con la posibilidad de producir un brote pandémico (es decir, cepas de gripe con nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en cepas actualmente en circulación, o cepas de gripe que son patógenas en sujetos aviares y tienen la posibilidad de transmitirse horizontalmente en la población humana, o cepas de gripe que son patógenas para seres humanos).

Virus *Paramyxoviridae*: los antígenos víricos pueden derivarse de virus *Paramyxoviridae* tales como pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV) y morbillivirus (sarampión).

Pneumovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un pneumovirus tal como el virus sincicial respiratorio (VSR), virus sincicial respiratorio bovino, virus de la neumonía de ratones y virus de la rinotraqueítis del pavo. Preferentemente, el pneumovirus es VSR. Los antígenos de pneumovirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas que incluyen las proteínas de superficie fusión (F), glucoproteína (G) y proteína hidrófoba pequeña (SH), proteínas de matriz M y M2, proteínas de nucleocápside N, P y L y proteínas no estructurales NS1 y NS2. Los antígenos de pneumovirus preferidos incluyen F, G y M. Véase, por ejemplo, J Gen Virol. 2004 Nov; 85(Pt 11):3229). Los antígenos de pneumovirus también pueden formularse en o derivarse de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus quiméricos VSR/PIV pueden comprender componentes de tanto VSR como PIV.

Paramixovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un paramixovirus tal como los tipos 1 - 4 del virus paragripal (PIV), paperas, virus de Sendai, virus simio 5, virus paragripal bovino y virus de la enfermedad de Newcastle. Preferentemente, el paramixovirus es PIV o paperas. Los antígenos de paramixovirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteínas de fusión F1 y F2, nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de matriz (M). Las proteínas de paramixovirus preferidas incluyen HN, F1 y F2. Los antígenos de paramixovirus también pueden formularse en o derivarse de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus quiméricos VSR/PIV pueden comprender componentes de tanto VSR como PIV. Las vacunas contra la paperas comercialmente disponibles incluyen virus de las paperas atenuado vivo en tanto una forma monovalente como en combinación con vacunas contra el sarampión y la rubeola (MMR).

Morbillivirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un morbillivirus tal como el sarampión. Los antígenos de morbillivirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina (H), glucoproteína (G), factor de fusión (F), proteína grande (L), nucleoproteína (NP), polimerasa fosfoproteína (P) y matriz (M). Las vacunas contra el sarampión comercialmente disponibles incluyen virus del sarampión atenuado vivo, normalmente en combinación con paperas y rubeola (MMR).

Picornavirus: los antígenos víricos pueden derivarse de picornavirus tales como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, cardiovirus y aftovirus. Se prefieren antígenos derivados de enterovirus tales como virus de la poliomielitis.

Enterovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un enterovirus tal como los tipos 1, 2 ó 3 del virus de la poliomielitis, tipos 1 a 22 y 24 del virus Coxsackie A, tipos 1 a 6 del virus Coxsackie B, tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 de ecovirus (virus ECHO) y enterovirus 68 a 71. Preferentemente, el enterovirus es el virus de la poliomielitis. Los antígenos de enterovirus se seleccionan preferentemente de una o más de las siguientes proteínas de cápside VP1, VP2, VP3 y VP4. Las vacunas contra la poliomielitis comercialmente disponibles incluyen vacuna contra la poliomielitis inactivada (IPV) y vacuna oral contra el virus de la poliomielitis (OPV).

Heparnavirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un heparnavirus tal como virus de la hepatitis A (VHA). Las vacunas contra el VHA comercialmente disponibles incluyen vacuna contra el VHA inactivado.

Togavirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un togavirus tal como un rubivirus, un alfavirus o un arterivirus. Se prefieren antígenos derivados de rubivirus tales como el virus de la rubeola. Los antígenos de togavirus pueden

seleccionarse de E1, E2, E3, C, NSP-1, NSPO-2, NSP-3 o NSP-4. Los antígenos de togavirus se seleccionan preferentemente de E1, E2 o E3. Las vacunas contra la rubeola comercialmente disponibles incluyen un virus adaptado al frío vivo, normalmente en combinación con vacunas contra las paperas y el sarampión (MMR).

5 *Flavivirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un flavivirus tal como la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), el dengue (tipos 1, 2, 3 ó 4), fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo occidental, encefalitis de San Luis, encefalitis rusa de primavera-verano, encefalitis de Powassan. Los antígenos de flavivirus pueden seleccionarse de PrM, M, C, E, NS-1, NS-2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. Los antígenos de flavivirus se seleccionan preferentemente de PrM, M y E. La vacuna contra la ETG comercialmente disponible incluye vacunas de virus inactivados.

10 *Pestivirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un pestivirus tal como diarrea viral bovina (DVB), peste porcina clásica (PPC) o enfermedad de Border (BDV).

15 *Hepadnavirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un hepadnavirus tal como virus de la hepatitis B. Los antígenos de hepadnavirus pueden seleccionarse de antígenos de superficie (L, M y S), antígenos de núcleo (HBc, HBe). Las vacunas contra el VHB comercialmente disponibles incluyen vacunas de subunidades que comprenden el antígeno de superficie proteína S.

20 *Virus de la hepatitis C*: los antígenos víricos pueden derivarse de un virus de la hepatitis C (VHC) (véase, por ejemplo, Hsu y col. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915). Los antígenos del VHC pueden seleccionarse de uno o más de la poliproteína E1, E2, E1/E2, NS345, poliproteína del núcleo NS 345, núcleo y/o péptidos de las regiones no estructurales (Houghton y col., Hepatology (1991) 14:381). Por ejemplo, los antígenos del virus de la hepatitis C que pueden usarse pueden incluir uno o más de los siguientes: proteínas E1 y o E2 del VHC, complejos heterodiméricos de E1/E2, proteínas del núcleo y proteínas no estructurales, o fragmentos de estos antígenos, en los que las proteínas no estructurales pueden modificarse opcionalmente para eliminar la actividad enzimática, pero retienen la inmunogenicidad (véanse, por ejemplo, los documentos WO03/002065; WO01/37869 y WO04/005473).

25 *Rabdovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un rabdovirus tal como un lyssavirus (virus de la rabia) y vesiculovirus (VSV). Los antígenos de rabdovirus pueden seleccionarse de glucoproteína (G), nucleoproteína (N), proteína grande (L), proteínas no estructurales (NS). Las vacunas contra el virus de la rabia comercialmente disponibles comprenden virus destruidos cultivados en células diploides humanas o células de pulmón rhesus fetal.

Caliciviridae: los antígenos víricos pueden derivarse de Calciviridae tales como virus Norwalk y virus similares a Norwalk tales como el virus de Hawaii y el virus de las montañas nevadas.

30 *Coronavirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un coronavirus, SARS, coronavirus respiratorio humano, bronquitis infecciosa aviar (BIA), virus de la hepatitis del ratón (VHR) y virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT). Los antígenos de coronavirus pueden seleccionarse de glicoproteína de la espícula (S), de la envuelta (E), de matriz (M), de nucleocápside (N) y de hemaglutinina-esterasa (HE). Preferentemente, el antígeno de coronavirus se deriva de un virus de SARS. Los antígenos víricos de SARS se describen en el documento WO 04/92360.

35 *Retrovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un retrovirus tal como un oncovirus, un lentivirus o un espumavirus. Los antígenos de oncovirus pueden derivarse de HTLV-1, HTLV-2 o HTLV-5. Los antígenos de lentivirus pueden derivarse de VIH-1 o VIH-2. Los antígenos de retrovirus pueden seleccionarse de gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpr y vpr. Los antígenos de VIH pueden seleccionarse de gag (p24 gag y p55 gag), env (gp160 y gp41), pol, tat, nef, rev vpr, miniproteínas, (preferentemente p55 gag y gp140v delete). Los antígenos de VIH pueden derivarse de una o más de las siguientes cepas: VIH_{IIIb}, VIH_{SF2}, VIH_{LAV}, VIH_{LAI}, VIH_{MN}, VIH-1_{CM235}, VIH-1_{US4}.

45 *Reovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un reovirus tal como un ortoreovirus, un rotavirus, un orbivirus o un coltivirus. Los antígenos de reovirus pueden seleccionarse de proteínas estructurales λ 1, λ 2, λ 3, μ 1, μ 2, σ 1, σ 2, o σ 3, o proteínas no estructurales σ NS, μ NS o σ 1s. Los antígenos de reovirus preferidos pueden derivarse de un rotavirus. Los antígenos de rotavirus pueden seleccionarse de VP1, VP2, VP3, VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8), NSP 1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4 o NSP5. Los antígenos de rotavirus preferidos incluyen VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8) y VP7.

50 *Parvovirus*: los antígenos víricos pueden derivarse de un parvovirus tal como el parvovirus B19. Los antígenos de parvovirus pueden seleccionarse de VP-1, VP-2, VP-3, NS-1 y NS-2. Preferentemente, el antígeno de parvovirus es la proteína de la cápside VP-2.

Virus de la hepatitis delta (VHD): los antígenos víricos pueden derivarse de VHD, particularmente el antígeno δ del VHD (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.378.814).

Virus de la hepatitis E (VHE): los antígenos víricos pueden derivarse de VHE.

Virus de la hepatitis G (VHG): los antígenos víricos pueden derivarse de VHG.

Virus del herpes humano: los antígenos víricos pueden derivarse de un virus del herpes humano tal como el virus del herpes simple (VHS), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano 6 (VHH6), virus del herpes humano 7 (VHH7) y virus del herpes humano 8 (VHH8). Los antígenos del virus del herpes humano pueden seleccionarse de proteínas inmediatas tempranas (α), proteínas tempranas (β) y proteínas tardías (γ). Los antígenos del VHS pueden derivarse de cepas de VHS-1 o VHS-2. Los antígenos del VHS pueden seleccionarse de glicoproteínas gB, gC, gD y gH, proteína de fusión (gB) o proteínas de inmunoescape (gC, gE o gI). Los antígenos del VVZ pueden seleccionarse de proteínas de núcleo, de nucleocápside, del tegumento o de la envuelta. Una vacuna contra el VVZ atenuado vivo está comercialmente disponible. Los antígenos del VEB pueden seleccionarse de proteínas de antígeno temprano (EA), antígeno de la cápside viral (VCA) y glicoproteínas del antígeno de membrana (MA). Los antígenos de CMV pueden seleccionarse de proteínas de la cápside, glicoproteínas de la envuelta (tales como gB y gH) y proteínas del tegumento

Papovavirus: los antígenos pueden derivarse de papovavirus tales como el virus del papiloma y el virus del polioma. Los virus del papiloma incluyen los serotipos de VPH 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 y 65. Preferentemente, los antígenos del VPH se derivan de los serotipos 6, 11, 16 ó 18. Los antígenos del VPH pueden seleccionarse de proteínas de la cápside (L1) y (L2), o E1 - E7, o fusiones de las mismas. Los antígenos del VPH se formulan preferentemente en partículas similares a virus (VLP). Los virus del polioma incluyen virus BK y virus JK. Los antígenos del virus del polioma pueden seleccionarse de VP 1, VP2 o VP3.

Adicionalmente se proporcionan antígenos, composiciones, procedimientos y microbios incluidos en Vaccines, 4ª edición (Plotkin y Orenstein ed. 2004); Medical Microbiology 4ª edición (Murray y col. ed. 2002); Virology, 3ª edición (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª edición (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds. 1991), que se contemplan conjuntamente con las composiciones de la presente invención.

C. Antígenos fúngicos

Los antígenos fúngicos para uso en la invención pueden derivarse de uno o más de los hongos expuestos a continuación.

Los antígenos fúngicos pueden derivarse de dermatofitos, que incluyen: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouini*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypsum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. album, var. discoides, var. ochraceum, *Trichophyton violaceum* y/o *Trichophyton faviforme*

Los patógenos fúngicos pueden derivarse de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiosperum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffeii*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp, *Mortierella* spp, *Cunninghamella* spp, *Saksenaea* spp., *Alternaria* spp, *Curvularia* spp, *Helminthosporium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Monolinia* spp, *Rhizoctonia* spp, *Paecilomyces* spp, *Pithomyces* spp. y *Cladosporium* spp.

Los procedimientos para producir un antígeno fúngico son muy conocidos en la técnica (véase la patente de EE.UU. nº 6.333.164). En un procedimiento preferido, una fracción solubilizada se extrae y se separa de una fracción insoluble que puede obtenerse a partir de células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular, caracterizado porque el procedimiento comprende las etapas de: obtener células fúngicas vivas; obtener células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular; romper las células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular; obtener una fracción insoluble; y extraer y separar una fracción solubilizada de la fracción insoluble.

D. Antígenos de ETS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos derivados de una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Tales antígenos pueden proporcionar profilaxis o terapia para ETS tales como clamidia, herpes genital, hepatitis (tal como VHC), condilomas acuminados, gonorrea, sífilis y/o chancroide (véase el documento WO00/15255). Los antígenos pueden derivarse de una o más ETS bacterianas o víricas. Los antígenos de ETS víricas para uso en la invención pueden derivarse de, por ejemplo, VIH, virus del herpes simple (VHS-1 y VHS-2), virus del papiloma humano (VPH) y hepatitis (VHC). Los antígenos de ETS bacterianas para uso en la invención pueden derivarse de, por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*,

Haemophilus ducreyi, *E. coli* y *Streptococcus agalactiae*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

E. Antígenos respiratorios

5 Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos derivados de un patógeno que produce enfermedad respiratoria. Por ejemplo, antígenos respiratorios pueden derivarse de un virus respiratorio tal como ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV), morbillivirus (sarampión), togavirus (rubeola), VVZ y coronavirus (SARS). Los antígenos respiratorios pueden derivarse de una bacteria que produce enfermedad respiratoria tal como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Moraxella catarrhalis*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

F. Antígenos de vacunas pediátricas

15 Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en sujetos pediátricos. Los sujetos pediátricos tienen normalmente menos de aproximadamente 3 años, o menos de aproximadamente 2 años, o menos de aproximadamente 1 año. Los antígenos pediátricos pueden administrarse múltiples veces durante el transcurso de 6 meses, 1, 2 ó 3 años. Los antígenos pediátricos pueden derivarse de un virus que puede elegir como diana poblaciones pediátricas y/o un virus al que las poblaciones pediátricas son susceptibles de ser infectadas. Los antígenos víricos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y paperas), morbillivirus (sarampión), togavirus (rubeola), enterovirus (poliomielitis), VHB, coronavirus (SARS) y virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB). Los antígenos bacterianos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B) y *E. coli*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

25 G. Antígenos adecuados para uso en ancianos o individuos inmunocomprometidos

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en ancianos o individuos inmunocomprometidos. Tales individuos pueden necesitar ser vacunados más frecuentemente, con mayores dosis o con formulaciones complementarias para mejorar su respuesta inmunitaria a los antígenos elegidos como diana. Los antígenos que pueden elegirse como diana para uso en ancianos o individuos inmunodeprimidos incluyen antígenos derivados de uno o más de los siguientes patógenos: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pilori*, *Chlamydia pneumoniae*, ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y paperas), morbillivirus (sarampión), togavirus (Rubeola), enterovirus (polio), VHB, coronavirus (SARS), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV). Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

H. Antígenos adecuados para uso en vacunas para adolescentes

40 Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en sujetos adolescentes. Los adolescentes pueden estar en necesidad de un refuerzo de un antígeno pediátrico previamente administrado. Los antígenos pediátricos que pueden ser adecuados para uso en adolescentes se han descrito anteriormente. Además, los adolescentes pueden elegirse como diana para recibir antígenos derivados de un patógeno de ETS con el fin de garantizar inmunidad protectora o terapéutica antes del comienzo de la actividad sexual. Los antígenos de ETS que pueden ser adecuados para uso en adolescentes se han descrito anteriormente.

