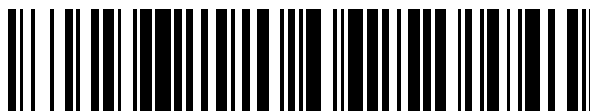


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 964**

51 Int. Cl.:

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2008 E 08799591 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2125007**

54 Título: **Conjugados de agonistas de TLR sintéticos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

07.02.2007 US 888699 P

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

24.04.2014

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street 5th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**COTTAM, HOWARD B.;
CARSON, DENNIS A.;
WU, CHRISTINA C. N.;
WRASIDLO, WOLFGANG y
DANIELS, GREGORY A.**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 456 964 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

Conjugados de agonistas de TLR sintéticos y usos de los mismos

Referencia a solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la fecha de presentación de la solicitud U.S. nº de Serie 60/888,699, presentada el 7 de febrero de 2007.

Declaración de derechos estatales

- 10 La invención aquí descrita ha sido realizada con apoyo estatal bajo el Número de Concesión AI056453 concedido por los Institutos Nacionales de la Salud. El Gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos en relación con la invención.

Antecedentes

- 15 En la última década hemos aprendido mucho sobre las bases moleculares del reconocimiento innato de patógenos microbianos. En general se admite que muchas células somáticas expresan una serie de receptores de reconocimiento de patrones que detectan patógenos potenciales independientemente del sistema inmunológico adaptativo (véase Janeway y col., Annu. Rev. Immunol., 20:197 (2002)). Se cree que estos receptores interactúan con componentes microbianos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns* - PAMP). Ejemplos de PAMP incluyen peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos de paredes de células gram-positivas, el azúcar manosa (que es común en carbohidratos microbianos pero raro en humanos), ADN bacteriano, ARN viral bicatenario y glucanos de paredes de células fúngicas. En general, los PAMP cumplen ciertos criterios, que incluyen (a) su expresión por microbios pero no sus huéspedes mamíferos, (b) conservación de la estructura en una amplia gama de patógenos y (c) capacidad de estimular la inmunidad innata. Se ha comprobado que los receptores tipo Toll (*toll-like receptor* TLR) desempeñan un papel central en la detección de PAMP y en la respuesta temprana a infecciones microbianas (véase Underhill y col., Curr. Opin. Immunol., 14:103 (2002)). En este contexto se han identificado diez TLR de mamífero y una serie de sus agonistas. Por ejemplo, el TLR7 y el TLR9 reconocen y responden a imiquimod y oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores (ISS-ODN), respectivamente. El inmunomodulador sintético R-848 (resiquimod) activa tanto el TLR7 como el TLR8. Mientras que la estimulación de TLR inicia una cascada de señales común (que implica la proteína adaptadora MyD88, el factor de transcripción NF- κ B y citoquinas proinflamatorias inductoras), determinados tipos de células tienden a producir determinados TLR. Por ejemplo, el TLR7 y el TLR9 se encuentran predominantemente en las caras internas de endosomas de células dendríticas (DC) y linfocitos B (en humanos; macrófagos de ratón expresan TLR7 y TLR9). Por otro lado, el TLR8 se encuentra en monocitos sanguíneos humanos (véase Homung y col., J. Immunol., 168:4531 (2002)).

- 30 A este respecto se conoce la síntesis y la actividad inmunoestimuladora de amino 9-benciladeninas 8-sustituidas como potentes agonistas del receptor tipo Toll 7 (véase Jin y col., Bioorg Med Chem Lett. 16: 4559-63 (2006)).

Por otro lado, también se ha informado de que la conjugación de una proteína Gag de VIH con un agonista de TLR7/8 mejora la magnitud y calidad de las respuestas de células T Th1 y CD8+ en primates no humanos (véase Wille-Reece y col., Proc Natl Acad Sci U S A, 102 (42): 15190-4, (2005)).

- 40 Los interferones (INF) también intervienen en la inducción eficiente de la respuesta inmune, en especial después de una infección viral (Brassard y col., J. Leukoc. Biol., 71: 568 (2002)). Sin embargo, muchos virus producen diversas proteínas que bloquean la producción o acción del interferón en diversos niveles. Se cree que el antagonismo de interferón forma parte de una estrategia general para eludir la inmunidad innata y también la inmunidad adaptativa (véase Levy y col., Cytokine Growth Factor Rev., 12:143 (2001)). Si bien los agonistas de TLR pueden ser suficientemente activos en algunos métodos de tratamiento, en algunos casos los antagonistas de interferón microbiano podrían mitigar los efectos coadyuvantes de los agonistas de TLR sintéticos.

- 50 Una respuesta más específica a infecciones microbianas se basa en la inmunización activa o pasiva. Si una inmunización universal no se considera rentable (o farmacoeconómicamente viable), la identificación de una población de riesgo que se beneficiaría de una inmunoprofilaxis puede ser rentable, aunque la identificación de dicha población puede no ser sencilla. No obstante, existen ciertas poblaciones de riesgo claramente definidas para determinadas infecciones bacterianas, como infecciones estafilocócicas, incluyendo pacientes de diálisis, con derivación ventriculoperitoneal, con riesgo de endocarditis infecciosa y mayores en residencias. Todos ellos padecen condiciones crónicas que los exponen a un riesgo elevado y prolongado de

infecciones estafilocócicas. Muchos de estos pacientes tienen también un alto riesgo de adquirir *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina asociado a la asistencia sanitaria (*healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - HA-MRSA). Sin embargo, puede ser más fácil conseguir el bloqueo de la colonización de *Staphylococcus* que proteger contra la infección.

- 5 La inmunoprofilaxis pasiva utilizando anticuerpos policlonales (Capparelli y col., *Antimicrob. Agents Chemo.*, 49:4121 (2005)) o anticuerpos monoclonales (mAbs) (www.biosynexus.com/productcandidates.html) puede proporcionar una protección inmediata (aunque de corta duración) a pacientes que no pueden esperar a que se produzca el efecto de una vacuna o cuyos sistemas inmunológicos están demasiado comprometidos para producir una respuesta a una vacuna. Una indicación potencial para la inmunoprofilaxis pasiva es un brote hospitalario de infecciones relacionadas con el MRSA. En estos casos, para los individuos expuestos puede resultar beneficiosa una profilaxis inmediata, mientras que para los individuos que residen en la misma sala o instalación de cuidados crónicos puede resultar beneficiosa una inmunización activa. Además, los pacientes de las unidades de cuidados intensivos son beneficiarios potenciales de la inmunoprofilaxis pasiva, ya que cada uno de ellos tiene probabilidades de adquirir uno o más factores de riesgo de infecciones por estafilococos.

Sumario de la invención

- 20 La presente solicitud describe conjugados de un agonista de TLR sintético unido por un enlace covalente estable a una macromolécula y composiciones que los contienen, así como métodos de utilización de los conjugados. Los conjugados pueden incluir macromoléculas unidas directamente a un agonista de TLR sintético, por ejemplo agonistas de TLR7 o TLR9, o unidas vía un engarce con el agonista de TLR, por ejemplo a través de un grupo amino, carboxi o succinamida. Por ejemplo, los conjugados descritos incluyen un agonista de TLR sintético (pharmacophore) unido de forma covalente a una macromolécula tal como, por ejemplo, un péptido, polipéptido, por ejemplo un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno, lípido, un polímero tal como polietilenglicol, un gránulo, como un gránulo de poliestireno, o un dendrímero. 25 Los conjugados proporcionados son agentes inmunoestimuladores de amplio espectro, larga duración y no tóxicos, útiles para activar el sistema inmunológico de un mamífero, por ejemplo un humano. En particular, los conjugados proporcionados optimizan la respuesta inmune y al mismo tiempo limitan los efectos secundarios sistémicos no deseados asociados a los agonistas de TLR no conjugados.

- 30 El agonista de TLR sintético puede ayudar a dirigir el conjugado hacia TLR dentro de los endosomas de células diana y mejorar el suministro de la macromolécula. En un aspecto, el agonista de TLR sintético es específico de TLR endosómicos. En un aspecto, el agonista de TLR sintético puede ser un agonista de TLR7, TLR8, TLR3 o TLR9. Además, el agonista de TLR sintético puede mejorar la respuesta a la macromolécula (por ejemplo la respuesta inmune). Del mismo modo, la macromolécula puede ser útil para activar el sistema inmune y/o puede dirigir el conjugado a células particulares. Por consiguiente, la macromolécula, por ejemplo 35 con un grupo amino primario unido a un agonista de TLR sintético, puede aumentar la actividad del agonista de TLR sintético o tener una actividad deseable independiente. Por ejemplo, la macromolécula puede aumentar la actividad del agonista de TLR ayudando a dirigir el agonista hacia el TLR dentro de los endosomas de células diana, mejorando la transducción de señales inducida por el agonista de TLR, o reticulando el receptor, o una combinación de ambos. En un ejemplo, la macromolécula es un lípido que se incorpora espontáneamente en liposomas. En un ejemplo, la macromolécula es una nanopartícula que tiene grupos amino en su superficie. Una vez acoplada a un agonista de TLR, el conjugado de agonista de TLR-nanopartícula puede tener un tamaño de, por ejemplo, aproximadamente 100 nm, que puede residir (estar presente) en endosomas.