I. Antígenos tumorales

50 Una realización de la presente invención implica un antígeno tumoral o antígeno de cáncer junto con las composiciones de la presente invención. Los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales que contienen péptidos tales como un antígeno tumoral de polipéptido o antígenos tumorales de glicoproteína. Un antígeno tumoral también puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral que contiene sacárido tal como un antígeno tumoral de glicolípidos o un antígeno tumoral de gangliósido. El antígeno tumoral puede ser adicionalmente, por ejemplo, un antígeno tumoral que contiene polinucleótido que expresa un antígeno tumoral que contiene polipéptido, por ejemplo, una construcción de vector de ARN o una construcción de vector de ADN tal como ADN de plásmido.

55 Los antígenos tumorales apropiados para la práctica de la presente invención engloban una amplia variedad de moléculas tales como (a) antígenos tumorales que contienen polipéptidos, incluyendo polipéptidos (que pueden oscilar, por ejemplo, de 8-20 aminoácidos de longitud, aunque también son comunes longitudes fuera de este intervalo), lipopolipéptidos y glicoproteínas, (b) antígenos tumorales que contienen sacáridos, incluyendo

polisacáridos, mucinas, gangliósidos, glicolípidos y glicoproteínas, y (c) polinucleótidos que expresan polipéptidos antigénicos.

5 Los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, (a) moléculas de longitud completa asociadas a células cancerosas, (b) homólogos y formas modificadas de las mismas que incluyen moléculas con porciones delecionadas, añadidas y/o sustituidas, y (c) fragmentos de las mismas. Los antígenos tumorales pueden proporcionarse en forma recombinante. Los antígenos tumorales incluyen, por ejemplo, antígenos limitados a la clase I reconocidos por linfocitos CD8+ o antígenos limitados a la clase II reconocidos por linfocitos CD4+.

10 En la técnica se conocen numerosos antígenos tumorales que incluyen: (a) antígenos de cáncer de testículo tales como los polipéptidos de las familias NY-ESO-1, SSX2, SCP1, además de RAGE, BAGE, GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 y MAGE-12 (que pueden usarse, por ejemplo, para tratar melanoma, tumores de pulmón, cabeza y cuello, CPCNP, mama, gastrointestinal y vejiga), (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociada a diversos tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal, de pulmón, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociada a, por ejemplo, melanoma, cáncer pancreático y cáncer colorrectal), CDK4 (asociada a, por ejemplo, melanoma), MUM 1 (asociada a, por ejemplo, melanoma), caspasa 8 (asociada a, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociada a, por ejemplo, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta-catenina (asociadas a, por ejemplo, melanoma), TCR (asociada a, por ejemplo, linfoma no Hodgkin de linfocitos T), BCR-abl (asociada a, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), trisafosfato isomerasa, KIA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT, (c) antígenos expresados en exceso, por ejemplo, galectina 4 (asociada a, por ejemplo, cáncer colorrectal), galectina 9 (asociada a, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociada a, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociada a, por ejemplo, diversas leucemias), anhidrasa carbónica (asociada a, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociada a, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociada a, por ejemplo, melanoma), HER-2/neu (asociada a, por ejemplo, cáncer de mama, colon, pulmón y ovario), alfa-fetoproteína (asociada a, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociada a, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociada a, por ejemplo, cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica telomerasa, MUC-1 (asociadas a, por ejemplo, cáncer de mama y de ovario), G-250 (asociada a, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociada a, por ejemplo, cáncer de mama, de colon) y antígeno carcinoembrionario (asociado a, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto gastrointestinal tales como cáncer colorrectal), (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanoma-melanocito tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína 1 relacionada con tirosinasa/TRP1 y proteína 2 relacionada con tirosinasa/TRP2 (asociada a, por ejemplo, melanoma), (e) antígenos asociados a próstata tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados a por ejemplo, cáncer de próstata, (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados a mieloma y linfomas de linfocitos B, por ejemplo), y (g) otros antígenos tumorales tales como antígenos que contienen polipéptidos y sacáridos que incluyen (i) glicoproteínas tales como sialil Tn y sialil Le^x (asociadas a, por ejemplo, cáncer de mama y colorrectal), además de diversas mucinas; las glicoproteínas pueden acoplarse a una proteína portadora (por ejemplo, MUC-1 puede acoplarse a KLH); (ii) lipopolipéptidos (por ejemplo, MUC-1 ligado a un resto de lípido); (iii) polisacáridos (por ejemplo, hexasacárido sintético Globo H) que pueden acoplarse a proteínas portadoras (por ejemplo, a KLH), (iv) gangliósidos tales como GM2, GM12, GD2, GD3 (asociados a, por ejemplo, cáncer cerebral, de pulmón, melanoma), que también pueden acoplarse a proteínas portadoras (por ejemplo, KLH). Antígenos tumorales adicionales que se conocen en la técnica incluyen p 15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MIL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del virus del papiloma humano (VPH) que incluyen E6 y E7, antígenos del virus de la hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de linfocitos T humano, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2/proteína asociada ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS y similares. Éstos, además de otros componentes celulares, se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos 20020007173 y las referencias citadas en su interior.

50 Los antígenos que contienen polinucleótidos según la presente invención comprenden normalmente polinucleótidos que codifican antígenos de cáncer de polipéptidos tales como aquellos enumerados anteriormente. Los antígenos que contienen polinucleótidos preferidos incluyen construcciones de vectores de ADN o ARN tales como vectores de plásmido (por ejemplo, pCMV) que pueden expresar antígenos de cáncer de polipéptidos *in vivo*.

55 Los antígenos tumorales pueden derivarse, por ejemplo, de componentes celulares mutados o alterados. Después de la alteración, los componentes celulares ya no realizan sus funciones reguladoras y, por tanto, la célula puede experimentar un crecimiento incontrolado. Ejemplos representativos de componentes celulares alterados incluyen ras, p53, Rb, proteína alterada codificada por el gen del tumor de Wilms, mucina, proteína codificada por los genes DCC, APC y MCC, además de receptores o estructuras similares a receptores tales como neu, receptor de la hormona tiroidea, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor del factor estimulante de colonias (CSF). Éstos, además de otros componentes celulares, se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.693.522 y las referencias citadas en su interior.

Adicionalmente, los antígenos bacterianos y víricos pueden usarse conjuntamente con las composiciones de la

presente invención para el tratamiento de cáncer. En particular, proteínas portadoras tales como CRM197, toxoide tetánico o antígeno de *Salmonella typhimurium* pueden usarse junto con/conjugarse con compuestos de la presente invención para el tratamiento de cáncer. Las terapias de combinación con antígeno de cáncer mostrarán un aumento de la eficacia y biodisponibilidad en comparación con terapias existentes.

- 5 Información adicional sobre los antígenos de cáncer o de tumor puede encontrarse, por ejemplo, en Moingeon P, "Cancer vaccines", *Vaccine*, 2001, 19:1305-1326; Rosenberg SA, "Progress in human tumor immunology and immunotherapy", *Nature*, 2001, 411:380-384; Dermine, S. y col., "Cancer Vaccines and Immunotherapy", *British Medical Bulletin*, 2002, 62, 149-162; Espinoza-Delgado I., "Cancer Vaccines", *The Oncologist*, 2002, 7(suppl3):20-33; Davis, I.D. y col., "Rational approaches to human cancer immunotherapy", *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 23: 3-29; Van den Eynde B y col., "New tumor antigens recognized by T cells", *Curr. Opin. Immunol.*, 1995, 7:674-81; Rosenberg SA, "Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens", *Immunol. Today*, 1997, 18:175-82; Offringa R y col., "Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer", *Current Opin. Immunol.*, 2000, 2:576-582; Rosenberg SA, "A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens", *Immunity*, 1999, 10:281-7; Sahin U y col., "Serological identification of human tumor antigens", *Curr. Opin. Immunol.*, 1997, 9:709-16; Old LJ y col., "New paths in human cancer serology", *J. Exp. Med.*, 1998, 187:1163-7; Chauv P y col., "Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes", *J. Exp. Med.*, 1999, 189:767-78; Gold P y col., "Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system", *J. Exp. Med.*, 1965, 122:467-8; Livingston PO y col., "Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer: Rationale", *Cancer Immunol. Immunother.*, 1997, 45:1-6; Livingston PO y col., "Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer: Previous experience and future plans", *Cancer Immunol. Immunother.*, 1997, 45:10-9; Taylor-Papadimitriou J, "Biology, biochemistry and immunology of carcinoma-associated mucins", *Immunol. Today*, 1997, 18:105-7; Zhao X-J y col., "GD2 oligosaccharide: target for cytotoxic T lymphocytes", *J. Exp. Med.*, 1995, 182:67-74; Theobald M y col., "Targeting p53 as a general tumor antigen", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92:11993-7; Gaudemack G, "T cell responses against mutant ras: a basis for novel cancer vaccines", *Immunotechnology*, 1996, 2:3-9; documento WO 91/02062; patente de EE.UU. nº 6.015.567; documentos WO 01/08636; WO 96/30514; patente de EE.UU. nº 5.846.538; y patente de EE.UU. nº 5.869.445.

Formulaciones de antígeno

- 30 En otros aspectos de la invención se proporcionan procedimientos de producción de micropartículas que tienen antígenos adsorbidos. Los procedimientos comprenden: (a) proporcionar una emulsión dispersando una mezcla que comprende (i) agua, (ii) un detergente, (iii) un disolvente orgánico y (iv) un polímero biodegradable seleccionado del grupo que está constituido por un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y un policianoacrilato. El polímero está normalmente presente en la mezcla a una concentración de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 30% con respecto al disolvente orgánico, mientras que el detergente está normalmente presente en la mezcla a una relación de detergente con respecto a polímero en peso/peso de aproximadamente 0,00001:1 a aproximadamente 0,1:1 (más normalmente aproximadamente 0,0001:1 a aproximadamente 0,1:1, aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 0,1:1, o aproximadamente 0,005:1 a aproximadamente 0,1:1); (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión; y (c) adsorber un antígeno sobre la superficie de las micropartículas. En ciertas realizaciones, el polímero biodegradable está presente a una concentración de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 10% con respecto al disolvente orgánico.

- Las micropartículas para uso en este documento se formarán a partir de materiales que son esterilizables, no tóxicos y biodegradables. Tales materiales incluyen, sin limitación, poli(α -hidroxiácido), ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, poliortoéster, polianhídrido, PACA y policianoacrilato. Preferentemente, las micropartículas para uso con la presente invención se derivan de un poli(α -hidroxiácido), en particular de una poli(lactida) ("PLA") o un copolímero de D,L-lactida y glicolida o ácido glicólico, tal como una poli(D,L-lactida-co-glicolida) ("PLG" o "PLGA"), o un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Las micropartículas pueden derivarse de cualquiera de diversos materiales de partida poliméricos que tienen una variedad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como PLG, una variedad de relaciones de lactida:glicolida cuya selección será ampliamente un asunto de elección que depende en parte de la macromolécula coadministrada. Estos parámetros se tratan más completamente más adelante.

Otros antígenos también pueden incluir una preparación de vesícula de membrana externa (OMV).

Procedimientos de formulación adicionales y antígenos (especialmente antígenos tumorales) se proporcionan en la patente de EE.UU. nº de serie 09/581772.

- 55 Las composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos descritos en este documento pueden incluir aditivos tales como excipientes. Excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agentes de procesamiento y modificadores y potenciadores de la administración del fármaco tales como, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, monosacáridos, disacáridos, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, dextrosa, hidroxipropil- β -ciclodextrina, polivinilpirrolidona, ceras de bajo punto de fusión, resinas de intercambio iónico y similares, además de combinaciones de dos cualquiera o más de estos. Otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co.,

New Jersey (1991), que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad y para todos los fines como si se expusieran completamente en este documento.

Las composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada para el procedimiento de administración previsto que incluye, por ejemplo, como una disolución, una suspensión o una emulsión. Normalmente se usan vehículos líquidos en la preparación de disoluciones, suspensiones y emulsiones. Los vehículos líquidos contemplados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, disolvente(s) orgánico(s) farmacéuticamente aceptable(s), aceites o grasas farmacéuticamente aceptables y similares, además de mezclas de dos o más de estos. El vehículo líquido puede incluir otros aditivos farmacéuticamente aceptables adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, nutrientes, tampones, conservantes, agentes de suspensión, espesantes, reguladores de la viscosidad, estabilizadores y similares. Disolventes orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, alcoholes monohidroxilados tales como etanol, y alcoholes polihidroxilados tales como glicoles. Aceites adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite de soja, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de alazor, aceite de semilla de algodón y similares. Para administración parenteral, el vehículo puede ser un éster aceitoso tal como oleato de etilo, miristato de isopropilo y similares. Las composiciones de la presente invención también puede estar en forma de micropartículas, microcápsulas y similares, además de combinaciones de dos cualquiera o más de éstos.

Los compuestos y combinaciones de la presente invención también pueden administrarse en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas se derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas se forman por cristales de líquido hidratado mono- o multilaminares que son dispersados en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable que pueda formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposoma pueden incluir, además de un compuesto de la presente invención, estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos incluyen fosfolípidos y fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. En la técnica se conocen procedimientos de formación de liposomas. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.W., pág. 33 y siguientes (1976).

También pueden usarse sistemas de administración de liberación controlada tales como un sistema de matriz de difusión controlada o un sistema erosionable como se describe, por ejemplo, en: Lee, "Diffusion-Controlled Matrix Systems", pág. 155-198 y Ron y Langer, "Erodible Systems", pág. 199-224, en "Treatise on Controlled Drug Delivery", A. Kydonieus Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York 1992. La matriz puede ser, por ejemplo, un material biodegradable que puede degradarse espontáneamente *in situ* e *in vivo*, por ejemplo, por hidrólisis o escisión enzimática, por ejemplo, por proteasas. El sistema de administración puede ser, por ejemplo, un polímero o copolímero que se produce naturalmente o sintético, por ejemplo, en forma de un hidrogel. Polímeros a modo de ejemplo con enlaces escindibles incluyen poliésteres, poliortoésteres, polianhídridos, polisacáridos, poli(fosfoésteres), poliamidas, poliuretanos, poli(imidocarbonatos) y poli(fosfacenos).

Los compuestos de la invención pueden administrarse enteralmente, por vía oral, parenteralmente, sublingualmente, intradérmicamente, por espray de inhalación, rectalmente o tópicamente en formulaciones de unidad de dosificación que incluyen excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales según se desee. Por ejemplo, modos de administración adecuados incluyen oral, subcutánea, transdérmica, transmucosa, iontoforética, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, subdérmica, rectal y similares. La administración tópica también puede incluir el uso de administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis. El término parenteral como se usa en este documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal, o técnicas de infusión.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse según la forma conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable parenteralmente no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-propanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, disolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite no volátil suave que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se usan ácidos grasos tales como ácido oleico.