- 45 Las infecciones por *Staphylococcus aureus* (SA) adquiridas en hospitales son una causa fundamental de morbilidad y mortalidad. Sin embargo no se utilizan vacunas en las instalaciones de cuidado para enfermedades agudas, ya que tardan demasiado en actuar y no son eficaces en pacientes con deficiencias inmunitarias. La invención proporciona una vacuna para la vacunación rápida de pacientes en riesgo de infección bacteriana gram-positiva, por ejemplo infecciones por SA, empleando agonistas del receptor tipo Toll 7 (TLR7) y uno o más antígenos (inmunógenos) de una bacteria gram-positiva. El uso de las vacunas de 50 la invención induce inmunidad en aproximadamente 6 días, lo que permite aplicaciones no susceptibles al protocolo de vacunación estándar (por ejemplo instalaciones de cuidado para enfermedades agudas).

- Tal como se describe aquí, se preparó una composición que comprende una bacteria gram-positiva, *Bacillus anthracis* (BA), y un agonista de TLR7 sintético. La composición inducía la secreción de IL12 e IL6 (lo que es indicativo de la activación de macrófagos derivados de médula ósea (*bone marrow derived macrophages* - BMDM)) *in vitro* y protegía a ratones contra una posterior provocación por BA intrapulmonar *in vivo*, que de lo contrario era letal. En particular, la administración de una composición que contenía un conjugado de agonista de TLR7 y un inmunógeno (UC-IV199-albúmina/espores de BA irradiadas) indujo una inmunidad protectora frente al BA en un plazo de 6 días. En cambio, la inyección a los animales con espores de BA 55 solas, o con BA más un adyuvante convencional, es decir, toxina del cólera (*cholera toxin* - CT), no protegió

los animales frente a una provocación letal. La rapidez de la respuesta inmune protectora en un animal naive fue inesperada.

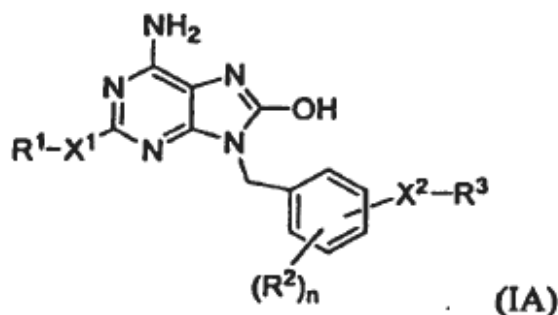
Así, la solicitud proporciona composiciones inmunógenas. En un aspecto, una composición inmunógena incluye un agonista de TLR sintético, tal como un agonista de TLR7, por ejemplo UC-IV199, acoplado a una célula bacteriana gram-positiva, por ejemplo acoplado a los grupos amino libres de un *Staphylococcus aureus* inactivado; un agonista de TLR sintético tal como un agonista de TLR7 acoplado a un extracto bacteriano de antígenos bacterianos gram-positivos aislados; un agonista de TLR sintético tal como un agonista de TLR7 acoplado a una proteína bacteriana gram-positiva aislada, por ejemplo proteína recombinante; o un agonista de TLR sintético tal como un agonista de TLR7 acoplado a carbohidratos bacterianos gram-positivos aislados. Por ejemplo, un agonista de TLR7 sintético se puede acoplar con carbohidratos bacterianos utilizando métodos para unir polisacáridos de *Staphylococcus aureus* a soportes proteínicos (tales como los utilizados para el toxoide tetánico). La preparación bacteriana inactivada se puede preparar utilizando irradiación gamma, calor o tratamiento químico. En otro aspecto, una composición inmunógena incluye un agonista de TLR sintético tal como un agonista de TLR7 acoplado a un adyuvante y una preparación que comprende células bacterianas gram-positivas inactivadas; un agonista de TLR sintético tal como un agonista de TLR7 acoplado a un adyuvante y una preparación que comprende un extracto bacteriano gram-positivo; o un agonista de TLR sintético tal como un agonista de TLR7 acoplado a un adyuvante y una preparación que comprende un antígeno bacteriano gram-positivo aislado, por ejemplo proteína recombinante. Por ejemplo, la composición inmunógena puede incluir UC-IV 199 acoplado a albúmina y una preparación con bacterias gram-positivas inactivadas, por ejemplo *Staphylococcus aureus* inactivado. En un aspecto, una composición inmunógena incluye un agonista de TLR7 sintético acoplado a un adyuvante y una preparación que comprende un antígeno bacteriano gram-positivo recombinante, tal como una proteína bacteriana gram-positiva aislada o un péptido de la misma, o un carbohidrato bacteriano gram-positivo aislado. En un aspecto, una dosis simple de la composición inmunógena puede presentar una actividad muy potente, por ejemplo puede proporcionar inmunidad protectora, en un corto período de tiempo, por ejemplo menos de aproximadamente 10 días.

En un aspecto se administra una vacuna esterilizada a un sujeto 0 a 7 días antes de la hospitalización. En un aspecto, la vacuna se administra vía intramuscular. En un aspecto, la vacuna se administra en una dosis de entre 10 µg y 10 mg.

El uso de conjugados de agonistas de TLR sintéticos, tal como agonistas de TLR7, resulta ventajoso, ya que su química accesible y versátil permite la conjugación con cualquier antígeno, y los conjugados modificables tienen una estequiometría definida. La preparación de los conjugados resulta económica y éstos son potentes y proporcionan así una protección rápida, lo que permite su uso en instalaciones de cuidados de enfermedades agudas, como traumatología, quemados, precirugía o bioterrorismo.

La solicitud incluye el uso de conjugados de un agonista de TLR sintético y una macromolécula, así como conjugados de agonista de TLR y otra molécula. El conjugado puede ser útil para prevenir, inhibir o tratar afecciones incluyendo, de forma no limitativa, asma alérgica, enfermedades infecciosas como infecciones virales respiratorias, por ejemplo las asociadas a una infección por el virus de la gripe o el virus respiratorio sincitial (*respiratory syncytial virus* - RSV), lupus y otras enfermedades autoinmunes, y como una vacuna, por ejemplo para cáncer o enfermedades infecciosas. En un aspecto, una sola dosis del conjugado puede presentar una actividad muy potente para estimular la respuesta inmune. Además, debido a la baja toxicidad de los conjugados, en ciertas circunstancias se pueden administrar dosis más altas, por ejemplo sistémicamente, mientras que en otras circunstancias se pueden administrar dosis más bajas, por ejemplo debido a la localización del conjugado. En un aspecto, cuando se administran en dosis altas, los conjugados de agonista de TLR sintético pueden generar una composición útil en la respuesta antagónica y, en consecuencia, pueden ser útiles para inhibir o tratar el asma o enfermedades autoinmunes. Una primera dosis puede provocar una hiperrespuesta que, a su vez, suprime la respuesta inmune, evitando así la inflamación. Por consiguiente, el uso de dosis más altas y readministración puede conducir a una inhibición de la respuesta inmune.

En una realización, la invención proporciona una composición para su uso en un método para prevenir o inhibir una infección bacteriana gram-positiva en un mamífero, que consiste en administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición que comprende un antígeno bacteriano de una bacteria gram-positiva y una cantidad de un compuesto de fórmula (IA):



donde

5 X^1 es -O-, -S-, o NR^c ; siendo R^c hidrógeno, alquilo(C_{1-10}) o alquilo(C_{1-10}) sustituido, o R^c y R^1 , junto con el átomo de nitrógeno, pueden formar un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquilenos(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquilenos(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;

10 R^1 es hidrógeno, alquilo(C_{1-10}), alquilo(C_{1-10}) sustituido, arilo(C_{6-10}) o arilo(C_{6-10}) sustituido, heterociclilo(C_{5-9}), heterociclilo(C_{5-9}) sustituido; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxi alquilenos(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquilenos(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;

15 cada R^2 es, independientemente, hidrógeno, -OH, alquilo(C_{1-6}), alquilo(C_{1-6}) sustituido, alcoxi(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-alquilo(C_{1-6}) (alcanoilo), -C(O)-alquilo(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-arilo(C_{6-10}) (aróilo), -C(O)-arilo(C_{6-10}) sustituido, -C(O)OH (carboxilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6}) (alcoxi-carbonilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6}) sustituido, - NR^aR^b , -C(O)NR^aR^b (carbamoilo), -C(O)NR^aR^b sustituido, halo, nitro o ciano; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquilenos(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquilenos(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;

cada R^a y R^b es, independientemente, hidrógeno, alquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6}), haloalquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6})alquilo(C_{1-6}), alcanoilo(C_{1-6}), hidroxialquilo(C_{1-6}), arilo, arilalquilo(C_{1-6}), Het, Het(C_{1-6})alquilo o alcocarbonilo(C_{1-6});

20 X^2 es un enlace o un grupo enlazante;

n es 1, 2, 3, o 4; y

R^3 es una macromolécula que comprende un péptido heterólogo, una proteína heteróloga, un lípido heterólogo, un gránulo, tal como un gránulo de poliestireno, una molécula de ácido nucleico heterólogo o un dendrímero;

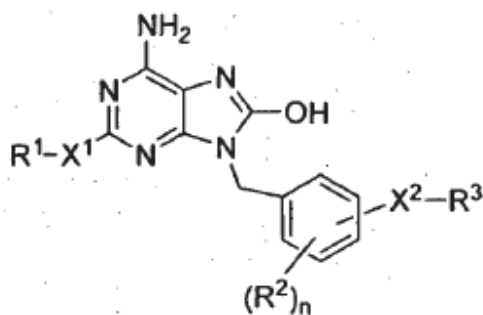
25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo sus hidratos.

En determinadas realizaciones no reivindicadas, la definición del grupo R^1 puede utilizarse de manera intercambiable con la definición del grupo R^1 para cualquier otra fórmula aquí descrita.

30 Por consiguiente, ejemplos no limitativos de macromoléculas o engarces no sólo incluyen un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de nitrógeno o un átomo de carbono (y átomos de hidrógeno unidos apropiadamente cuando sea necesario llenar valencias), sino también macromoléculas o engarces con cadenas laterales que aumentan la solubilidad, por ejemplo grupos que contienen los anillos morfolino, piperidino, pirrolidino o piperazino y similares; aminoácidos, polímeros de aminoácidos (proteínas o péptidos), por ejemplo dipéptidos o tripéptidos, y similares; carbohidratos (polisacáridos), nucleótidos, por ejemplo PNA, ARN y ADN y similares; polímeros de materiales orgánicos, por ejemplo polietilenglicol, polilactida y similares;

35 lípidos monoméricos y poliméricos; nanopartículas orgánicas insolubles; sustancias corporales no tóxicas, por ejemplo células, lípidos, antígenos, por ejemplo microbios, por ejemplo virus, bacterias, hongos y similares. Los antígenos pueden incluir organismos completos inactivados o subcomponentes de los mismos y similares.

40 También está previsto un compuesto para su uso en un método para prevenir o inhibir una infección bacteriana gram-positiva en un mamífero, que consiste en administrar al mamífero una cantidad efectiva del compuesto de fórmula (IB):



(IB)

donde

5 X^1 es -O-, -S-, o NR^c ; siendo R^c hidrógeno, alquilo(C_{1-10}) o alquilo(C_{1-10}) sustituido, o R^c y R^1 , junto con el átomo de nitrógeno, pueden formar un anillo heterocíclico o heterocíclico sustituido, siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquilenos(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquilenos(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;

10 R^1 es hidrógeno, alquilo(C_{1-10}), alquilo(C_{1-10}) sustituido, arilo(C_{6-10}) o arilo(C_{6-10}), heterociclilo(C_{5-9}), heterociclilo(C_{5-9}) sustituido; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquilenos(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquilenos(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;

15 cada R^2 es, independientemente, hidrógeno, -OH, alquilo(C_{1-6}), alquilo(C_{1-6}) sustituido, alcoxi(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-alquilo(C_{1-6}) (alcanoílo), -C(O)-alquilo(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-arilo(C_{6-10}) (aroiílo), -C(O)-arilo(C_{6-10}) sustituido, -C(O)OH (carboxilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6}) (alcoxi-carbonilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6}) sustituido, - NR^aR^b , -C(O)NR^aR^b (carbamoílo), -C(O)NR^aR^b sustituido, halo, nitro o ciano; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquilenos(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquilenos(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;

cada R^a y R^b es, independientemente, hidrógeno, alquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6}), haloalquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6})alquilo(C_{1-6}), alcanoílo(C_{1-6}), hidroxialquilo(C_{1-6}), arilo, arilalquilo(C_{1-6}), Het, Het-alquilo(C_{1-6}) o alcocarbonilo(C_{1-6});

20 X^2 es un enlace o un grupo enlazante;

n es 1, 2, 3, o 4; y

R^3 es una bacteria gram-positiva, una proteína o un péptido antigénico aislado de la bacteria gram-positiva, o un polisacárido aislado de una bacteria gram-positiva;

25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo hidratos de éste, no siendo la bacteria gram-positiva *Bacillus* ni *Listeria*. En una realización, la bacteria gram-positiva es un *Staphylococcus*.

En una realización, R^3 es una proteína o un péptido antigénico aislado de *Staphylococcus* y dicho compuesto se administra con una preparación de *Staphylococcus* inactivados.

30 La solicitud proporciona el compuesto de la solicitud para su uso en una terapia médica (por ejemplo, para la profilaxis de enfermedades bacterianas, como en una vacuna). Estos compuestos también pueden ser utilizados para la biodefensa, por ejemplo contra *B. anthrax*.

35 También se proporcionan composiciones no reivindicadas y un compuesto de la solicitud para su uso en una terapia médica, por ejemplo para tratar el asma o infecciones virales o para prevenir infecciones virales, así como el uso de los conjugados para la producción de un medicamento para el tratamiento de una afección o síntoma asociado a TLR o en el que está indicado un aumento de la respuesta inmune o una supresión de la respuesta inmune.

Además, la solicitud también proporciona una composición farmacéutica no reivindicada que comprende al menos un compuesto dado a conocer aquí, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un diluyente o un soporte farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en combinación con una preparación de una bacteria gram-positiva seleccionada, por ejemplo una preparación inactivada o un

extracto, una proteína aislada de una bacteria gram-positiva seleccionada o un carbohidrato (polisacárido) aislado de una bacteria gram-positiva seleccionada.

5 La solicitud incluye el uso de conjugados de agonistas de TLR7 y una macromolécula, por ejemplo una macromolécula con un grupo amino primario, que intensifica la actividad del agonista, por ejemplo albúmina, o que tiene una actividad deseable independiente, por ejemplo es un antígeno o de una bacteria gram-positiva. Los conjugados pueden incluir macromoléculas unidas directamente a un agonista de TLR7 o unidas al agonista de TLR7 a través de un engarce. Los conjugados pueden optimizar la respuesta inmune y al mismo tiempo limitar los efectos secundarios sistémicos de los agonistas de TLR7.

10 En una realización, la invención proporciona un compuesto para su uso en un método para prevenir o tratar una infección bacteriana gram-positiva en un mamífero, como un humano. El uso incluye la administración a un mamífero que lo requiera de una cantidad efectiva de un compuesto de la solicitud o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de un conjugado con un adyuvante o con al menos un antígeno de la bacteria gram-positiva.

15 También se describe un método no reivindicado para identificar conjugados útiles para prevenir, inhibir o tratar una afección o síntoma particular, por ejemplo identificando el perfil de citoquina inducido por el conjugado *in vitro* o *in vivo* o identificando el endosoma, por ejemplo en un tiempo temprano, medio o tardío, que tiene el TLR para el agonista de TLR. Dado que las diferentes células tienen endosomas diferentes, la identificación de patrones endosomiales en células puede permitir dirigir conjugados a tipos de células específicos o mejorar el acceso de los conjugados a los endosomas.

20 Breve descripción de las figuras

- Figura 1: muestra un conjugado de agonista de TLR/alfa-galactosilceramida.
- Figura 2: ilustra un conjugado UC-1V150 de G1 PAMAM con un núcleo de etilendiamina.
- Figura 3A: ilustra un engarce (SANH) para conjugar una macromolécula y un agonista de TLR sintético.
- 25 Figura 3B: ilustra la síntesis de UC-1V150.
- Figura 3C: ilustra la conjugación de UC-1V-150 con MSA. Primero se mezclaron 200 µl de MSA (25 mg/ml) con 100 µl de tampón de conjugación (fosfato 1M, pH = 7,2) y 690 µl de PBS. Luego se añadieron 844 µl de SANH en 10 µl de DMF (exceso molar en un factor 40 con respecto a la MSA) a la solución de proteína (la concentración final de NP en la mezcla de reacción es de 5 mg/ml). Después de agitar la mezcla suavemente, se dejó que la reacción procediera a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de retirar el exceso de SANH, la mezcla de reacción se cargó en un dispositivo filtrante rotativo microcon (YM-3, Millipore) y se concentró a aproximadamente 70 µl. Luego se añadieron 460 µg de UC-1V150 disueltos en 10 µl de DMF a MSA modificada con SANH y la mezcla de reacción se incubó a TA una noche. Para retirar el exceso de UC-1V150, la mezcla de reacción primero se concentró a 50 µl utilizando un dispositivo filtrante rotativo microcon (YM-3: Millipore) y luego se cargó en una columna micro-spin G25 (GE Healthcare).
- 30
- Figura 4: una ilustración gráfica del perfil de absorción (a aproximadamente 350 nm) de un compuesto de fórmula I (un conjugado OVA/SANH/UC-1V150).
- Figura 5: ilustra el perfil de absorbancia de una reacción de conjugación de un agonista de TLR7 sintético, UC-1V150, con seroalbúmina de ratón (*mouse serum albumin* - MSA). La relación entre UC-1V150 y MSA es aproximadamente 5:1.
- Figura 6: ilustra un conjugado de agonista de TLR/fosfolípido.
- Figura 7: muestra el efecto de la administración de UC-1V199/lípido en diferentes dosis y tiempos.
- 45 Figura 8A-B: muestra que el UC-1V199/lípido inhibe las señales de TLR7 y TLR2.
- Figura 9: ilustra la dosis-respuesta bifásica a un agonista de TLR7 ultrapotente (un agonista pico/nanomolar y agonistas micromoleculares).
- Figuras 10A y B: muestran que los conjugados de UC-1V150/MSA activan tanto macrófagos derivados de médula ósea murina (cuadro A) como células mononucleares de sangre periférica humana (cuadro B). Las células se incubaron con diversas concentraciones de los conjugados de
- 50

0,5 nM a 10 µM con BMDM o de 0,1 a 10 µM con PBMC. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de 24 horas y los niveles de citoquinas se analizaron mediante Luminex.