Los supositorios para administración rectal del fármaco pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado tal como manteca de cacao y polietilenglicoles que son sólidos a temperaturas ordinarias pero líquidos a la temperatura rectal y, por tanto, se fundirán en el recto y liberarán el fármaco.

Las formas de dosificación sólidas para administración por vía oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden incluir, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden incluir agentes de tamponamiento. Los comprimidos y las píldoras pueden prepararse adicionalmente con recubrimientos entéricos.

5 Las formas de dosificación líquidas para administración por vía oral pueden incluir emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes comúnmente usados en la materia tales como agua. Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, ciclodextrinas y agentes edulcorantes, aromatizantes y de perfumado.

Cantidades eficaces de los compuestos de la invención generalmente incluyen cualquier cantidad suficiente para tratar detectablemente los trastornos descritos en este documento.

10 El tratamiento satisfactorio de un sujeto según la invención puede producir una reducción o alivio de síntomas en un sujeto aquejado de un trastorno médico o biológico. Por ejemplo, el tratamiento puede detener la posterior progresión del trastorno o puede prevenir o retardar el desarrollo del trastorno.

15 La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación unitaria variará dependiendo del huésped tratado y del modo de administración particular. Sin embargo, se entenderá que el nivel específico de dosis para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, velocidad de secreción, combinación de fármacos y gravedad de la enfermedad particular que está sometiéndose a terapia. La cantidad terapéuticamente eficaz para una situación dada puede determinarse fácilmente por experimentación rutinaria y está dentro de la habilidad y el juicio del clínico común.

Referencias de antígenos

20 Las siguientes referencias incluyen antígenos útiles conjuntamente con las composiciones de la presente invención:

Las referencias de antígenos se enumeran a continuación:

1. Solicitud de patente internacional WO 99/24578
2. Solicitud de patente internacional WO 99/36544.
3. Solicitud de patente internacional WO 99/57280.
- 25 4. Solicitud de patente internacional WO 00/22430.
5. Tettelin y col. (2000) Science 287:1809-1815.
6. Solicitud de patente internacional WO 96/29412.
7. Pizza y col. (2000) Science 287:1816-1820.
8. Documento PCT WO 01/52885.
- 30 9. Bjune y col. (1991) Lancet 338(8775).
10. Fuskasawa y col. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
11. Rosenqist y col. (1998) Dev. Biol. Strand 92:323-333.
12. Constantino y col. (1992) Vaccine 10:691-698.
13. Constantino y col. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
- 35 14. Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
15. Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285,v.
16. Jedrzejas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
17. Solicitud de patente internacional presentada el 3 de junio de 2001 reivindicando prioridad del documento GB-0016363.4; documento WO 02/02606; documento PCT IB/01/00166.
- 40 18. Kalman y col. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
19. Read y col. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
20. Shirai y col. (2000) J. Infect. Dis 181(Suppl 3):S524-S527.
21. Solicitud de patente internacional WO 99/27105.

22. Solicitud de patente internacional WO 00/27994.
23. Solicitud de patente internacional WO 00/37494.
24. Solicitud de patente internacional WO 99/28475.
25. Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- 5 26. Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
27. Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
28. Hsu y col. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
29. Gastofsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
30. Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- 10 31. *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
32. Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
33. Solicitud de patente internacional WO 93/018150.
34. Solicitud de patente internacional WO 99/53310.
35. Solicitud de patente internacional WO 98/04702.
- 15 36. Ross y col. (2001) *Vaccine* 19:135-142.
37. Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
38. Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
39. Dreensen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
40. *MMWR Morb Mortal Wkly rep* 1998 Jan 16:47(1): 12, 9.
- 20 41. McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
42. Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
43. Solicitudes de patente de GB 0026333.5, 0028727.6 y 0105640.7.
44. Dale (1999) *Infect Disclin North Am* 13:227-43, viii.
45. Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- 25 46. Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
47. Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
48. Lindberg (1999) *Vacuna* 17 Suppl 2:S28-36.
49. Buttery & Moxon (2000) *J R Coil Physicians Long* 34:163-168.
50. Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- 30 51. Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:663-567.
52. Patente europea 0 477 508.
53. Patente de EE.UU. nº 5.306.492.
54. Solicitud de patente internacional WO 98/42721.
55. *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.
- 35 56. Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 012323368 y 012342335X.
57. Solicitud de patente europea 0372501.
58. Solicitud de patente europea 0378881.

59. Solicitud de patente europea 0427347.
 60. Solicitud de patente internacional WO 93/17712.
 61. Solicitud de patente internacional WO 98/58668.
 62. Solicitud de patente europea 0471177.
 5 63. Solicitud de patente internacional WO 00/56360.
 64. Solicitud de patente internacional WO 00/67161.

DEFINICIONES

Como se usa anteriormente y en cualquier parte en este documento, los siguientes términos y abreviaturas tienen los significados definidos a continuación:

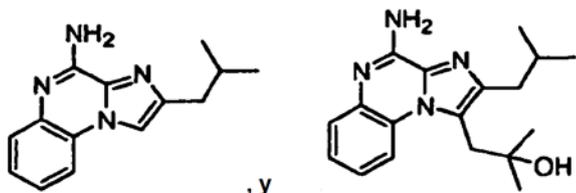
10	AcH	Ácido acético
	ATP	Adenosin trifosfato
	BCG	Bacilo Calmette-Guerin de <i>Mycobacterium bovis</i>
	Bn	Bencilo
	BSA	Albúmina de suero bovino
15	DCM	Diclorometano
	DIEA	N,N-diisopropil-etilamina
	EDG	Clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
	FHA	Hemaglutinina filamentosa
	CG/EM	Cromatografía de gases / espectroscopía de masas
20	<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter Pylori</i>
	VHA	Virus de la hepatitis A
	VHB	Virus de la hepatitis B
	HBr	Bromuro de hidrógeno
	VHC	Virus de la hepatitis C
25	VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
	VHS	Virus del herpes simple
	Valor de CI ₅₀	La concentración de un inhibidor que produce una reducción del 50 % en una actividad medida.
	IFN	Interferón
30	IL	Interleucina
	IMS	Separación inmunomagnética
	VPI	Virus de la poliomielitis inactivada
	CL/EM	Cromatografía líquida / espectroscopía de masas
	LPS	Polisacárido de lípido
35	MAB o mAb	Anticuerpo monoclonal
	Men A	<i>Neisseria meningitidis</i> tipo A
	Men C	<i>Neisseria Meningitidis</i> tipo C

	Men B	<i>Neisseria Meningitidis</i> tipo B
	Men W	<i>Neisseria Meningitidis</i> tipo W
	Men Y	<i>Neisseria Meningitidis</i> tipo Y
	MeOH	Metanol
5	MW	Peso molecular
	NANB	Hepatitis no A, no B
	RMN	Resonancia magnética nuclear
	OMV	Vesícula de membrana externa
	PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
10	PT	Holotoxina de <i>Pertussis</i>
	TA	Temperatura ambiente (25°C)
	SMIP	Inmunopotenciador de molécula pequeña
	tBOK	Terc-butóxido de potasio
	TEA	Trietilamina
15	OTf	Triflato
	THF	Tetrahidrofurano
	CCF	Cromatografía en capa fina y/o cuidados muy especiales
	TMS	Trimetilsililo
	TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa

20 El término "SMIP" se refiere a un compuesto inmunopotenciador de molécula pequeña que incluye compuestos de moléculas pequeñas, generalmente por debajo de aproximadamente MW 800 g/mol, que pueden estimular o modular una respuesta pro-inflamatoria en un paciente. En algunas realizaciones, los compuestos de SMIP pueden estimular células mononucleares de sangre periférica humana para producir citocinas. Más particularmente, los SMIP preferidos incluyen imidazoquinolinas y aquellos compuestos englobados por las fórmulas (I) descritas en este documento, o contenidos dentro de cualquier referencia citada en este documento.

25 El término "SMIS" se refiere a un compuesto inmunosupresor de molécula pequeña que incluye compuestos de moléculas pequeñas, generalmente por debajo de aproximadamente MW 800 g/mol, que pueden suprimir o modular una respuesta inmunitaria en un paciente. En algunas realizaciones, los compuestos de SMIS pueden inhibir la capacidad de células mononucleares de sangre periférica humana para producir citocinas, quimiocinas y/o factores de crecimiento. En otras realizaciones, los compuestos de SMIS pueden inducir la producción de TGF-beta, suprimiendo así una respuesta inmunitaria.

30 Referencia a "imidazoquinoxalinas" (como se refiere a imidazoquinoxalinas de la presente invención) indica los compuestos imidazo[1,2-a]quinoxalinas que tienen la estructura general de fórmula (I) como se describe en este documento. Algunas imidazoquinoxalinas preferidas incluyen el compuesto de fórmula:



35 El término "células cancerosas resistentes al tratamiento" se refiere a líneas de células cancerosas que son resistentes a agentes terapéuticos preexistentes o a pautas de tratamiento que incluyen programas de dosificación prescrita.

Los compuestos para su uso en los procedimientos de la invención son útiles en el tratamiento de "enfermedades

alérgicas”, que pueden llevarse a cabo del mismo modo que los otros procedimientos inmunoterapéuticos descritos en este documento.

5 Un “alérgeno” se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insecto, caspa animal, polvo, esporas fúngicas y fármacos (por ejemplo, penicilina).

“Asma” se refiere a un trastorno del aparato respiratorio caracterizado por inflamación, estrechamiento de las vías respiratorias y aumento de la reactividad de las vías respiratorias a agentes inhalados. El asma se asocia frecuentemente, aunque no exclusivamente, a síntomas atópicos o alérgicos.

10 El término “inhibidor de leucotrieno” incluye cualquier agente o compuesto que inhibe, contiene, retarda o interactúa de otro modo con la acción o actividad de leucotrienos tales como, pero no se limitan a, inhibidores de la 5-lipoxigenasa (“5-LO”), antagonistas de la proteína activadora de 5-lipoxigenasa (“FLAP”) y antagonistas del leucotrieno D4 (“LTD4”).

“Modular” se refiere a inducir o suprimir.

15 “Estimulación inmunitaria”, “respuesta inmunitaria” o “potenciación inmunitaria” se refiere al potenciamiento o activación del sistema inmunitario, que incluye activación humoral o celular, por ejemplo, activación de una célula, tal como una célula asesina (T o NK) o dendrítica del sistema inmunitario, por ejemplo, provocando el aumento en la producción de citocinas de una célula dendrítica que conduce a un potenciamiento global de la defensa del huésped (respuesta inmunitaria).

20 “Modular una respuesta inmunitaria” se refiere a tanto la potenciación inmunitaria como a la supresión inmunitaria como se define en este documento.

Una “composición inmunogénica” se refiere a una composición que puede estimular una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, las “composiciones inmunogénicas” son composiciones que pueden estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica puede modular la producción de citocinas en un sujeto, efectuándose así la potenciación inmunitaria en ese sujeto.

25 “Supresión inmunitaria” o “inmunosupresión” se refiere a la desactivación del sistema inmunitario, por ejemplo, prevención o reducción de la producción de citocinas a partir de una célula dendrítica que conduce a una atenuación global de la defensa del huésped (respuesta inmunitaria).

30 Una “cantidad eficaz inmunoestimulante” es una cantidad eficaz para activar el sistema inmunitario, por ejemplo, provocando un aumento en la producción de citocinas de una célula dendrítica que conduce a un potenciamiento global de la defensa del huésped (respuesta inmunitaria).

35 “Potenciar la respuesta inmunitaria a un antígeno” por un compuesto se refiere al potenciamiento de la respuesta inmunitaria en comparación con la respuesta en ausencia del compuesto. Una composición que provoca una respuesta inmunitaria potenciada es una composición que generalmente comprende un antígeno y un compuesto de potenciador inmunitario de molécula pequeña que provoca una respuesta inmunitaria mayor que una composición que comprende un antígeno y que no contiene uno o más compuestos de potenciador inmunitario de molécula pequeña. En tales realizaciones, el compuesto actúa de adyuvante, por ejemplo, para su uso en composiciones de vacuna y procedimientos.

40 Una “enfermedad asociada a proliferación celular” incluye, pero no se limita a, neurofibromatosis, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, psoriasis, glomerulonefritis, reestenosis, retinopatía diabética proliferativa (RDP), formación de cicatrices hipertróficas, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de trasplante, angiogénesis y choque endotóxico.

45 El término “cantidad eficaz” es una cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un compuesto para tratar un trastorno infeccioso puede ser una cantidad necesaria para producir una respuesta inmunitaria específica para antígeno tras la exposición a un agente infeccioso. La cantidad eficaz puede variar dependiendo, por ejemplo, de la afección tratada, el peso del sujeto y la gravedad de la enfermedad. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad eficaz empíricamente sin demasiada experimentación.

50 Como se usa en este documento “una cantidad eficaz para el tratamiento” se refiere a una cantidad suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, invertir, ralentizar o retrasar la progresión de una afección tal como un estado de enfermedad.

Referencia a “administración metronómica” o “administrado metronómicamente” se refiere a pautas de dosificación cada vez más frecuentes, a menores concentraciones de fármaco, en comparación con pautas de dosificación conocidas para un agente terapéutico existente. La administración metronómica varía de la dosificación típica de fármacos citotóxicos, que implica la administración episódica (menos frecuentes) a dosis toleradas máximas (MTD).

55 Un “sujeto” o “paciente” indica que describe un animal humano o vertebrado que incluye un perro, gato, mascota de bolsillo, mono tífi, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, elefante, jirafa, pollo, león, mono, búho, rata, ardilla, loris

esbelto y ratón.

Una "mascota de bolsillo" se refiere a un grupo de animales vertebrados que pueden acomodarse en una amplia bolsa de recubrimiento tal como, por ejemplo, hámsteres, chinchillas, hurones, ratas, cobayas, jerbos, conejos y petauros del azúcar. Otra descripción se proporciona por Mackay, B., Pocket Pets, Animal Issues, 32(1) 2001.

- 5 Como se usa en este documento, el término "éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a ésteres que se hidrolizan *in vivo* e incluyen aquellos que se descomponen fácilmente en el cuerpo humano para abandonar el compuesto parental o una sal del mismo. Grupos éster adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos derivados de ácidos carboxílicos alifáticos farmacéuticamente aceptables, particularmente ácidos alcanóicos, alquenoicos, cicloalcanóicos y alcanodioicos, en los que cada resto alquilo o alquenoilo no tiene ventajosamente más de 6 átomos de carbono. Ejemplos representativos de ésteres particulares incluyen, pero no se limitan a, formiatos, acetatos, propionatos, butiratos, acrilatos y etilsuccinatos.

15 Los compuestos de la presente invención pueden usarse en forma de sales como en "sales farmacéuticamente aceptables" derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos. Estas sales incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naptalensulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, sulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Por tanto, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo; dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga tal como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. Así se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite.

El símbolo  indica el punto de unión de un apéndice.

- 25 Referencia a "halógeno", "haluro" o "halógeno" se refiere a átomos de F, Cl, Br o I, especialmente F, Cl y Br.