- 5 Figuras 11A, B y C: ilustran la eficacia *in vivo* de un conjugado de agonista de TLR7. A ratones C57BL/6 se inyectó (i.v. en la vena caudal) diversas cantidades de UC-1V150 (SM-360320 moldeado con aldehído) o UC-1V150/MSA por ratón. Se recogieron muestras de suero y se analizaron los niveles de citoquinas mediante Luminex. El efecto del agonista de TLR7 sintético no conjugado, SM-360320, sólo duró 2 horas, mientras que el efecto de UC-1V150/MSA se prolongó hasta al menos 6 horas.
- 10 Figura 12: muestra la actividad local *in vivo* continua de un conjugado de UC-1V150/MSA sin efecto sistémico. Se anestesiaron ratones C57BL/6 y se les administraron (i.t.) 3 nmol de UC-1V150/MSA. Una vez transcurridos los tiempos indicados, los ratones fueron sacrificados y se recogieron BALF y sueros. Se combinaron los datos de dos experimentos independientes con al menos seis ratones por grupo, Los resultados muestran los valores medios \pm SEM (*standard error of the mean* - error estándar de la media).
- 15 Figura 13: muestra la inducción de citoquinas en BMDM mediante conjugados de esporas de ántrax irradiadas-agonista de TLR7.
- 20 Figura 14: gráficos de supervivencia después de la inmunización de ratones con UC-1V150/MSA y provocación con esporas. A) a unos ratones A/J hembra emparejados por edad se les administró vía i.n. solo solución salina o solución salina que contenía MSA (una cantidad equivalente a UC-1V150/MSA), UC-1 V 150 o UC-1 V 150/MSA a 0,75 nmol/ratón 1 día antes de la infección por *B. anthracis*, y se evaluó la supervivencia hasta los 13 días. B) a unos ratones Balb/c se les administró vía i.n. una solución salina o UC-1V150/MSA a 5 nmol/ratón 1 día antes de la infección por el virus de la gripe y se siguió la supervivencia durante 21 días. En cada modelo se realizaron curvas de supervivencia Kaplan-Meier y test log-rango para determinar la significancia. En cada grupo se analizaron al menos 8 ratones.
- 25 Figura 15: gráfico del porcentaje de supervivencia después de una sola dosis de vacuna con agonistas de TLR7 y conjugados.
- 30 Figura 16: muestra que la protección contra la exposición a esporas de ántrax depende de las células CD4+.
- Figura 17: muestra un perfil de citoquinas local en ratones. A unos ratones C57BL/6 se les administró vía i.t. un conjugado de UC-1V150/MSA o UC-1V136 no conjugado en una cantidad de 3 nmol o 500 nmol por ratón, respectivamente. Se recogieron BALF y sueros una vez transcurridos los tiempos indicados y los niveles de citoquinas se determinaron mediante inmunoensayo múltiple. Se muestran los valores medios de al menos 3-5 ratones por grupo \pm SEM.
- 35 Figura 18: ilustra el espectro de absorbancia para la conjugación directa de partículas de VIS con UC-1V150.
- 40 Figura 19: ilustra la inducción de citoquinas en BMDC mediante un conjugado de un agonista de TLR7 sintético y partículas virales.
- Figuras 20A-B: ilustran los efectos de un conjugado de UC-1V150/VIS inactivado (cuadro A) o UC-1V150/OVA/ODN (cuadro B) en la producción de IL-12. Se incubaron BMDC mieloides durante 24 horas bajo diversas condiciones con 0,1 µg/ml, tal como se indica. Los niveles de IL-12 en el sobrenadante celular se midieron mediante ELISA.
- 45 Figura 21: una ilustración gráfica de la estimulación de células dendríticas derivadas de médula ósea (*bone marrow derived dendritic cells* - BMDC) con OVA/UC-1V150 u OVA/ODN (ODN=oligo-desoxinucleótido).
- Figura 22: una ilustración del espectro UV de un conjugado doble (OVA/UC-1V150/ODN 1043).
- Figura 23: una ilustración de la inducción de IL-12 en BMDC utilizando conjugados de OVA/ODN/UC-1V150. OVA/1043 y OVA/1018 son conjugados de ODN.
- 50 Figura 24: ilustra la conjugación de un agonista de TLR sintético con un componente lipídico de un liposoma. El autoensamblaje del conjugado de TLR acoplado a través de un espaciador-

engarce con un lípido C-15 condujo a la formación de nanopartículas 100 nM. El agonista de TLR y un éster NHS del lípido se sometieron a reacción en cantidades equimolares en DMF y 1 equivalente de trietilamina durante 6 horas. La mezcla de reacción se purificó preparando HPLC bajo condiciones isocráticas en acetonitrilo/agua 50:50. j

- 5 Figura 25: un esquema de un conjugado de agonista de TLR/liposoma. Los liposomas están formados por colesterol:DOPE: DSPC:mPEG2000-DSPE:TLR-DSPE:BODIPY-DOPE 30:30:30:5:5:1,5; DSPE= diesteoilfosfatidiletanolamina; DOPE= dioleoilfosfatidiletanolamina; BODIPY= 6-(((4,4-difluor-5-(2-tienil)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacen-3-il)estiriloxi)acetil)aminohexanamido-DOPE. Colesterol:DOPE: DSPC:DSPE-agonista de TLR:DSPE-mPEG (en relación molar 1:1:1:0,16:0,16) en cloroformo se recogieron en tubos de cultivo de vidrio de 30 ml, se secó bajo una corriente de nitrógeno gas y se desecó en vacío durante un mínimo de 6 horas para eliminar todo el disolvente orgánico residual. La película de lípido seca se hidrató en agua desionizada estéril en un volumen total de 1 ml durante un mínimo de 12 horas. Los liposomas se sometieron a vórtice durante 2-3 minutos para eliminar toda la película de lípido adherida y se sonicaron en un sonicador de baño (ULTRASONIK 28X) durante 2-3 minutos a temperatura ambiente para producir vesículas multilaminares (*multilamellar vesicles* - MLV). Después, las MLV se sonicaron con una sonda Ti (utilizando un sonicador Branson 450 con un ciclo de servicio del 100% y 25 W de potencia de salida) en un baño de hielo y agua durante 1-2 minutos para producir vesículas unilaminares pequeñas (*small unilamellar vesicles* - SUV) tal como indicaba la formación de una solución translúcida clara. La solución se filtró a presión en secuencia a través de membranas de policarbonato nucleopore de 200 y después 100 nm para obtener nanopartículas de liposoma de 100 nm con un factor de polidispersibilidad inferior a 0,1.
- 10
- 15
- 20
- 25 Figura 26: muestra la síntesis de conjugado de lípido WW-109. Primero se añadieron 0,45 mg (1 μ mol) de IV-199 a 100 μ l de una solución 10 mM de DOPE en cloroformo. A esta solución se añadió 0,1 mg de trietilamina de una reserva en cloroformo. La mezcla se sometió a reacción a temperatura ambiente durante 24 horas y el cloroformo se trató en el rotavapor. El residuo sólido blanco se lavó tres veces en 60%/metanol/hexano y se centrifugó para obtener un sólido blanco. La m/z en el espectro de masas era de 1086 y el compuesto tenía una absorción UV máx a 268 nm. Se pueden utilizar fracciones de ácido graso con diversas longitudes de cadena para preparar compuestos análogos, incluyendo ácidos carboxílicos (C₁₄-C₂₂) con uno, dos, tres o cuatro sitios de insaturación, epoxidación, hidroxilación, o una combinación de los mismos, en cualquier lugar posible de la cadena de carbonos del ácido carboxílico. En una realización específica, las fracciones de ácido graso son ácidos carboxílicos C₁₇ con un sitio de insaturación en C₈-C₉. En otra realización específica, las fracciones de ácido graso son ácidos carboxílicos C₁₈ con un sitio de insaturación en C₉-C₁₀. Las fracciones de ácido carboxílico de cada fracción de ácido graso pueden ser iguales o pueden ser diferentes (véase, por ejemplo, la Figura 6).
- 30
- 35
- 40 Figura 27: un esquema de una partícula de sílice con agonistas de TLR enlazados de forma covalente a la misma.
- Figura 28: ejemplos de compuestos para preparar conjugados de la invención o para su uso en los métodos de la invención. Otros conjugados incluyen agonistas de TLR acoplados con seroalbúmina humana, por ejemplo HSA/UC-1V150 o DOPE/UC-1 V199. El UC-1X-51 aumenta los niveles de TNF-alfa al triple (110 ng/ml).
- 45