El término "alquilo" se refiere a grupos tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo y similares. La frase "alquilo C₁₋₆" tiene el mismo significado que alquilo, excepto que se limita a grupos alquilo de seis carbonos o menos. La frase alquilo C₁₋₆ también incluye isómeros de cadena ramificada de grupos alquilo de cadena lineal que incluyen, pero no se limitan a, los siguientes que se proporcionan a modo de ejemplo: -CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH(CH₂CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH₂CH(CH₂CH₃)₂, -CH₂C(CH₃)₃, -CH(CH₃)CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH₂CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₂CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH₂CH₂C(CH₃)₃, -CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)CH(CH₃)CH(CH₃), y otros. El término alquilo C₁₋₆ incluye adicionalmente grupos alquilo cíclicos o cicloalquilo C₃₋₆ tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y tales anillos sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal y ramificada como se definen anteriormente. La frase alquilo también incluye grupos alquilo policíclicos tales como, pero no se limitan a, adamantilo, norbornilo y biciclo[2.2.2]octilo, y tales anillos sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal y ramificada como se definen anteriormente.

El término "arilo" se refiere a grupos que no contienen heteroátomos. El término "arilo C₆₋₁₀" tiene el mismo significado que arilo, excepto que se limita a grupos arilo de seis a diez átomos de carbono. El término arilo incluye, pero no se limita a, grupos tales como fenilo, bifenilo y naftilo a modo de ejemplo. Grupos arilo también incluyen aquellos en los que uno de los carbonos aromáticos está unido a un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo como se define en este documento. Esto incluye disposiciones de enlace en las que dos átomos de carbono de un grupo arilo están unidos a dos átomos de un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo para definir un sistema de anillo fusionado (por ejemplo, dihidronaftilo o tetrahidronaftilo). Por tanto, el término "arilo" incluye, pero no se limita a, tolilo e hidroxifenilo, entre otros.

El término "alquenoilo" se refiere a grupos de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos tales como aquellos descritos con respecto a grupos alquilo como se definen anteriormente, excepto que al menos existe un doble enlace entre dos átomos de carbono. El término "alquenoilo C₂₋₆" tiene el mismo significado que alquenoilo, excepto que se limita a grupos alquenoilo de dos a seis carbonos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vinilo, -CH=C(H)(CH₃), -CH=C(CH₃)₂, -C(CH₃)=C(H)₂, -C(CH₃)=C(H)(CH₃), -C(CH₂CH₃)=CH₂, ciclohexenilo, ciclopentenilo, ciclohexadienilo, butadienilo, pentadienilo, hexadienilo y similares.

El término "alcoxi" se refiere a grupos que tienen la fórmula -O-alquilo en la que el punto de unión es el grupo oxi y el grupo alquilo es como se define anteriormente. El término "alcoxi C₁₋₆" tiene el mismo significado que alcoxi, excepto que se limita a grupos alcoxi que tienen de uno a seis átomos de carbono.

- 55 El término "ariloxi" se refiere a grupos que tienen la fórmula -O-arilo en la que el punto de unión es el grupo oxi y el grupo arilo es como se define anteriormente. El término "ariloxi C₆₋₁₀" tiene el mismo significado que ariloxi, excepto que se limita a grupos ariloxi de seis a diez átomos de carbono.

El término "alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos éter con hasta 12 átomos de carbono. Un ejemplo de un grupo

alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆ es -CH₂-O-CH₂CH₃.

El término "ariloxi C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos éter arílico de 16 átomos de carbono o menos, especialmente de 10 átomos de carbono o menos, unidos al grupo alquilo C₁₋₆. Un ejemplo de un grupo ariloxi C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₆ es propoxibenceno.

- 5 El término "aril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos arilalquilo de 16 átomos de carbono o menos, especialmente de 10 átomos de carbono o menos, unidos al grupo alquilo C₁₋₆. Un ejemplo de un grupo aril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₆ es tolueno.

El término "amino" se refiere a NH₂.

- 10 El término "alquinilo" se refiere a grupos de cadena lineal y ramificada tales como aquellos descritos con respecto a grupos alquilo como se definen anteriormente, excepto que existe al menos un triple enlace entre dos átomos de carbono. El término "alquinilo C₂₋₆" tiene el mismo significado que alquinilo, excepto que se limita a grupos alquinilo de dos a seis carbonos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, -C≡C(H), -C≡C(CH₃), -C≡C(CH₂CH₃), -C(H)₂C≡C(H), -C(H)₂C≡C(CH₃), -C(H)₂C≡C(CH₂CH₃), y similares.

- 15 El término "trihalometilo" se refiere a un grupo metilo en el que los tres átomos de H del grupo metilo están sustituidos con tres halógenos que puede ser iguales o distintos. Un ejemplo de un grupo tal es un grupo -CF₃ en el que los tres átomos de H del grupo metilo están sustituidos con átomos de F.

Para aclaración, -CH₂C(CH₃)₂(OH) se refiere a 2-metilpropan-2-ol o terc-butanol.

- 20 El término "heterociclilo" se refiere tanto a compuestos de anillo aromáticos como no aromáticos que incluyen compuestos de anillo monocíclico, bicíclico y policíclico tales como, pero no se limitan a, quinuclidilo, que contiene 3 o más miembros de anillo de los que uno o más es un heteroátomo tal como, pero no se limita a, N, O y S. Ejemplos de grupos heterociclilo incluyen, pero no se limitan a: anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen 1 a 4 átomos de nitrógeno tales como, pero no se limitan a, pirrolilo, pirrolinilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, dihidropiridilo, pirimidilo, pirazinilo, piridazinilo, triazolilo (por ejemplo, 4H-1,2,4-triazolilo, 1H-1,2,3-triazolilo, 2H-1,2,3-triazolilo, etc.), tetrazolilo (por ejemplo, 1H-tetrazolilo, 2H tetrazolilo, etc.); anillos de 3 a 8 miembros saturados que contienen 1 a 4 átomos de nitrógeno tales como, pero no se limitan a, pirrolidinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo; grupos heterocíclicos insaturados condensados que contienen 1 a 4 átomos de nitrógeno tales como, pero no se limitan a, indolilo, isoindolilo, indolinilo, indolizinilo, bencimidazolilo, quinolilo, isoquinolilo, indazolilo, benzotriazolilo; anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno tales como, pero no se limitan a, furanilo; anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no se limitan a, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo (por ejemplo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, etc.); anillos de 3 a 8 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no se limitan a, morfolinilo; grupos heterocíclicos condensados insaturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno, por ejemplo, benzoxazolilo, benzoxadiazolilo, benzoxazinilo (por ejemplo, 2H-1,4-benzoxazinilo, etc.); anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen 1 a 3 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no se limitan a, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo (por ejemplo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, etc.); anillos de 3 a 8 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no se limitan a, tiazolidinilo; anillos de 3 a 8 miembros saturados e insaturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre tales como, pero no se limitan a, tienilo, dihidroitiinilo, dihidroditionilo, tetrahidrotiofeno, tetrahidrotiopirano; anillos heterocíclicos condensados insaturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no se limitan a, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzotiazinilo (por ejemplo, 2H-1,4-benzotiazinilo, etc.), dihidrobenzotiazinilo (por ejemplo, 2H-3,4-dihidrobenzotiazinilo, etc.), anillos heterocíclicos condensados insaturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno tales como benzodioxolilo (por ejemplo, 1,3-benzodioxilo, etc.); anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen un átomo de oxígeno y 1 a 2 átomos de azufre tales como, pero no se limitan a, dihidrooxatiinilo; anillos de 3 a 8 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 2 átomos de azufre tales como 1,4-oxatiano; anillos condensados insaturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre tales como benzotienilo, benzoditiinilo; y anillos heterocíclicos condensados insaturados que contienen un átomo de oxígeno y 1 a 2 átomos de oxígeno tales como benzoxatiinilo. Grupo heterociclilo también incluyen aquellos descritos anteriormente en los que uno o más átomos de S en el anillo están unidos por un doble enlace a uno o dos átomos de oxígeno (sulfóxidos y sulfonas). Por ejemplo, grupos heterociclilo incluyen tetrahidrotiofeno, óxido de tetrahidrotiofeno y 1,1-dióxido de tetrahidrotiofeno. Grupos heterociclilo preferidos contienen 5 ó 6 miembros de anillo. Grupos heterociclilo más preferidos incluyen morfolina, piperazina, piperidina, pirrolidina, imidazol, pirazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, tetrazol, tiomorfolina, tiomorfolina en la que el átomo de S de la tiomorfolina está unido a uno o más átomos de O, pirrol, homopiperazina, oxazolidin-2-ona, pirrolidin-2-ona, oxazol, quinuclidina, tiazol, isoxazol, furano y tetrahidrofurano. "Heterociclilo" también se refiere a aquellos grupos que se han definido anteriormente en los que uno de los miembros de anillo está unido a un átomo de no hidrógeno tal como se ha descrito anteriormente con respecto a grupos alquilo sustituidos y grupos arilo sustituidos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, 2-metilbencimidazolilo, 5-metilbencimidazolilo, 5-clorobenzotiazolilo, 1-metilpiperazinilo y 2-cloropiridilo, entre otros. Grupos heterociclilo son aquellos limitados a tener 2 a 15 átomos de carbono y hasta 6 heteroátomos adicionales como se ha descrito anteriormente. Los grupos heterociclilo más preferidos tienen de 3 a 5 átomos de carbono y hasta 2 heteroátomos. Los grupos heterociclilo más preferidos incluyen grupos piperidinilo,

pirrolidinilo, azetidínilo y aziridinilo.

El término "sustituido" se refiere a la sustitución de uno o más átomos de hidrógeno con un radical monovalente o divalente. Grupos de sustitución adecuados incluyen, por ejemplo, hidroxilo, nitro, amino, imino, ciano, halógeno, tio, tioamido, amidino, imidino, oxo, oxamidino, metoxamidino, imidino, guanidino, sulfonamido, carboxilo, formilo, alquilo, heterocíclico, arilo, haloalquilo, alcoxi, alcoxialquilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alquiltio, aminoalquilo, alquilamino, cianoalquilo y similares. Por ejemplo, un "alquilo C₁₋₆ sustituido" preferido es terc-butanol. Otros grupos alquilo C₁₋₆ sustituidos preferidos incluyen grupos alcoxialquilo (es decir, grupos de fórmula -alquil-O-alquilo) y -CH₂C(CH₂)₂NH-SO₂CH₃

El grupo de sustitución puede estar sustituido por sí mismo una vez. Por ejemplo, un sustituyente alcoxi de un grupo alquilo puede estar sustituido con un halógeno, y grupo oxo, un grupo arilo, o similares. El grupo sustituido en el grupo de sustitución puede ser carboxilo, halógeno, nitro, oxo, amino, ciano, hidroxilo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, arilo C₆₋₁₀, aminocarbonilo, -SR, tioamido, -SO₃H, -SO₂R o cicloalquilo en las que R es normalmente hidrógeno, hidroxilo o alquilo C₁₋₆.

Si el sustituyente sustituido incluye un grupo de cadena lineal, la sustitución puede producirse tanto dentro de la cadena (por ejemplo, 2-hidroxipropilo, 2-aminobutilo y similares) como en el extremo de la cadena (por ejemplo, 2-hidroxietilo, 3-cianopropilo y similares). Los sustituyentes sustituidos pueden ser disposiciones de cadena lineal, ramificadas o cíclicas de átomos de carbono o heteroátomos covalentemente unidos.

El término "protegido" o un "grupo protector" con respecto a grupos hidroxilo, grupos amina y grupos sulfhidrilo se refiere a formas de estas funcionalidades que se protegen de la reacción no deseable con un grupo protector conocido para aquellos expertos en la materia tales como aquellos expuestos en Protective Groups in Organic Synthesis, Greene, T.W., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (1ª edición, 1981) que pueden añadirse o quitarse usando los procedimientos expuestos en su interior. Ejemplos de grupos hidroxilo protegidos incluyen, pero no se limitan a, éteres silílicos tales como aquellos obtenidos haciendo reaccionar un grupo hidroxilo con un reactivo tal como, pero no se limita a, t-butildimetil-clorosilano, trimetilclorosilano, triisopropilclorosilano, trietilclorosilano; éteres metílicos y etílicos sustituidos tales como, pero no se limitan a, éter metoximetílico, éter metitiotmetílico, éter benciloximetílico, éter t-butoximetílico, éter 2-metoxietoximetílico, éteres de tetrahidropirano, éter 1-etoxietílico, éter alílico, éter bencílico; ésteres tales como, pero no se limitan a, formiato de benzoílo, formiato, acetato, tricloroacetato y trifluoroacetato. Ejemplos de grupos amina protegidos incluyen, pero no se limitan a, bencilo o dibencilo, amidas tales como formamida, acetamida, trifluoroacetamida y benzamida; imidas tales como ftalimida y ditiosuccinimida; y otros. En algunas realizaciones, un grupo protector para aminas es un grupo bencilo. Ejemplos de grupos sulfhidrilo protegidos incluyen, pero no se limitan a, tioéteres tales como tioéter de S-bencilo y tioéter de S-4-picolilo; derivados de S-metilo sustituidos tales como hemitio, ditio y aminotioacetales; y otros.

Los compuestos de imidazoquinoxalina de fórmula (I) o (II) y análogos de los mismos pueden presentar el fenómeno de tautomería, y los dibujos de las fórmulas dentro de esta memoria descriptiva pueden representar sólo una de las posibles formas tautómeras. Debe entenderse que la invención engloba cualquier forma tautómera que posea actividad inmunomoduladora y que no va a limitarse simplemente a una forma tautómera cualquiera utilizada dentro de los dibujos de las fórmulas.

Las imidazoquinoxalinas de fórmula (I) también pueden existir en formas solvatadas, además de sin solvatar, tales como, por ejemplo, formas hidratadas. La invención engloba tanto formas solvatadas como sin solvatar que poseen actividad inmunomoduladora.

La invención también incluye compuestos de imidazoquinoxalina isotópicamente marcados y análogos de los mismos que son estructuralmente idénticos a los desvelados anteriormente, excepto que uno o más átomos están sustituidos con un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico normalmente encontrado en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro tales como ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ¹⁸F y ³⁶Cl, respectivamente. Los compuestos de la presente invención, tautómeros de los mismos, profármacos de los mismos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos y de los profármacos que contienen los isótopos anteriormente mencionados y/u otros isótopos de otros átomos están dentro del alcance de la presente invención. Ciertos compuestos isotópicamente marcados de la presente invención, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ³H y ¹⁴C, son útiles en ensayos de distribución en tejido de fármaco y/o sustrato. Los isótopos tritados, es decir, ³H, y de carbono 14, es decir, ¹⁴C, son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir, ²H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, aumento de la semivida *in vivo* o reducción de los requisitos de dosificación y, de ahí que puedan preferirse en algunas circunstancias. Los compuestos isotópicamente marcados de la presente invención y los profármacos de los mismos pueden prepararse generalmente llevando a cabo procedimientos conocidos o de referencia y sustituyendo un reactivo isotópicamente marcado fácilmente disponible con un reactivo no isotópicamente marcado.

Lo anterior puede entenderse mejor por referencia a los siguientes ejemplos que se presentan para ilustración y no para limitar el alcance de los conceptos inventivos. Los compuestos de ejemplo y sus análogos se sintetizan

fácilmente por un experto en la materia a partir de los procedimientos descritos en este documento, además de en patentes o solicitudes de patente enumeradas en este documento que todas se incorporan por este documento por referencia en sus totalidades y para todos los fines como si se expusieran completamente en este documento.

Ejemplos

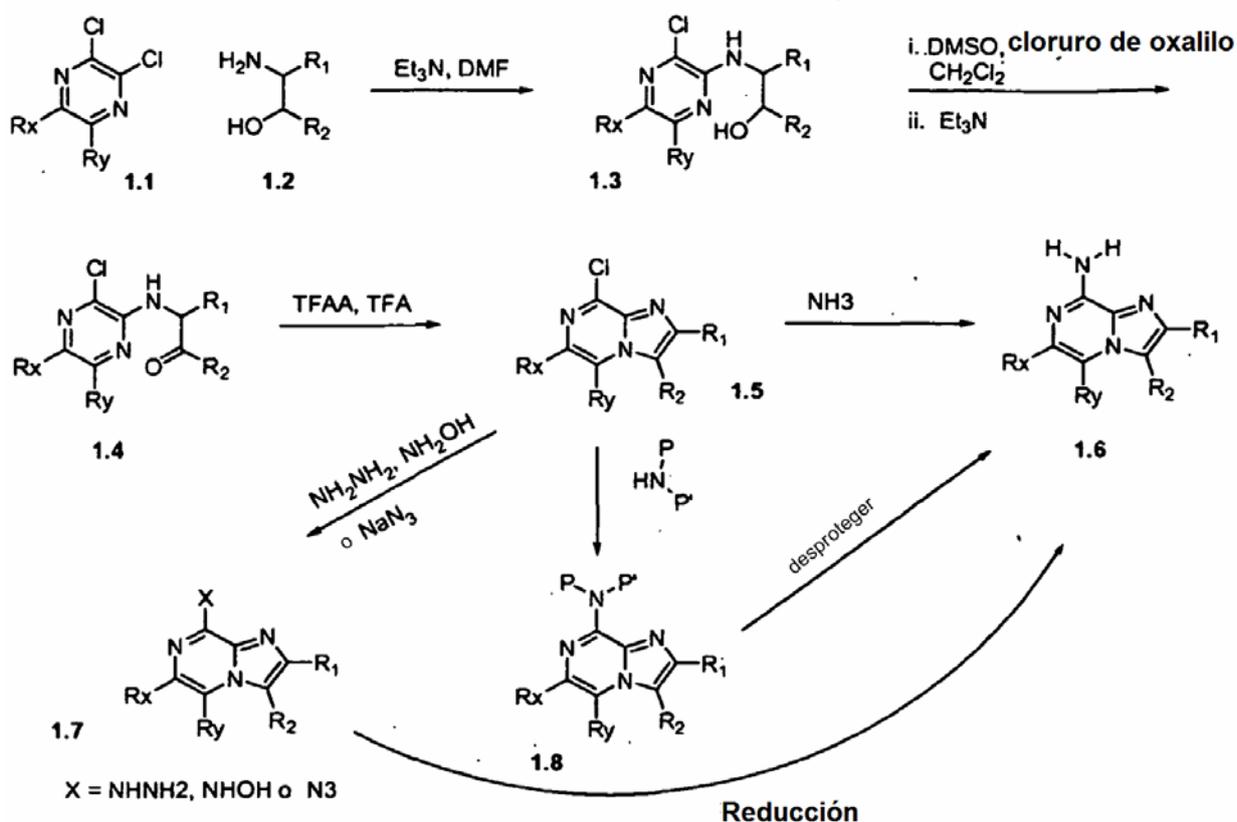
- 5 Los compuestos de las realizaciones pueden prepararse generalmente usando varios procedimientos familiares para un experto en la materia tales como, por ejemplo, los procedimientos desvelados en las publicaciones de bibliografía "Imidazo[1,2-a]quinoxalines: synthesis and cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory activity". Stephanie Parra y col. European Journal of Medicinal Chemistry, 2001, 36, páginas 255-264; "Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-alkylamino-1-hydroxymethylimidazo[1,2-a]quinoxalines as adenosine A1 receptor antagonists". Chun-He Liu y col. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2004, 12, páginas 4701-4707; "Design and synthesis of novel imidazo[1,2-a]quinoxalines as PDE4 inhibitors". Carine Deleuze-Masquefa y col. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2004, 12, páginas 1129-1139; y referencias en su interior. Los compuestos de las realizaciones pueden prepararse generalmente según los siguientes Esquemas de reacción 1-2 que se describen en detalle a continuación.

15 Ejemplo 1

Rutas de preparación generales para la síntesis de los compuestos de la invención seleccionados

Los Esquemas 1-2 ilustran procedimientos generales para la preparación de productos intermedios y compuestos de las realizaciones. Estos compuestos se preparan a partir de materiales de partida tanto conocidos en la técnica como comercialmente disponibles. Los compuestos específicos sólo son para fines ilustrativos.

Esquema 1



20

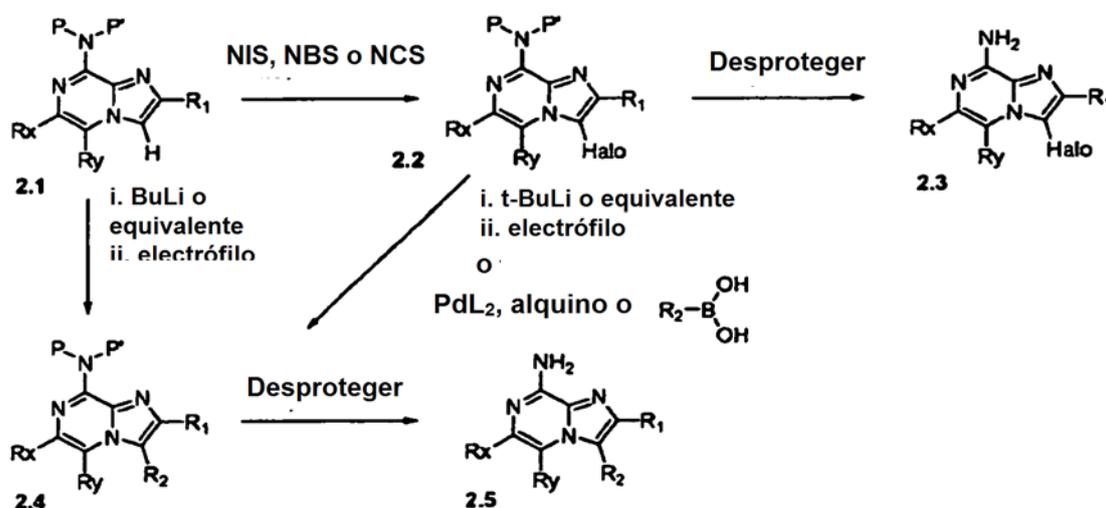
25

Como se observa en el Esquema 1, 2,3-dicloropirazinas (1.1), o reactivos equivalentes, reaccionan con una α-hidroxi alquilamina (1.2) sustituida o sin sustituir para dar un producto intermedio de fórmula 1.3. La oxidación del alcohol de los productos intermedios 1.3 en condiciones conocidas para aquellos familiarizados con la materia como una oxidación de Swern, o equivalentes, proporciona los productos intermedios de aldehído o cetona de fórmula 1.4. El tratamiento con un reactivo deshidratante tal como, por ejemplo, TFAA en un disolvente tal como, por ejemplo, TFA proporciona entonces los productos intermedios de fórmula 1.5. El tratamiento de los productos intermedios 1.5 con amoníaco proporciona entonces los compuestos de fórmula 1.6. Alternativamente, los productos intermedios

pueden tratarse con reactivos tales como hidracina, hidroxiamina, azida de sodio o equivalentes para proporcionar productos intermedios de fórmula 1.7. El tratamiento bajo condiciones reductoras tales como, por ejemplo, hidrógeno con paladio sobre carbono en un disolvente tal como metanol o tetrahidrofurano proporciona entonces los compuestos de fórmula 1.6. Alternativamente, el producto intermedio 1.5 puede tratarse con una amina adecuadamente protegida para proporcionar los productos intermedios de fórmula 1.8. La eliminación de los grupos protectores proporciona los compuestos de fórmula 1.6.

Las 2,3-dicloropirazinas de fórmula 1.1 pueden obtenerse comercialmente o por un experto en la materia siguiendo químicas similares a aquellas encontradas en "Product class 14: pyrazines". N. Sato. Science of Synthesis 2004, 16, páginas 751-844; "Pyrazines. 1. Syntheses of 2,3-dihydroxypyrazines and their derivatives". Jiro Adachi, Nobuhiro Sato. Journal of Organic Chemistry 1972, 37(2), páginas 221-5; "Displacements and nuclear substitutions on hydroxypyrazines". Geo Karmas. Paul E. Spoerri. Journal of the American Chemical Society 1956, 78, páginas 4071-7.

Esquema 2



El Esquema 2 representa procedimientos alternativos para la preparación de compuestos de la realización mediante un producto intermedio de fórmula 2.1 preparado mediante procedimientos descritos en el Esquema 1. El tratamiento de productos intermedios de fórmula 2.1 con un agente de halogenación tal como, por ejemplo, NBS proporciona el producto intermedio halogenado 2.2 que puede tratarse con procedimientos conocidos para un experto en la materia para la eliminación de grupos protectores para proporcionar compuestos de la realización de fórmula 2.3. En la conversión de productos intermedios de fórmula 2.1 a 2.2 pueden usarse otros agentes de halogenación. Otros agentes de halogenación incluyen, pero no se limitan a, NIS, NCS, cloro, bromo, yodo y ICl.

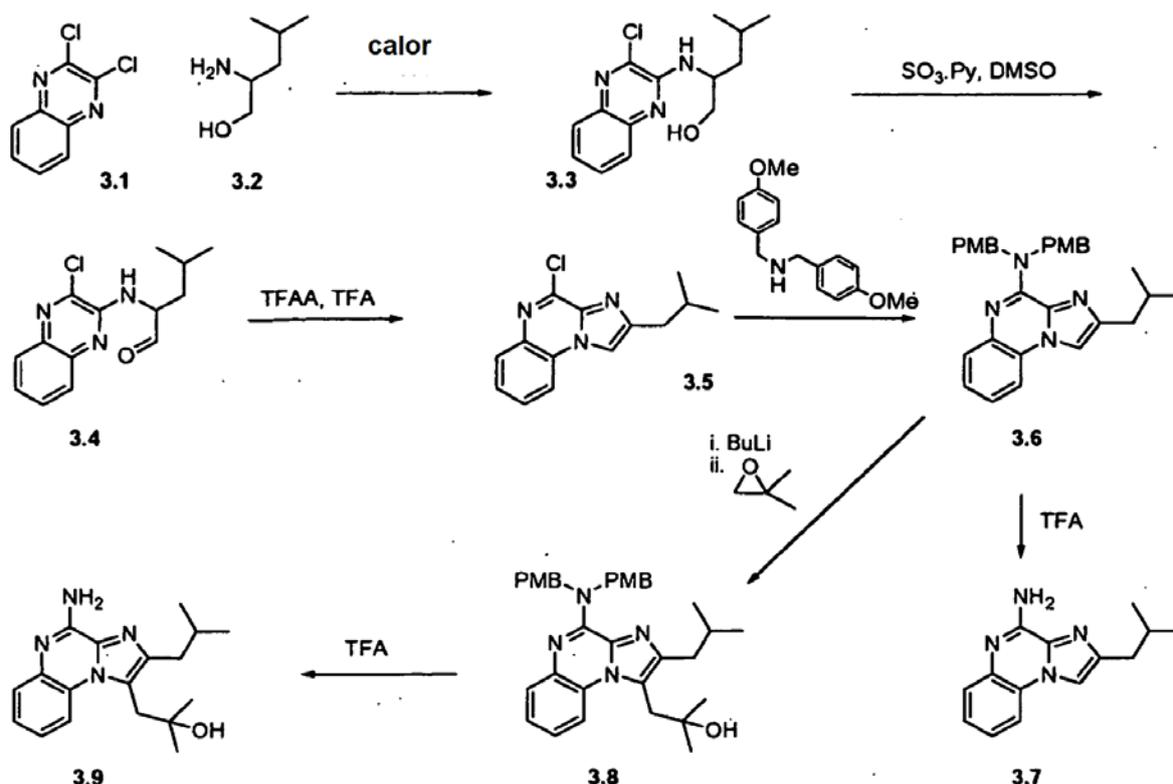
La desprotección de un compuesto de fórmula 2.2 en la P y P' son grupos 4-metoxibencilo en un tratamiento con un ácido tal como, por ejemplo, HCl en un disolvente tal como, por ejemplo, dioxano o THF puede proporcionar compuestos de la realización de fórmula 2.3. En otro ejemplo, un producto intermedio de fórmula 2.2 en la que P y P' se consideran juntos para formar una ftalamida, o grupo protector equivalente, puede tratarse con un reactivo tal como, por ejemplo, hidracina en un disolvente tal como, por ejemplo, metanol, tetrahidrofurano o dimetilformamida y puede proporcionar compuestos de la realización de fórmula 2.3.

El tratamiento de compuestos de fórmula 2.1 con una base fuerte tal como, por ejemplo, butil-litio en un disolvente tal como tetrahidrofurano seguido de la introducción de un electrófilo tal como, por ejemplo, yoduro de metilo u óxido de propileno proporciona productos intermedios de fórmula 2.4. Adicionalmente, los productos intermedios de fórmula 2.2 pueden tratarse con un reactivo tal como, por ejemplo, terc-butillitio en un disolvente tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano seguido de la adición de un electrófilo tal como, por ejemplo, yoduro de metilo u óxido de propileno para proporcionar productos intermedios de fórmula 2.4. Además, la funcionalidad halo del producto intermedio 2.2 conjuntamente con los acoplamientos mediados por metal de transición tales como aquellos descritos en "Palladium Reagents and Catalysts: Innovations in Organic Chemistry" por Jiro Tsuji. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, 1995; "Oranopalladium Chemistry for Organic Synthesis" por E. Negishi. John Wiley & Sons Ltd., Nueva York, NY, 2002; y referencias en su interior, proporciona el acceso a productos intermedios de fórmula 2.4. La desprotección de P y P' como se describe previamente proporciona entonces los compuestos de la realización de fórmula 2.5.