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que tiene uno o más polipéptidos codificados esencialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como el sinnúmero de genes de región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que definen a su vez las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.
- 50
- 55 Es sabido que la unidad estructural (anticuerpo) de una inmunoglobulina básica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, que es la

principal responsable del reconocimiento antigénico. Los conceptos "cadena ligera variable" (V_L) y "cadena pesada variable" (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

5 Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como modificaciones de diversas formas, incluyendo, por ejemplo, FabF₂, Fab, Fv, Fd, (Fab')₂, un fragmento Fv que sólo contiene las regiones variables de cadena ligera y pesada, un fragmento Fab o (Fab')₂ que contiene las regiones variables y partes de las regiones constantes, un anticuerpo de cadena simple, por ejemplo anticuerpos scFv, injertados con CDR, y similares. La cadena pesada y la cadena ligera de un Fv se pueden derivar del mismo anticuerpo o de diferentes anticuerpos, produciendo así una región Fv quimérica. El anticuerpo puede ser de origen animal (especialmente ratón o rata) o humano, o puede ser quimérico o humanizado. Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" incluye estas formas diversas.

10 Una composición que consiste "esencialmente por completo" en un compuesto particular o en una forma particular de un compuesto (por ejemplo un isómero) es una composición comprende al menos aproximadamente un 90%, y preferentemente al menos aproximadamente un 95%, 99% y 99,9%, de la composición particular, con respecto al peso. Una composición comprende una "mezcla" de compuestos o formas del mismo compuesto cuando cada compuesto (por ejemplo isómero) representa al menos aproximadamente un 10% de la composición, con respecto al peso. Un análogo de purina de la invención o un conjugado del mismo se puede preparar como una sal de ácido o de base, así como en formas de ácido o base libres. En solución, determinados compuestos de la invención pueden estar presentes como zwitteriones, siendo proporcionados contraiones por las propias moléculas de disolvente o por otros iones disueltos o suspendidos en el disolvente.

15 Tal como se utiliza aquí, el término "aislado" se refiere a una preparación *in vitro*, al aislamiento o purificación de una molécula de ácido nucleico, un péptido o proteína u otra molécula que no está asociada a sustancias *in vivo* o está presente en una forma diferente a la encontrada en la naturaleza. Por consiguiente, el término "aislado", cuando se utiliza en relación con un ácido nucleico, como en "oligonucleótido aislado" o "polinucleótido aislado", se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está identificada y separada de al menos un contaminante con el que está asociada normalmente en su origen. El ácido nucleico aislado está presente en una forma o composición que es diferente a la hallada en la naturaleza. En cambio, los ácidos nucleicos no aislados (por ejemplo ADN y ARN) se encuentran en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (por ejemplo un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula huésped cerca de genes próximos; algunas secuencias de ARN (por ejemplo una secuencia de ARNm específica codificadora de una proteína específica), se encuentran en la célula en forma de una mezcla con otros numerosos ARNm que codifican una multitud de proteínas. Por tanto, con respecto a una "molécula de ácido nucleico aislada", que incluye un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de éstos, la "molécula de ácido nucleico aislada" (1) no está asociada con todo o con parte del polinucleótido en el que la "molécula de ácido nucleico aislada" se encuentra en la naturaleza, (2) está unida operativamente a un polinucleótido al que no está unida en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande. La molécula de ácido nucleico aislada puede estar presente en una forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando se va a utilizar una molécula de ácido nucleico para expresar una proteína, el ácido nucleico contiene al menos la cadena sentido o codificadora (es decir, el ácido nucleico puede ser monocatenario), pero puede contener tanto la cadena sentido como la cadena antisentido (es decir, el ácido nucleico puede ser bicatenario).

20 Tal como se utiliza aquí, el término "aminoácido" comprende residuos de aminoácidos naturales (por ejemplo, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Hyl, Hyp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, y Val) en forma D o L, así como aminoácidos no naturales (por ejemplo fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato; ácido hipúrico, ácido octahidroindol-2-carboxílico, estatina, ácido 1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, penicilamina, ornitina, citrulina, metilalanina, para-benzoilfenilalanina, fenilglicina, propargilglicina, sarcosina y terc-butilglicina). El término también incluye aminoácidos naturales y no naturales que portan un grupo protector amino convencional (por ejemplo acetilo o benciloxicarbonilo), así como aminoácidos naturales y no naturales protegidos en el extremo carboxi (por ejemplo como un alquil(C₁-C₆), fenil o bencil éster o amida; o como una metilbencilamida). Los expertos en la técnica conocen otros grupos protectores amino y carboxi adecuados (véase, por ejemplo, T.W. Greene, Protecting Groups In Organic Synthesis; Wiley: Nueva York, 1981, y referencias citadas en dicho documento). Por ejemplo, un aminoácido puede estar unido a la parte restante de un compuesto de fórmula I por el extremo carboxi, por el extremo amino o por cualquier otro punto de unión conveniente, por ejemplo por el azufre de la cisteína.

55 El concepto "receptor tipo Toll" (*toll-like receptor* TLR) se refiere a un miembro de una familia de receptores que se unen a patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns* - PAMP) y facilitan una respuesta inmune en un mamífero. Se conocen diez TLR de mamífero, por ejemplo TLR1-10.

El concepto "agonista de receptor tipo Toll" (agonista de TLR) se refiere a una molécula que se une a un TLR. Los agonistas de TLR sintéticos son compuestos químicos que están diseñados para que se unan a un TLR y activen el receptor. Los ejemplos de agonistas de TLR sintéticos que se proporcionan aquí incluyen "agonista de TLR-7", "agonista de TLR", "agonista de TLR-3" y "agonista de TLR-9". Los agonistas de TLR incluyen imiquimod, resiquimod, broprimina y loxoribina.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "ácido nucleico" se refiere a ADN, ARN, motivos de hibridación monocatenarios, bicatenarios o con mayor agregación y cualquier modificación química de los mismos. Las modificaciones incluyen, de forma no exclusiva, aquellas que proporcionan grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad a las bases de ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico en conjunto. Estas modificaciones incluyen, de forma no exclusiva, ácidos nucleicos de péptido (*peptide nucleic acid* - PNA), modificaciones de grupo fosfodiéster (por ejemplo fosforotioatos, metilfosfonatos), modificaciones de azúcar en posición 2', modificaciones de pirimidina en posición 5, modificaciones de purina en posición 7, modificaciones de purina en posición 8, modificaciones de purina en posición 9, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo- o 5-yodo-uracilo; modificaciones de esqueleto, metilaciones, combinaciones inusuales de emparejamiento de bases tales como isobases, isocitidina e isoguanidina y similares. Los ácidos nucleicos también pueden incluir bases no naturales, por ejemplo nitroindol. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales como formación de caperuza con un BHQ, un fluoróforo u otra fracción.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto primario se modifica produciendo un ácido o una base con el mismo. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, de forma no exclusiva, sales de ácidos inorgánicos u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario del compuesto primario formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como los ácidos acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluensulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos útiles en la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto primario, que contiene una fracción básica o ácida, mediante métodos químicos convencionales. En general, dichas sales se pueden preparar sometiendo a reacción las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiado, en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos; en general son preferentes medios no acuosos, como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 17 edición, Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985) se pueden encontrar listas de sales adecuadas.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea aquí para hacer referencia a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del ámbito del buen juicio médico, son adecuados para ser utilizados en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una toxicidad, irritación o respuesta alérgica excesiva, ni otro problema o complicación en proporción a una relación razonable de beneficio/riesgo.

A no ser que se describa de otro modo, se utilizan las siguientes definiciones: halo o halógeno es flúor, cloro, bromo o yodo. Alquilo, alcoxi, alqueno, alquino, etc. indican tanto grupos de cadena lineal como grupos de cadena ramificada. Sin embargo, la referencia a un grupo individual tal como "propilo" abarca únicamente el grupo de cadena lineal, mientras que para indicar un isómero de cadena ramificada, tal como "isopropilo", se hace referencia específica al mismo. El término "arilo" indica un grupo fenilo o un grupo carbocíclico bicíclico orto-fusionado que tiene aproximadamente de nueve a diez átomos en el anillo, siendo al menos un anillo aromático. El término "het" puede ser heteroarilo, que incluye un grupo unido a través de un carbono de un anillo aromático monocíclico de cinco o seis átomos de anillo consistentes en carbono y uno a cuatro heteroátomos seleccionados en cada caso de entre el grupo consistente en oxígeno no peróxido, azufre y N(X), faltando X o siendo X igual a H, O, alquilo(C₁-C₄), fenilo o bencilo, así como un grupo de un heterociclo bicíclico orto-fusionado de aproximadamente ocho a diez átomos de anillo derivado del mismo, en particular uno derivado de benzo o uno derivado fusionando un dirradical propileno, trimetileno o tetrametileno con el mismo.