Ejemplo 2

Rutas de preparación generales para la síntesis de 1-(4-amino-2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalin-1-il)-2-metilpropan-2-ol y 2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amina

Esquema 3



5

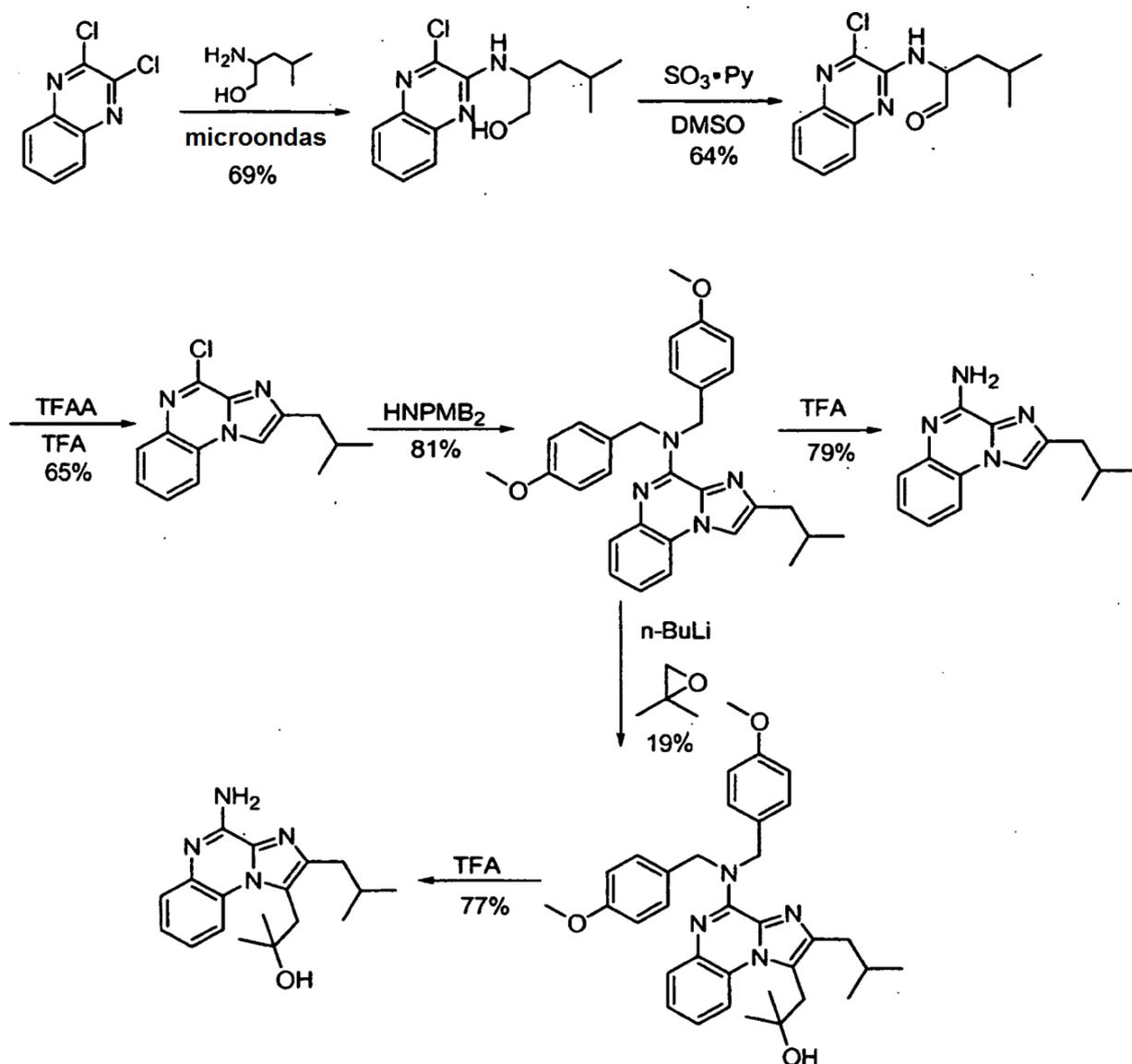
La 2,3-dicloropirazina (3.1) comercialmente disponible se hace reaccionar con la α-hidroxisobutilamina (3.2) para dar el producto intermedio de fórmula 3.3. La oxidación de los productos intermedios de alcohol 3.3 con un reactivo tal como, por ejemplo, SO₃·piridina en un disolvente tal como, por ejemplo, DMSO proporciona el producto intermedio de aldehído de fórmula 3.4. El tratamiento con un reactivo deshidratante tal como, por ejemplo, TFAA en un disolvente tal como, por ejemplo, TFA proporciona entonces los productos intermedios de fórmula 3.5. Los productos intermedios de fórmula 3.5 pueden tratarse con una amina adecuadamente protegida tal como, por ejemplo, bis(4-metoxibencil)amina para proporcionar productos intermedios de fórmula 3.6. La eliminación de los grupos protectores 4-metoxibencilo con un reactivo tal como, por ejemplo, TFA proporciona compuestos de la realización de fórmula 3.7. Además, los productos intermedios de fórmula 3.6 pueden tratarse con una base fuerte tal como, por ejemplo, butil-litio en un disolvente tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano seguido de la adición de un electrófilo tal como, por ejemplo, óxido de isopropileno para proporcionar productos intermedios de fórmula 3.8. La eliminación de los grupos protectores 4-metoxibencilo con un reactivo tal como, por ejemplo, TFA proporciona compuestos de la realización de fórmula 3.9. La preparación detallada de estos compuestos se muestra en los Ejemplos 3 y 4, a continuación.

20 Ejemplo 3

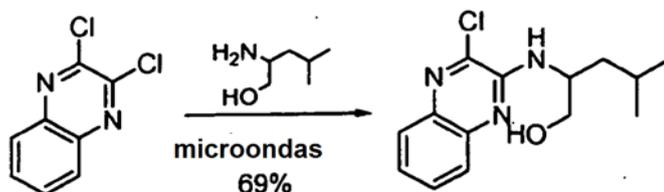
Síntesis de 2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amina

El compuesto del título se sintetizó según el siguiente Esquema 4:

Esquema 4



A. Síntesis de 2-(3-cloroquinoxalin-2-ilamino)-4-metilpentan-1-ol

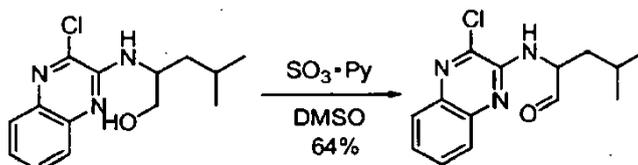


- 5 El compuesto del título se sintetizó generalmente según los procedimientos descritos en Carine Deleuze-Masquéfa, Grégori Gerebtzoff, Guy Subra, Jean-Roch Fabreguettes, Annabel Ovens, Maëlle Carraz, Marie-Paule Strub, Jacques Bompard. Design and synthesis of novel imidazo[1,2-a]quinoxalines as PDE4 inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2004), 12(5), 1129-1139 y en Chun-He Liu, Bo Wang, Wei-Zhang Li, Liu-Hong Yun, Ying Liu, Rui-Bing Su, Jin Li and He Liu. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 4-alkylamino-1-hydroxymethylimidazo[1,2-a]quinoxalines as adenosine A1 receptor antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2004), 12(17), 4701-4707.
- 10

5 A una disolución de 2,3-dicloroquinoxalina (2,0 g, 10,0 mmoles) en 10 ml de 1,4-dioxano se añadió trietilamina (1,81 g, 18 mmoles) y seguido de 2-amino-4-metilpentan-1-ol (1,4 g, 12 mmoles). La mezcla de reacción se separó en 2 tubos de microondas. Y entonces la mezcla se agitó en microondas durante 10 minutos a 130°C. La mezcla de reacción combinada se diluyó con 150 ml de acetato de etilo y luego se lavó con agua (20 ml), salmuera (20 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtro y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluida con acetato de etilo y hexanos dando el compuesto del título (2,3 g, 69%)

EM: MH⁺ = 280 : 282 = 3 : 1

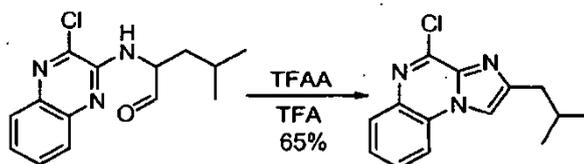
B. Síntesis de 2-(3-cloroquinoxalin-2-ilamino)-4-metilpentanal



10 El compuesto del título se sintetizó generalmente según los procedimientos descritos en Chun-He Liu, Bo Wang, Wei-Zhang Li, Liu-Hong Yun, Ying Liu, Rui-Bing Su, Jin Li and He Liu. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 4-alkylamino-1-hydroxymethylimidazo[1,2-a]quinoxalines as adenosine A1 receptor antagonist. Bioorganic & Medicinal Chemistry (2004), 12(17),4701-4707.

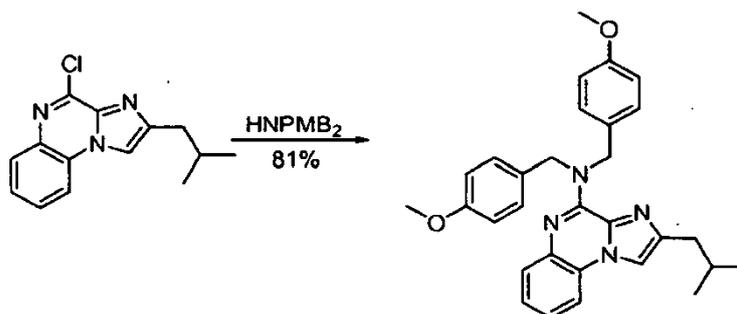
15 A una disolución de 2-(3-cloroquinoxalin-2-ilamino)-4-metilpentan-1-ol (1,90 g, 6,79 mmoles) en 10 ml de DMSO se añadió trietilamina (1,92 g, 19,0 mmoles) y seguido del complejo de trióxido de azufre-piridina (2,38 g, 14,9 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a esa temperatura durante la noche. Y luego se añadieron 100 ml de agua a la mezcla de reacción. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (75 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (20 ml), salmuera (20 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluida con acetato de etilo y hexanos dando el compuesto del título (1,25 g, 64%). EM: MH⁺ = 278 : 280 = 3 : 1

C. Síntesis de 4-cloro-2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalina



25 A una disolución de 2-(3-cloroquinoxalin-2-ilamino)-4-metilpentanal (1,03 g, 3,71 mmoles) en 8 ml de anhídrido trifluoroacético se añadieron 0,2 ml de ácido trifluoroacético a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a esa temperatura durante la noche. Los disolventes se eliminaron a presión reducida. Y luego se añadieron 20 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (50 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (20 ml), salmuera (20 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluida con acetato de etilo y hexanos dando el compuesto del título (630 mg, 65%). EM: MH⁺ = 260 : 262 = 3 : 1. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₂): δ 8,05 (m, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,67 (m, 1H), 7,59 (m, 1H), 2,87 (d, 2H), 2,17 (m, 1H), 1,02 (d, 6H).

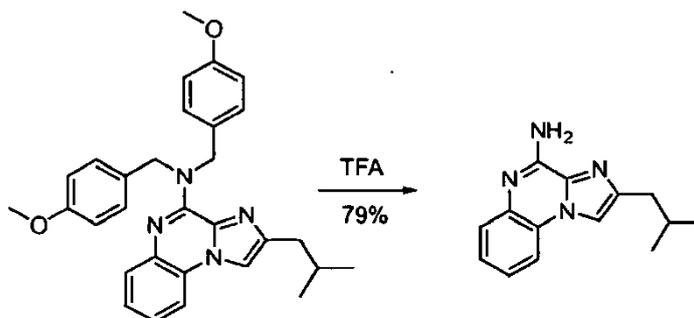
D. Síntesis de 2-isobutil-N,N-bis(4-metoxibencil)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amina



35 A una disolución de 4-cloro-2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalina (130 mg, 0,50 mmoles) en 2 ml de 1-metilpirrolidin-2-ona se añadió N,N-diisopropiletilamina (129 mg, 1,0 mmol) y seguido de bis(4-metoxibencil)amina (154 mg, 0,60

mnoles). La mezcla de reacción se agitó a 120°C durante la noche. Y luego se añadieron 10 ml de agua. La mezcla resultante se extrajo con éter etílico (50 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (20 ml), salmuera (20 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluida con acetato de etilo y hexanos dando el compuesto del título (195 mg, 81%). EM: MH⁺ = 481. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,72 (s, 1H), 7,65 (m, 2H), 7,21-7,39 (m, 6H), 6,84 (d, 4H), 5,34 (s a, 4H), 3,79 (s, 6H), 2,63 (d, 2H), 2,06 (m, 1H), 0,94 (d, 6H).

E. Síntesis de 2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amina

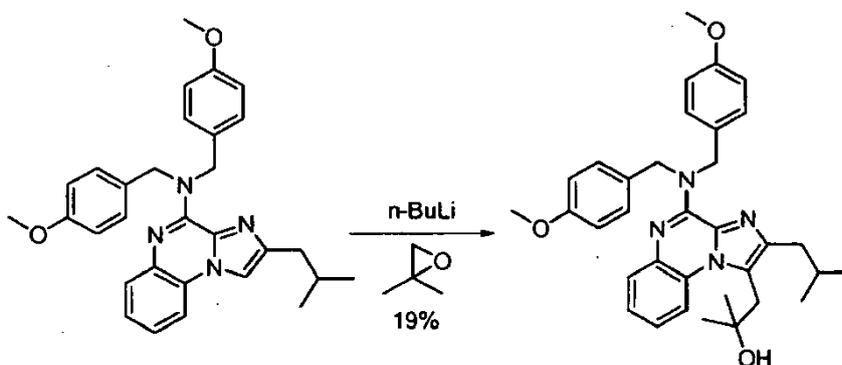


La disolución de 2-isobutil-*N,N*-bis(4-metoxibencil)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amina (16 mg, 0,033 mmoles) en 1 ml de ácido trifluoroacético se agitó a 70°C durante 6 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida. Y luego se añadieron 10 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado. La mezcla resultante se extrajo con 75 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se separó y luego se lavó con agua (15 ml), salmuera (15 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó por lámina de CCF preparativa (acetato de etilo y hexanos) dando el compuesto del título (6,3 mg, 79%). EM: MH⁺ = 241. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,74 (s, 1H), 7,68 (m, 2H), 7,30-7,40 (m, 4H), 5,70 (s a, 2H), 2,67 (d, 2H), 2,08 (m, 1H), 1,00 (d, 6H).

Ejemplo 4

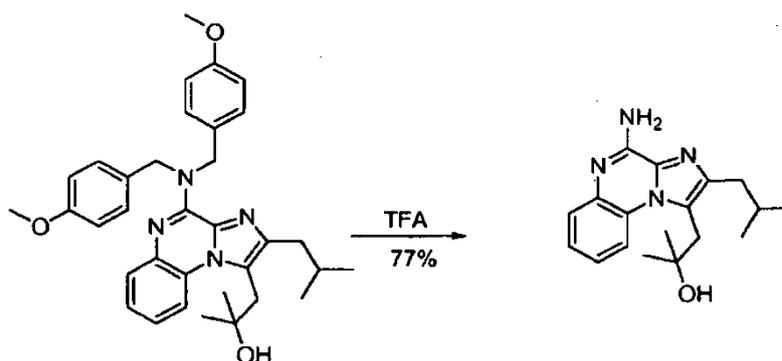
Síntesis de 1-(4-amino-2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalin-1-il)-2-metilpropan-2-ol

A. Síntesis de 1-(4-(bis(4-metoxibencil)amino)-2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalin-1-il)-2-metilpropan-2-ol



A una disolución de 2-isobutil-*N,N*-bis(4-metoxibencil)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amina (134 mg, 0,28 mmoles) (Ejemplo 1, D) en 2 ml de tetrahidrofurano se añadió *n*-butil-litio (2,5 M, 0,2 ml, 0,50 mmoles) a -78°C. Después de agitarse a esa temperatura durante 1 hora se añadió 1,2-epoxi-2-metilpropano (72 mg, 1,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -78°C durante 2 horas, y luego a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción se inactivó con 10 ml de cloruro de amonio acuoso saturado. La mezcla resultante se extrajo con 100 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se separó y se lavó con agua (20 ml), salmuera (20 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluida con acetato de etilo y hexanos dando el compuesto del título (35 mg, 19%) y material de partida recuperado (100 mg, 63%). EM: MH⁺ = 553. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8,41 (dd, 1H), 7,67 (dd, 1H), 7,20-7,37 (m, 6H), 6,84 (m, 4H), 5,31 (s a, 4H), 3,79 (s, 6H), 3,51 (s, 2H), 2,58 (d, 2H), 2,14 (m, 1H), 1,37 (s, 6H), 0,88 (d, 6H).