Los especialistas en la técnica entenderán que pueden existir compuestos de la invención con un centro quiral que se pueden aislar en formas ópticamente activas y racémicas. Algunos compuestos pueden presentar polimorfismo. Se ha de entender que la presente invención incluye cualquier forma racémica,

5 ópticamente activa, polimórfica o estereoisomérica de un compuesto de la invención, o mezclas de las mismas, que posea las propiedades útiles aquí descritas, sabiéndose en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas (por ejemplo, mediante resolución de la forma racémica por técnicas de recristalización, síntesis de materiales de partida ópticamente activos, síntesis quirál o por separación cromatográfica utilizando una fase estacionaria quirál) y cómo determinar la actividad de agonista utilizando las pruebas estándar aquí descritas; o utilizando otras pruebas similares bien conocidas en la técnica. Los especialistas en la técnica también entenderán que los compuestos aquí descritos incluyen sus diversos tautómeros, que pueden existir en diversos estados de equilibrio entre sí.

10 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye una cantidad de un compuesto útil de la presente invención o una cantidad de la combinación de compuestos reivindicados, por ejemplo para tratar o prevenir la enfermedad o afección, o para tratar los síntomas de la enfermedad o afección, en un huésped. Tal como se utiliza aquí, los términos "tratamiento" o "tratar" incluyen (i) evitar que se produzca una condición patológica (por ejemplo profilaxis); (ii) inhibir la condición patológica o detener su desarrollo; (iii) aliviar la condición patológica; y/o disminuir los síntomas asociados a la condición patológica.

15 Tal como se utiliza aquí, el término "paciente" se refiere a organismos a tratar con los métodos de la presente invención. Estos organismos incluyen, de forma no exclusiva, mamíferos, tales como humanos. En el contexto de la invención, el término "sujeto" se refiere en general a un individuo que va a recibir o que ha recibido tratamiento (por ejemplo, la administración de un compuesto de la invención).

20 Las expresiones "compuesto estable" o "estructura estable" se utilizan para indicar un compuesto que es suficientemente robusto para soportar el aislamiento hasta un grado de pureza útil de una mezcla de reacción, y la formulación en un agente terapéutico eficaz. La presente invención únicamente tiene en cuenta compuestos estables.

Agonistas de TLR y conjugados de la solicitud y usos de los mismos

25 En una realización, la solicitud describe un método terapéutico para la prevención o el tratamiento de una afección o síntoma patológico en un mamífero, como un humano, en el que interviene la actividad de un agonista de TLR cuya acción se desea. El método incluye la administración a un mamífero que lo necesite de una cantidad efectiva de un compuesto de la solicitud o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Ejemplos no limitativos de afecciones o síntomas patológicos que son adecuados para el tratamiento incluyen cánceres, enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, cerebro, piel, articulaciones y otros tejidos, enfermedades bacterianas o virales, enfermedades autoinmunes y el tratamiento de la enfermedad de Crohn. Los compuestos de la solicitud también pueden ser utilizados para preparar vacunas contra bacterias, virus, células cancerosas o péptidos específicos de cáncer, o para aumentar anticuerpos monoclonales anticancerosos, como estimulante del SNC o para la biodefensa. Así, la solicitud describe un compuesto de la invención para su uso en la terapia médica (por ejemplo como agente anticanceroso, para tratar enfermedades antibacterianas, virales, como la hepatitis C y la hepatitis B, para tratar la enfermedad de Crohn, y en general como agente terapéutico para tratar enfermedades inmunológicas). Además, los compuestos de la solicitud pueden prevenir la carcinogénesis, por ejemplo por virus de la hepatitis C y la hepatitis B, y pueden ser utilizados para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento del cáncer, infecciones virales o bacterianas, enfermedad de Crohn y trastornos inmunológicos en un mamífero, tal como un humano.

45 En un aspecto, la presente solicitud describe un uso para tratar una infección viral en un mamífero mediante la administración de un conjugado de agonista de TLR de la invención. La infección viral puede estar causada por un ARN-virus, un producto del ARN-virus que actúa como agonista de TLR y/o un ADN-virus. Un ejemplo de un ADN-virus es el virus de la hepatitis B. En un ejemplo, la infección viral está causada por un coronavirus que provoca Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SRAG), un virus de la hepatitis B o un virus de la hepatitis C.

50 En un aspecto, la presente solicitud describe un uso para tratar el cáncer mediante la administración de una cantidad efectiva de un conjugado de agonista de TLR de la invención. El cáncer puede ser un cáncer sensible al interferón, por ejemplo leucemia, linfoma, mieloma, melanoma o cáncer renal. Los cánceres específicos que pueden ser tratados incluyen melanoma, cáncer superficial de vejiga, queratosis actínicas, neoplasia intraepitelial y carcinoma de piel de células basales, escamoso y similares. Además, el método de la invención incluye el tratamiento de una afección precancerosa, por ejemplo queratosis actínicas o neoplasia intraepitelial, poliposis familiar (pólipos), displasia cervical, cánceres cervicales, cáncer superficial de vejiga y cualquier otro cáncer asociado a infección (por ejemplo linfoma sarcoma de Karposi o leucemia); y similares.

55 En otro aspecto, la presente solicitud describe un uso para tratar una enfermedad autoinmune mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de agonista de TLR de la invención

o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Enfermedades autoinmunes son, por ejemplo, esclerosis múltiple, lupus, artritis reumatoide y similares.

En otro aspecto, la presente solicitud describe un uso para tratar la enfermedad de Crohn mediante la administración de un conjugado de agonista de TLR de la invención.

- 5 Los conjugados de agonista de TLR pueden incluir un polímero de agonista de TLR homofuncional, por ejemplo formado a partir de un agonista de TLR7 o un agonista de TLR3. El agonista de TLR7 puede ser una fracción 7-tia-8-oxoguanosinil (TOG), una fracción 7-desazaguanosinil (7DG), una fracción resiquimod o una fracción imiquimod. En otro aspecto, el conjugado de agonista de TLR puede incluir un polímero de agonista de TLR heterofuncional. El polímero de agonista de TLR heterofuncional puede incluir un agonista de TLR7 y un agonista de TLR3 o un agonista de TLR9 o los tres agonistas. El polímero de agonista de TLR heterofuncional puede incluir un agonista de TLR8 y un agonista de TLR9.

15 La solicitud incluye la conjugación covalente de un agonista de TLR sintético con macromoléculas para obtener, por ejemplo, una forma, un tamaño y una valencia molecular deseados con el fin de optimizar las propiedades inmunológicas del conjugado resultante y/o de dirigir o suministrar el conjugado a células y tejidos deseados. Tal como se describe aquí, los conjugados están diseñados para ser útiles en una variedad de aplicaciones médicas, incluyendo, de forma no exclusiva, asma alérgica, infecciones virales respiratorias (gripe y RSV), lupus y otras enfermedades autoinmunes, y como combinaciones antígeno-adyuvante para vacunas contra el cáncer y enfermedades infecciosas. Los conjugados proporcionan una respuesta inmune óptima limitando al mismo tiempo efectos secundarios sistémicos no deseables, ligando el activador inmune (el agonista de TLR sintético) a una macromolécula mediante un enlace covalente fuerte. La macromolécula puede servir como una entidad de fijación de objetivo y/o como una parte integral de la respuesta inmune, como el antígeno en un conjugado adyuvante-antígeno. Una ventaja principal de la administración de un conjugado estable en un entorno localizado es que, con el tiempo, sólo se liberan cantidades muy pequeñas de agonista de TLR en el entorno sistémico.

- 25 En un aspecto, la macromolécula se selecciona de productos, como proteínas, lípidos o dendrímeros, o de polímeros que tienen grupos amino en sus superficies, como "gránulos amino" de poliestireno, que tienen en cada caso grupos amino primarios disponibles para la conjugación con un engarce tal como SANH, o para la conjugación directa con el agonista de TLR7 sintético. Por ejemplo, después de la conjugación del engarce y la macromolécula, el agonista de TLR7, tal como UC-1V150, se somete a reacción con el éster NHS del conjugado de SANH-macromolécula para obtener un conjugado de agonista de TLR7-SANH-macromolécula.

35 En general, en las instalaciones de cuidado para enfermedades agudas no se utilizan vacunas porque (1) tardan demasiado en actuar y (2) no son eficaces en pacientes con deficiencias inmunitarias. Por ejemplo, las infecciones por *Staphylococcus aureus* (SA) son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados. Los grupos que presentan un riesgo particular son aquellos con inmunosupresión debida a quemaduras, traumatismos, colocación de catéteres, diálisis o edad avanzada en residencias. Además, muchas cepas de SA adquirido en hospitales son resistentes a los antibióticos convencionales.