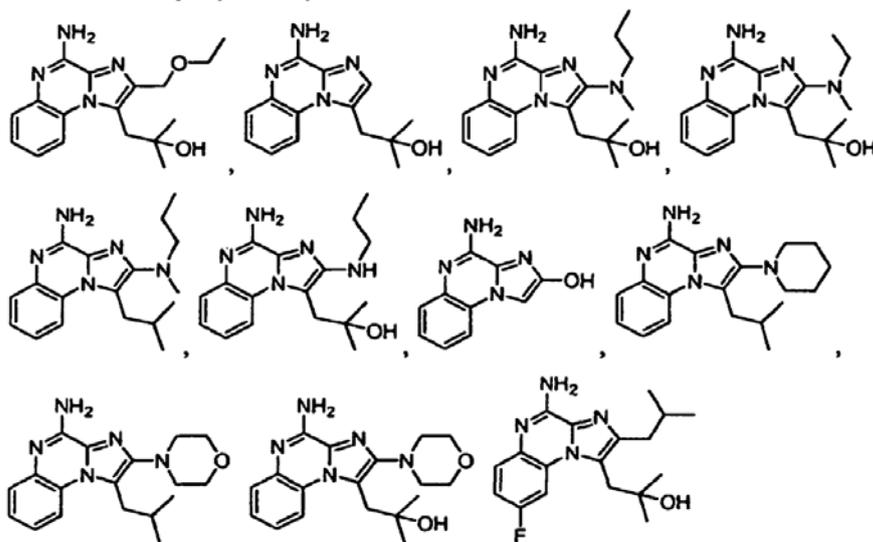
B. Síntesis de 1-(4-amino-2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalin-1-il)-2-metilpropan-2-ol



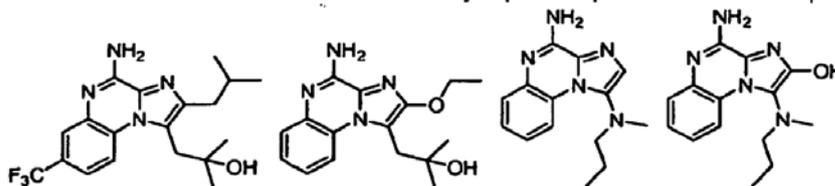
La disolución de 1-(4-(bis(4-metoxibencil)amino)-2-isobutilimidazo[1,2-a]quinoxalin-1-il)-2-metilpropan-2-ol (15 mg, 0,027 mmoles) en 1 ml de ácido trifluoroacético se agitó a 70°C durante 6 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida. Y luego se añadieron 10 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado de los documentos WO 2007/109813 PCT/US2007/064858. La mezcla resultante se extrajo con 70 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se separó y luego se lavó con agua (15 ml), salmuera (15 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó por lámina de CCF preparativa (acetato de etilo y hexanos) dando el compuesto del título (6,5 mg, 77%). EM: MH⁺ = 313. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8,41 (dd, 1H), 7,64 (dd, 1H), 7,25-7,41 (m, 2H), 5,63 (s a, 2H), 3,51 (s, 2H), 2,64 (d, 2H), 2,21 (m, 1H), 1,37 (s, 6H), 0,95 (d, 6H).

10 Cada uno de los siguientes compuestos se sintetiza fácilmente según los ejemplos anteriores:

Ejemplo comparativo

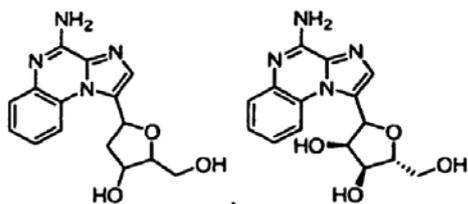


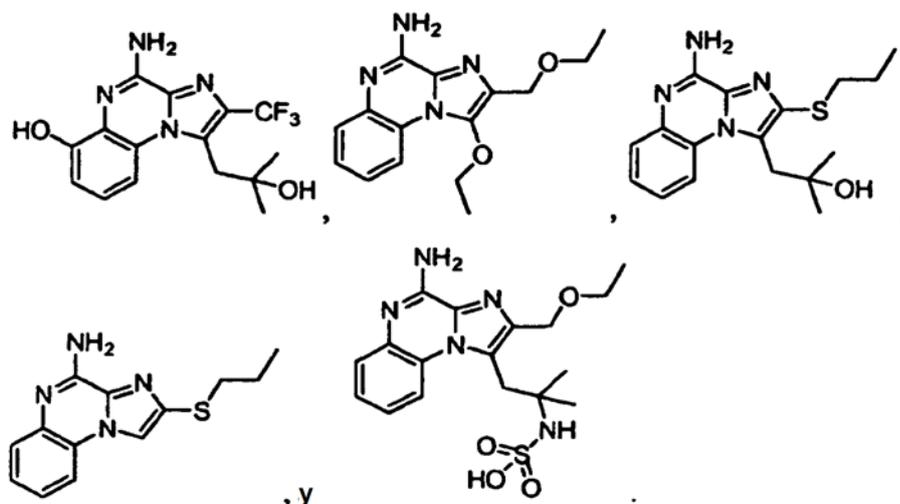
Ejemplo comparativo



Ejemplo comparativo

Ejemplo comparativo





Los compuestos de los Ejemplos 3 y 4 presentaron un valor de CE_{50} con respecto al agonismo de IL-6 y TNF- α a menos de 15 μ M. Los compuestos de los Ejemplos 3 y 4 se probaron para la actividad estimulante de los receptores TLR 7 y 8 humanos y el receptor TLR7 de ratón. Ambos compuestos estimularon la actividad de TLR7 y TLR8, presentando el compuesto del Ejemplo 3 ligeramente más reactividad por TLR7 de ratón que el compuesto del Ejemplo 4. El compuesto del Ejemplo 3 presentó actividad estimulante con TLR8 humano, mientras que el compuesto del Ejemplo 4 presentó poca reactividad o no presentó reactividad con TLR8 humano. El compuesto del Ejemplo 3, y a un mayor grado, del Ejemplo 4 presentó actividad para la estimulación de TLR7 humano. Adicionalmente, debido a la excelente actividad de los compuestos, cada uno de estos compuestos se prefiere individualmente y se prefiere como un miembro de un grupo que incluye cualquiera o todos los otros compuestos de fórmula (I). Cada compuesto se prefiere en procedimientos de modulación de una respuesta inmunitaria y en procedimientos de tratamiento de afecciones biológicas asociadas a la misma, por ejemplo, que van a usarse como un adyuvante de vacuna. Cada uno de los compuestos también se prefiere para su uso en la preparación de medicamentos para la inmunopotenciación, reducción del crecimiento tumoral, tratamiento de infecciones microbianas y víricas, particularmente gripe, VHC y VHS, y en el tratamiento de afecciones biológicas mediadas por ellas.

Los compuestos encontrados que no son eficaces a una concentración de 20 μ M o menos usando el ensayo descrito más adelante también son útiles dentro del alcance de la invención, ya que no se indica que la invención se limite aquellos compuestos que son útiles a una concentración de 20 μ M o menos. Los compuestos pueden ser útiles como productos intermedios, o como productos finales que producen la producción de TNF- α a mayores concentraciones, tales como 100 μ M, 200 μ M o 300 μ M en los ensayos descritos en este documento. Por ejemplo, la loxoribina produce la producción útil de TNF- α a 300 μ M (véase Pope y col. Cellular Immunology 162: 333-339 (1995)).

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los inmunopotenciadores de moléculas pequeñas candidatos pueden identificarse *in vitro*. Los compuestos se criban *in vitro* para su capacidad para activar células inmunitarias. Un marcador de tal activación es la inducción de la producción de citocinas, por ejemplo, la producción de TNF- α . Pueden identificarse moléculas pequeñas que inducen apoptosis que tienen esta actividad. Estos inmunopotenciadores de moléculas pequeñas tienen posible utilidad como adyuvantes y agentes inmunoterapéuticos.

En un procedimiento de ensayo (cribado de alto rendimiento, "High Throughput Screening" (HTS)) para potenciadores inmunitarios de moléculas pequeñas (SMIP) de imidazoquinoxalina, células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), 500.000 por ml en medio RPMI 1640 con 10% de SBF, se distribuyen en placas de 96 pocillos (100.000 por pocillo) que ya contienen 5 μ M de compuesto en DMSO. Las PBMC se incuban durante 18 horas a 37°C en 5% de CO₂. Su capacidad para producir citocinas en respuesta a los compuestos de moléculas pequeñas se determina usando un ELISA de tipo sándwich modificado.

Brevemente, los sobrenadantes de los cultivos de PBMC se ensayan para TNF secretado usando un anticuerpo primario unido a placa para la captura seguido de un anticuerpo anti-TNF biotinilado secundario que forma un sándwich. Entonces, el segundo anticuerpo biotinilado se detecta usando estreptavidina-europio, y la cantidad de europio unido se determina por fluorescencia resuelta en el tiempo. Los compuestos de imidazoquinoxalina y análogos de los mismos se confirman por su actividad inductora de TNF que se mide en el ensayo a medida que aumentan los recuentos de europio con respecto a las células incubadas en medio RPMI solo. Se seleccionan "blancos" basándose en su actividad inductora de TNF con respecto a una dosis óptima de lipopolisacárido LPS (1 μ g/ml), un inductor de TNF fuerte. La robustez del ensayo y el bajo ruido permiten la selección rutinaria de blancos

con ~10% de actividad de LPS que normalmente está entre 5-10X ruido (células solas). Los blancos seleccionados se someten entonces a confirmación para su capacidad para inducir citocinas a partir de múltiples donantes a concentraciones decrecientes. Aquellos compuestos con actividad coherente a o inferior a 5 μM se consideran confirmados para los fines de este ensayo. El ensayo se modifica fácilmente para cribar compuestos eficaces a mayores o menores concentraciones.

Además del procedimiento descrito anteriormente, los procedimientos de medir otras citocinas (por ejemplo, IL-1-beta, IL-12, IL-6, IFN-gamma, IL-10, etc.) son muy conocidos en la técnica y pueden usarse para encontrar compuestos de imidazoquinolina activos y análogos de los mismos de la presente invención.

La medición cualitativa y cuantitativa de la respuesta inmunitaria de un SMIP o composición que comprende un SMIP de las realizaciones preferidas de la presente invención puede implementarse usando procedimientos conocidos en la técnica tales como midiendo la producción de anticuerpos específicos para antígenos, la activación de poblaciones específicas de linfocitos tales como los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ o células NK, y/o la producción de citocinas tales como IFN, IL-2, IL-4 o IL-12. Los procedimientos para medir respuestas de anticuerpos específicos incluyen el ensayo inmunoanálisis de adsorción (ELISA) como se conoce en la técnica. La medición de números de tipos específicos de linfocitos tales como los linfocitos T CD4⁺ puede lograrse, por ejemplo, con citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). También pueden realizarse ensayos de citotoxicidad usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describen en Raz y col., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9519-9523. Las concentraciones de citocinas en suero pueden medirse, por ejemplo, por ELISA. Tales ensayos se describen, por ejemplo, en Selected Methods in Cellular Immunology (1980) Mishell y Shiigi, eds., W.H. Freeman y Co.

I. Preparaciones de muestras

Preparación de PBMC humanas

Se recogió sangre humana de uno o múltiples donantes humanos en el tubo BD Vacutainer™ CPT con citrato de sodio (BD, Franklin Lakes, NJ) y se centrifugó durante 20 minutos a 1600 g. Después de la centrifugación se recogieron las células mononucleares en la capa superior en los tubos y luego se lavaron tres veces con tampón PBS. Entonces, las células lavadas se reconstituyeron a una concentración de células requerida en RPMI completo que contenía 10% de SBF más 100 unidades/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina.

Preparación de células del bazo de ratón

Se aislaron bazos de ratones BALB/c y se trituraron para liberar los esplenocitos de los tejidos. Después de tratarse las muestras trituradas con sal de amonio para destruir los glóbulos rojos, el resto de los esplenocitos se lavaron y se reconstituyeron a una concentración de células requerida con medio RPMI completo.

Línea celular THP-1 humana

La línea celular transformada mielomonocítica humana es sensible a los agonistas de TLR8 y débilmente a los agonistas de TLR7. La línea celular se cultiva en medio RPMI complementado con 10% de SBF.

II. Medición de la actividad

Estimulación de compuestos y medición de multi-citocinas

Se mezclaron PBMC humanas (hPBMC) (a 1 millón de células/ml) o células del bazo de ratón (a 5 millones de células/ml) o células THP-1 monocíticas humanas (a 1 millón de células/ml) con compuestos probados tales como imidazoquinolinas a concentraciones de compuesto valorado en medio RPMI completo. Después de incubarse los cultivos celulares durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂, el sobrenadante de cultivo se recogió y se ensayó para las citocinas secretadas en presencia de los compuestos. Se usaron los kits Beadlyte multi-cytokine flex humanos o de ratón (Upstate, Lake Placid, NY) para medir la cantidad de las siguientes citocinas: TNF- α y IL-6 según las instrucciones del fabricante.

Señalización de TLR

Se siembran células HEK293 (ATCC, CRL-1573) en un matraz T75 a 3×10^6 en 20 ml de DMEM complementado con aminoácido no esencial 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomina y 10% de SBF. Después de cultivarse durante la noche, las células se transfectan con 1) pNFkB-TA-indicador de luciferasa (0,4 μg) (BD Clontech, Palo Alto, CA), y con 2) pGL4.74 (0,01 μg) que lleva un promotor TK, no sensible a la estimulación de NF- κB , y lleva un gen de luciferasa *Renilla*, usado como control interno (Promega, WI), y 3), por separado con la siguiente construcción de TLR (10 μg): construcciones pUNO de TLR humano (hTLR) 7, hTLR8, TLR7 de ratón (mTLR7) (Invivogene, CA), usando el reactivo de transfección Eugene 6 (Roche). Las células transfectadas después de 24 horas de transfección se recogen y se siembran en una placa de 96 pocillos y de fondo plano (1×10^4 célula/pocillo) y se estimulan con los compuestos de prueba a las siguientes concentraciones: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 μM . Después de la estimulación del compuesto durante la noche, las células se ensayan para la expresión de luciferasas de mosca y *Renilla* usando el sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual (Promega, WI). La activación de NF- κB es directamente proporcional a las unidades de luciferasa relativas, que se miden contra

las unidades de luciferasa *Renilla* de control interno.

Normalización de la producción de citocinas

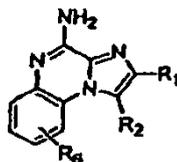
Debido a la naturaleza agonista de los compuestos probados, la clasificación de compuestos se basa en la potencia en los cribados basados en células para la inducción de citocinas. Brevemente, la CE_{50} de cada compuesto para una citocina dada se calcula con respecto a una composición de referencia (es decir, LPS u otro inmunoestimulante potente). Entonces, este valor se usa como el divisor del nivel máximo de citocina producida (pg/ml) en el ensayo. Para calcular CE_{50} se usa un ajuste de curva de cinco parámetros de curvas de respuesta a dosis de citocina para diferentes SMIP para las poblaciones de células indicadas. La puntuación de la clasificación de la potencia de SMIP se calcula dividiendo la concentración máxima de citocina producida entre la CE_{50} relativa establecida para cada compuesto indicado.