40 La presente invención supera estas dos barreras al tratamiento. Aquí está previsto el uso de composiciones, incluyendo agonistas de TLR7 sintéticos y conjugados con agonistas de TLR7 sintéticos, en combinación con antígenos bacterianos gram-positivos. En general, los ligandos de TLR7 tienen mala farmacocinética y una rápida absorción y excreción sistémica. Debido a la dispersión sistémica, resultan en síndrome de citoquinas. Los adyuvantes efectivos han de crear un "gradiente inmune" de citoquinas y quimioquinas. En una realización, la conjugación de agonistas de TLR7 sintéticos potentes con macromoléculas aumenta las propiedades de suministro, mejora la farmacocinética y evita la toxicidad sistémica por exposición localizada.

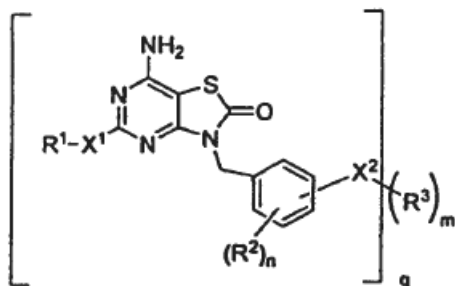
45 En una realización, la invención proporciona una composición para su uso en un método para prevenir o inhibir una infección bacteriana gram-positiva en un mamífero, que incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de una composición que comprende un antígeno bacteriano de una bacteria gram-positiva y una cantidad de un agonista de TLR7 sintético. En otra realización, la invención proporciona un compuesto para su uso en un método para prevenir o inhibir una infección bacteriana gram-positiva en un mamífero, que incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de un agonista de TLR7 sintético conjugado con un antígeno bacteriano gram-positivo. Por ejemplo, un conjugado de 1V150-MSA mantiene su actividad de agonista de TLR7, tiene una mayor potencia y una toxicidad reducida, provoca la activación local de la inmunidad innata e induce una protección inmune dependiente de células T en un plazo de 6 días después de una única vacunación con un antígeno bacteriano.

55 En una realización se administra un agonista de TLR7 sintético junto con uno o más antígenos de *S. aureus* o conjugado con éstos. La Tabla 1 proporciona ejemplos de antígenos para *S. aureus* útiles con agonistas de TLR7 sintéticos, en particular en instalaciones de cuidado para enfermedades agudas. Inesperadamente, las vacunas de la invención pueden proporcionar una respuesta inmune rápida y efectiva.

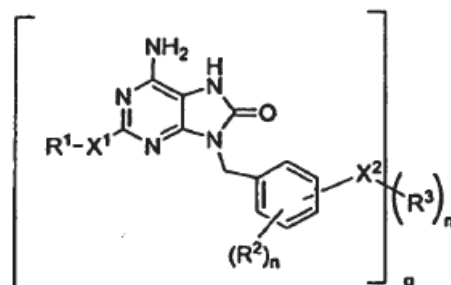
Tabla 1

Inmunógenos de <i>Staphylococcus aureus</i>
Arma
Toxina exfoliativa B
Toxina exfoliativa A
Toxina de síndrome de <i>shock</i> tóxico
Enterotoxina A-E, H-U
Proteína de unión de sialoproteína ósea
Proteína de unión de colágeno
Factor aglutinante A
Factor aglutinante B
α -hemolisina
γ -hemolisina
Proteína A
Factor aglutinante A
Proteína de unión de fibronectina A
Proteína de unión de fibronectina B
Proteína de unión de colágeno
Ácido lipoteicoico
Peptidoglicano
Proteína A
Proteína de unión de fibronectina B
α -hemolisina
Leucocidina de Pantón-Valentine
Proteína de unión de colágeno
Ácido lipoteicoico
Peptidoglicano
Polisacárido capsular
Factor aglutinante A
Proteína A
Proteínas de unión de fibronectina

En un aspecto, la solicitud describe los siguientes conjugados



un compuesto de fórmula (II)



un compuesto de fórmula (III)

5

Tiazolopirimidinas

Purinas

$X^1 = -O-$, $-S-$, o NR^c ; siendo R^c hidrógeno, alquilo(C_{1-10}) o alquilo(C_{1-10}) sustituido con cicloalquilo(C_{3-6}), o R^c y R^1 , junto con el átomo de nitrógeno, pueden formar un anillo heterocíclico sustituido o no sustituido, siendo los sustituyentes hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno (C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}) o ciano;

10

siendo R^1 alquilo(C_{1-10}), alquilo(C_{1-10}) sustituido, arilo(C_{6-10}) o arilo(C_{6-10}) sustituido, heterociclilo(C_{5-9}), heterociclilo(C_{5-9}) sustituido; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;

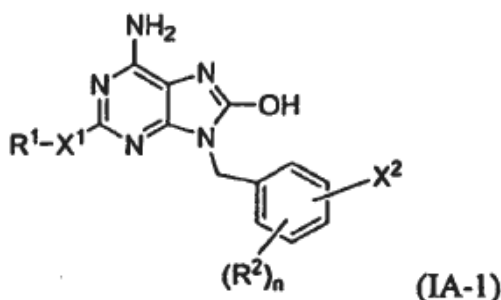
15

cada R^2 es, independientemente, hidrógeno, $-OH$, alquilo(C_{1-6}), alquilo(C_{1-6}) sustituido, alcoxi(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}) sustituido, $-C(O)$ -alquilo(C_{1-6}) (alcanoilo), $-C(O)$ -alquilo(C_{1-6}) sustituido, $-C(O)$ -arilo(C_{6-10}) (aróilo), $-C(O)$ -arilo(C_{6-10}) sustituido, $-C(O)OH$ (carboxilo), $-C(O)O$ alquilo(C_{1-6}) (alcoxi-carbonilo), $-C(O)O$ alquilo(C_{1-6}) sustituido, $-NR^aR^b$, $-C(O)NR^aR^b$ (carbamoilo), $-O-C(O)NR^aR^b$, $-alquilen(C_{1-6})-NR^aR^b$, $-alquilen(C_{1-6})-C(O)NR^aR^b$, halo, nitro o ciano;

cada R^a y R^b es, independientemente, hidrógeno, alquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6}), haloalquilo(C_{1-6}), cicloalquil(C_{3-6})alquilo(C_{1-6}), alcanoilo(C_{1-6}), hidroxialquilo(C_{1-6}), arilo, arilalquilo(C_{1-6}), Het, Het-alquilo(C_{1-6}) o alcocarbonilo(C_{1-6}); siendo X^2 un enlace o un grupo enlazante;

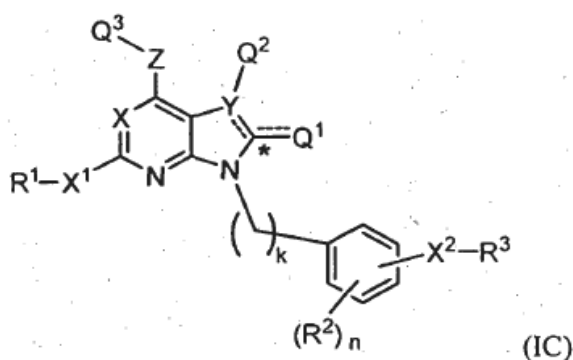
- R^3 es una macromolécula; n es 1, 2, 3, o 4; m es 1 o 2; q tiene un valor de 1 a 1.000, 10^4 , 10^5 , 10^6 o más; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los grupos macromoleculares pueden incluir moléculas orgánicas compuestas por carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo o combinaciones de éstos, que no son nocivas para los tejidos corporales (por ejemplo no son tóxicos y/o no provocan inflamación), y pueden incluir, de forma no exclusiva, dendrímeros, proteínas, péptidos, lípidos y sus formulaciones (por ejemplo nanopartículas de liposomas), con o sin engarces (grupos X^2), y polímeros aminomodificados, como gránulos de poliestireno, así como α -galactosilceramidas (véase la Figura 1).

Los compuestos de la solicitud se pueden preparar utilizando los compuestos de fórmula (IA-1):



- donde X^2 es un grupo que puede reaccionar para formar un grupo específico de compuestos, por ejemplo los dados a conocer en la Patente US 6.329.381 (Kurimoto y col.), o formar un enlace con un grupo de enlace o reaccionar para formar un enlace con una macromolécula, y las variables restantes son tal como se definen más arriba en relación con la fórmula (IA). Ejemplos no limitativos de macromoléculas incluyen macromoléculas con cadenas laterales que aumentan la solubilidad, por ejemplo grupos que contienen anillos morfolino, piperidino, pirrolidino o piperazino y similares; aminoácidos, polímeros de aminoácidos (proteínas o péptidos), por ejemplo dipéptidos o tripéptidos y similares; carbohidratos (polisacáridos), nucleótidos tales como, por ejemplo, PNA, ARN y ADN y similares; polímeros de materiales orgánicos, por ejemplo polietilenglicol, polilactida y similares; lípidos monoméricos y poliméricos; nanopartículas orgánicas insolubles; sustancias corporales no tóxicas, por ejemplo células, lípidos, vitaminas, cofactores, antígenos, por ejemplo microbios, por ejemplo virus, bacterias, hongos y similares. Los antígenos pueden incluir organismos completos inactivados o subcomponentes de los mismos, por ejemplo células y similares.