Estudios de adyuvante *in vivo*

En solución salina tamponada con fosfato (PBS), 25 microgramos del antígeno gp120dV2EnvSF162 (proteína gp120 recombinante derivada de la secuencia de la cepa del VIH-1 SF162 – el dominio V2 se deleciona; Pharm Res. 2004 Dec 21(12):2148-52) se mezclan con 50 microlitros del adyuvante MF59, seguido de la adición de 0, 1, 5 ó 25 microgramos de un potenciador inmunitario de molécula pequeña (SMIP) y se ajusta a 100 microlitros con PBS. Posteriormente se inyectan 50 microlitros de la disolución en tanto los músculos tibiales anteriores derechos como izquierdos de ratones BALB/c hembra (día 0), para un volumen total de 100 microlitros por ratón. Cuatro semanas después (día 28), 50 microlitros de la disolución se inyectan de nuevo en tanto los músculos tibiales anteriores derechos como izquierdos del ratón. Siete días después de la segunda vacunación (día 34) se recogen muestras de suero y un día después (día 35) se extirpan los bazo. Las muestras de suero se ensayan por ELISA de IgG2a de suero específico para Env y ELISA de IgG1 de suero específico para Env. Las muestras de bazo se ensayan por linfocitos T CD4 y CD8 esplénicos que producen citocinas específicas para Env.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



en la que:

- 5 R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido, hidroxilo, hidroxialquilo, halógeno, haloalquilo, amino, -OR₃, -N(R₃)(R₄), -NR₃C(=O)R₄, -NR₃S(=O)_pR₄, -NR₃C(=O)NR₄R₅, -NR₃S(=O)_pNR₄R₅, -C(=O)R₄, S(=O)_pR₄, -C(=O)NR₃R₄, -S(=O)_pNR₃R₄ y -C(=O)OR₄;
- 10 R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido, arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxilo, hidroxialquilo, halógeno, haloalquilo, amino, -OR₃, -N(R₃)(R₄), -NR₃C(=O)R₄, -NR₃S(=O)_pR₄, -NR₃C(=O)NR₄R₅, -NR₃S(=O)_pNR₄R₅, -C(=O)R₄, -S(=O)_pN₄, -C(=O)NR₃R₄, -S(=O)_pNR₃R₄ y -C(=O)OR₄;
- 15 R₃, R₄ y R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido, arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxilo, hidroxialquilo, halo y haloalquilo;
- 20 R₆ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, -OR₃, -N(R₃)(R₄), haloalquilo C₁₋₃, -O-haloalquilo C₁₋₃, perhaloalquilo C₁₋₃, -O-perhaloalquilo C₁₋₃, hidroxialquilo C₁₋₃, -O-hidroxialquilo C₁₋₃, CN, -(CH₂)_qC(=O)R₇, -O-(CH₂)_qC(=O)R₇, -(CH₂)_qN(R₈)(R₉), -S-alquilo C₁₋₃, -S(=O)₂-R₁₀ y -S(=O)₂N(R₈)(R₉);
- q es 0, 1, 2 ó 3;
- R₇ se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, alquilo C₁₋₃ o alcoxilo C₁₋₃, y
- 25 R₈, R₉ y R₁₀ son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₃;
- con la condición de que R₁, R₂ y R₆ no sean simultáneamente hidrógeno; y
- si R₁ y R₆ son ambos H, R₂ no es butilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; un tautómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

30 2. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que

- i) R₁ es -N(R₃)(R₄), alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂ o alqueno C₂-C₁₂ sustituido o
- ii) R₁ es alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido; o
- iii) R₁ es alquilo C₁-C₁₂; o
- iv) R₁ es alquilo C₁-C₆; o
- 35 v) R₁ es -CH₂-CH(CH₃)₂.

3. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que

- i) R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido o hidroxialquilo; o
- ii) R₂ es alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o hidroxialquilo; o
- 40 iii) R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o hidroxialquilo; o
- iv) R₂ es hidroxialquilo; o

v) R₂ es hidrógeno; o

(vi) en el que R₂ es -CH₂-C(OH)(CH₃)₂.

4. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que:

(i) R₁ es alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂ o alqueno C₂-C₁₂ sustituido; y

5 R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₁-C₁₂ sustituido o hidroxialquilo, o

(ii) R₁ es alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido; y

R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o hidroxialquilo,

o

10 (iii) R₁ es alquilo C₁-C₁₂; y

R₂ es hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o hidroxialquilo,

o

(iv) R₁ es alquilo C₁-C₆; y

R₂ es hidrógeno o hidroxialquilo,

15 o

(v) R₁ es -CH₂-CH(CH₃)₂; y

R₂ es hidrógeno o hidroxialquilo,

o

(vi) R₁ es -CH₂-CH(CH₃)₂; y

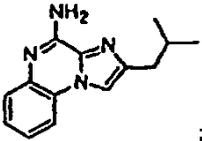
20 R₂ es hidrógeno o -CH₂-C(OH)(CH₃)₂.

5. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que R₆ es hidrógeno.

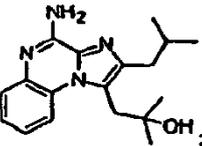
6. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que R₆ es -OR₃ o -N(R₃)(R₄).

7. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que sólo uno de R₂ y R₄ es H.

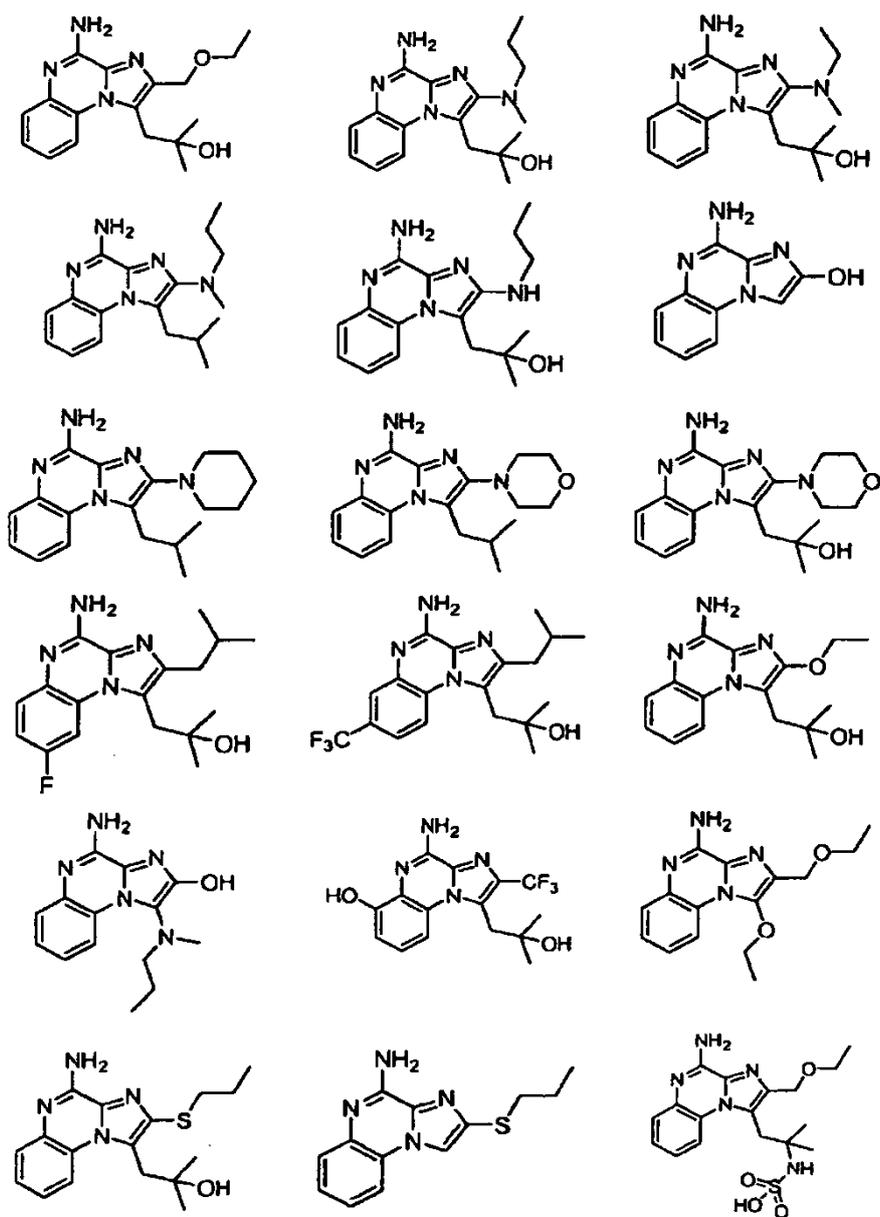
8. Un compuesto de la reivindicación 1 de fórmula:

25  ;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero,

o de fórmula:

30  ;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

9. Un compuesto de la reivindicación 1 de fórmulas:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento de

- 5
- i) inducir la biosíntesis del interferón en un sujeto; o
 - ii) modular una respuesta inmunitaria en un sujeto; o
 - iii) inhibir una cinasa.

11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento para inducir la producción de TNF- α en un sujeto, y en el que el compuesto tiene opcionalmente una concentración de fármaco promedio en estado estacionario en la sangre inferior a 20 μ M.

10

12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, y opcionalmente:

- i) en el que la respuesta inmunitaria implica la producción de citocinas; o
- ii) en el que la respuesta inmunitaria implica la modulación de TLR-7 y/o TLR-8; o

- iii) en el que el sujeto padece una infección microbiana; o
 - iv) en el que el sujeto padece una infección vírica, tal como una infección vírica producida por el virus de la hepatitis C (VHC) o por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); o
 - v) en el que el sujeto padece proliferación celular anormal o cáncer; o
 - 5 vi) en el que el sujeto padece enfermedades alérgicas; o
 - vii) en el que el sujeto padece asma; o
 - viii) en el que el sujeto padece lesiones precancerosas, por ejemplo, en el que las lesiones precancerosas son queratosis actínica.
- 10 13. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el compuesto se administra tópicamente.
14. Una composición farmacéutica que comprende: el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento de:
- 15 i) inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende: administrar al sujeto un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un antígeno, en el que el compuesto induce una respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto; o
 - ii) potenciar la respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto que comprende: administrar al sujeto una composición que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un antígeno, en el que se potencia la respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto.
- 20 16. Una composición que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y una composición inmunogénica adicional o un antígeno.
17. La composición de la reivindicación 16, en la que la composición inmunogénica adicional comprende un antígeno, por ejemplo, en la que el antígeno es:
- i) un antígeno bacteriano; o
 - 25 ii) un antígeno vírico, por ejemplo, un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis B, virus del papiloma humano y virus de la gripe.
18. Una composición que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un antígeno.
19. La composición según la reivindicación 18, en la que el antígeno es:
- i) un antígeno bacteriano; o
 - 30 ii) un antígeno vírico, por ejemplo, un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis B, virus del papiloma humano y virus de la gripe.
20. La composición según una de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19 que comprende además un adyuvante adicional tal como MF59.
- 35 21. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 que comprende además poli(lactida-co-glicolida) (PLG).

FIG. 1
Selectividad de TLR7/8

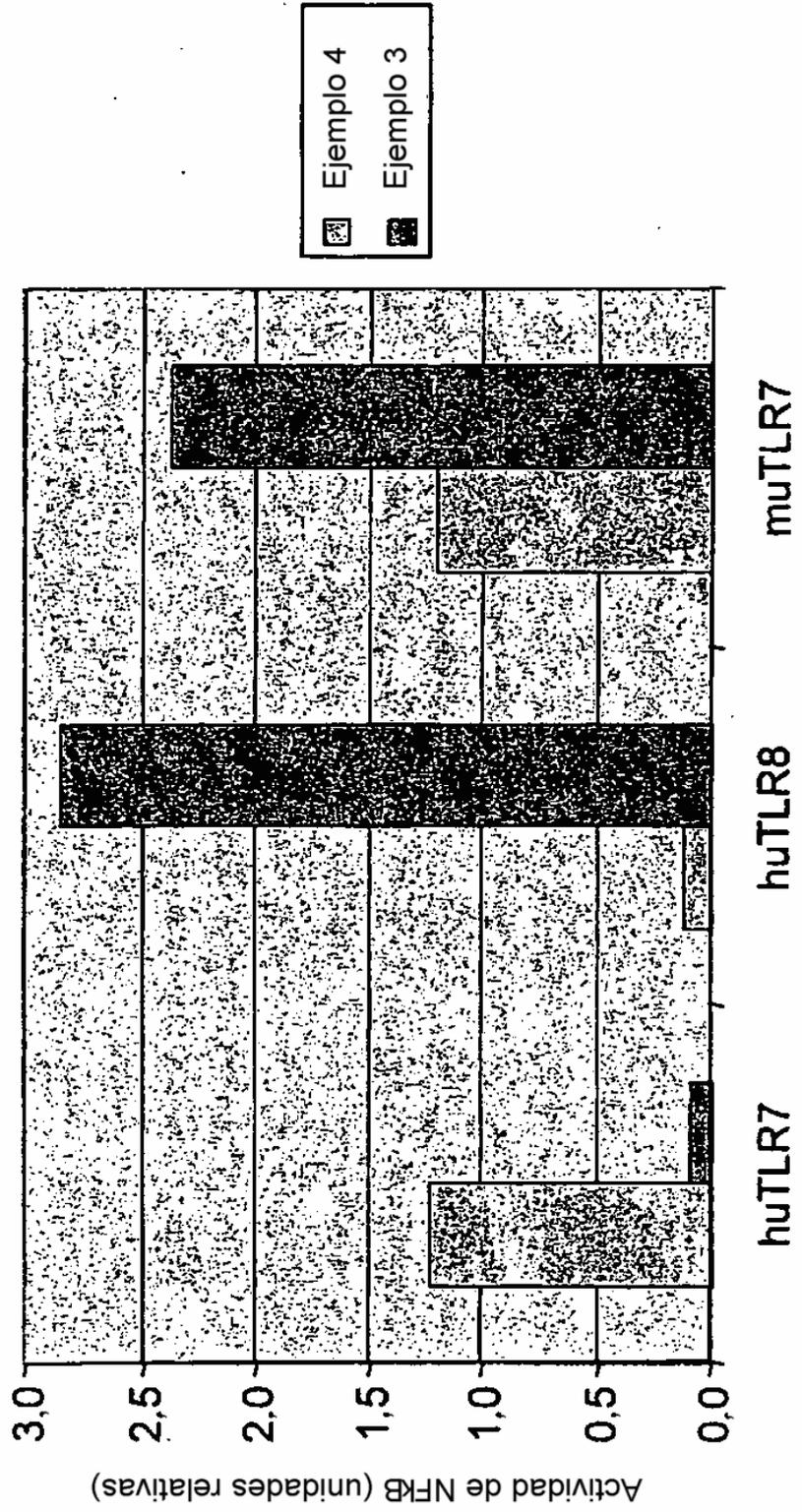


FIG. 2
Producción de TNF por PBMC humanas