En un aspecto, un compuesto de la solicitud tiene la fórmula (IC):



donde

- X es N o CR^x , con R^x hidrógeno, halógeno, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido o heteroalquilo no sustituido;
- Y es S o N;
- las líneas discontinuas (- - -) indican enlaces opcionales; y
- cuando el enlace entre Y y el carbono marcado con un asterisco es un enlace doble, Q^2 no está presente;
- cuando el enlace entre Q^1 y el carbono marcado con un asterisco es un enlace doble, Q^1 es O, S, NY^1 , o NNY^2Y^3 ; y

- cuando el enlace entre Q^1 y el carbono marcado con un asterisco es un enlace simple, Q^1 es hidrógeno, ciano, nitro, $O-Y^2$, $S-Y^2$, NY^1Y^2 , o $NY^2NY^3Y^4$; donde Y^1 es hidrógeno, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido, $-C(=O)$ -alquilo sustituido, $-C(=O)$ -alquilo no sustituido, $-C(=O)O$ -alquilo sustituido, $-C(=O)O$ -alquilo no sustituido, ciano, nitro, hidroxilo u $O-Y^2$;
- 5 Y^2 , Y^3 , e Y^4 son en cada caso independientemente hidrógeno, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido;
- 10 Z es O, S, o NY^5 , siendo Y^5 hidrógeno, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido;
- Q^2 y Q^3 son en cada caso independientemente hidrógeno, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo no sustituido;
- 15 X^1 es $-O-$, $-S-$, o $-NR^c-$;
- R^c es hidrógeno, alquilo(C_{1-10}) o alquilo(C_{1-10}) sustituido, o R^c y R^1 , junto con el átomo de nitrógeno, pueden formar un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido;
- R^1 es hidrógeno, alquilo(C_{1-10}), alquilo(C_{1-10}) sustituido, arilo(C_{6-10}) o arilo(C_{6-10}) sustituido o un anillo heterocíclico(C_{5-9}) o heterocíclico(C_{5-9}) sustituido;
- 20 cada R^2 es, independientemente, hidrógeno, $-OH$, alquilo(C_{1-6}), alquilo(C_{1-6}) sustituido, alcoxi(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}) sustituido, $-C(O)$ -alquilo(C_{1-6}) (alcanoílo), $-C(O)$ -alquilo(C_{1-6}) sustituido, $-C(O)$ -arilo(C_{6-10}) (aróilo), $-C(O)$ -arilo(C_{6-10}) sustituido, $-C(O)OH$ (carboxilo), $-C(O)O$ alquilo(C_{1-6}) (alcoxicarbonilo), $-C(O)O$ alquilo(C_{1-6}) sustituido, $-NR^aR^b$, $-C(O)NR^aR^b$ (carbamoílo), $-O-C(O)NR^aR^b$, $-alquilen(C_{1-6})-NR^aR^b$, $-alquilen(C_{1-6})-C(O)NR^aR^b$, halo, nitro o ciano;
- 25 cada R^a y R^b es, independientemente, hidrógeno, alquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-8}), heteroalquilo(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), haloalquilo(C_{1-6}), cicloalquil(C_{3-8})alquilo(C_{1-6}), alcanoílo(C_{1-6}), hidroxialquilo(C_{1-6}), arilo, arilalquilo(C_{1-6}), Het, Het-alquilo(C_{1-6}) o alcoxicarbonilo(C_{1-6});
- siendo los sustituyentes para cualquiera de los grupos alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, amino, alcoxi, alcanoílo, arilo, heteroarilo o heterocíclico uno o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6) de entre hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquilen(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquilen(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno, heterociclo (como piperidinilo o morfolinilo) o arilo;
- 30 X^2 es un enlace o un grupo enlazante;
- k es 0, 1, 2, 3 o 4;
- n es 0, 1, 2, 3 o 4; y
- 35 R^3 es una macromolécula que incluye una célula, virus, vitamina, cofactor, péptido, proteína, molécula de ácido nucleico, lípido, gránulo o partícula, como un gránulo de poliestireno o nanopartículas, o un dendrímero;
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo sus hidratos.
- 40 En determinados ejemplos, los grupos X^2-R^3 pueden formar un engarce con una segunda fracción de la fórmula (IC), formando un dímero. Por ejemplo, el engarce puede ser cualquier engarce aquí descrito, como un arilo o heteroarilo divalente, bis-amida arilo, bis-amida heteroarilo, bis-hidrazida arilo, bis-hidrazida heteroarilo, o similares. Alternativamente, Q^1 puede formar un engarce con una segunda fracción de la fórmula (IC), formando un dímero mediante un enlace disulfuro. Véase por ejemplo la Figura 28.
- 45 Cuando los compuestos son lo suficientemente básicos o ácidos para formar sales de ácido o base, puede resultar apropiado utilizar los compuestos en forma de sales. Ejemplos de sales aceptables son sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, incluyendo sales clorhidrato, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

- Se pueden obtener sales aceptables utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo sometiendo a reacción un compuesto suficientemente básico, como una amina, con un ácido adecuado que aporte un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden preparar sales de metales alcalinos (por ejemplo de sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo de calcio) de ácidos carboxílicos.
- 5 El término "alquilo" incluye grupos alquilo(C₁₋₁₀) lineales o ramificados, por ejemplo metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, 1-metilpropilo, 3-metilbutilo, hexilo y similares.
- El concepto "alquilo inferior" incluye grupos alquilo(C₁₋₆) lineales o ramificados, por ejemplo metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo y similares.
- 10 El término "alquileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada (por ejemplo etileno: -CH₂-CH₂).
- Un cicloalquilo(C₃₋₇) incluye grupos tales como ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares, y un grupo cicloalquilo(C₃₋₇) sustituido con alquilo preferentemente con un grupo alquilo(C₁₋₆) lineal o ramificado tal como metilo, etilo, propilo, butilo o pentilo, y un grupo cicloalquilo(C₅₋₇) tal como ciclopentilo o ciclohexilo y similares.
- 15 El concepto "alcoxi inferior" incluye grupos alcoxi(C₁₋₆), como metoxi, etoxi o propoxi y similares.
- El concepto "alcanoílo inferior" incluye grupos alcanoílo(C₁₋₆), como formilo, acetilo, propanoílo, butanoílo, pentanoílo o hexanoílo y similares.
- 20 Un aroílo(C₇₋₁₁) incluye grupos tales como benzoílo o naftoílo.
- El concepto "alcoxicarbonilo inferior" incluye grupos alcoxicarbonilo(C₂₋₇) como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo o propoxicarbonilo y similares.
- El concepto "grupo alquilamino inferior" significa un grupo amino sustituido con un grupo alquilo(C₁₋₆), como metilamino, etilamino, propilamino, butilamino y similares.
- 25 El concepto "grupo di(alquilo inferior)amino" significa un grupo amino sustituido con el mismo o diferente grupo alquilo(C₁₋₆) (por ejemplo dimetilamino, dietilamino, etilmetilamino).
- El concepto "grupo alquilcarbamoílo inferior" significa un grupo carbamoílo sustituido con un grupo alquilo(C₁₋₆) (por ejemplo metilcarbamoílo, etilcarbamoílo, propilcarbamoílo, butilcarbamoílo).
- 30 El concepto "grupo di(alquilcarbamoílo) inferior" significa un grupo carbamoílo sustituido por el mismo o diferente grupo alquilo(C₁₋₆) (por ejemplo dimetilcarbamoílo, dietilcarbamoílo, etilmetilcarbamoílo).
- El concepto "átomo halógeno" significa un átomo halógeno, como un átomo de flúor, de cloro, de bromo o de yodo.
- El término "arilo" se refiere a un grupo arilo(C₆₋₁₀) monocíclico o a un arilo fusionado con un grupo cíclico, como fenilo, indenilo o naftilo y similares.
- 35 El concepto "heterocíclico" o "heterociclo" se refiere a grupos heterocíclicos saturados monocíclicos o a un grupo heterocíclico fusionado o monocíclico insaturado que contiene al menos un heteroátomo, por ejemplo 0-3 átomos de nitrógeno (-NR^d-, siendo R^d igual a H, alquilo, o Y² tal como se define aquí), 0-1 átomos de oxígeno (-O-) y 0-1 átomos de azufre (-S-). Ejemplos no limitativos de grupos heterocíclicos monocíclicos saturados incluyen grupos heterocíclicos saturados de 5 o 6 miembros, como tetrahydrofuranilo, pirrolidinilo, morfolinilo, piperidilo, piperazinilo o pirazolidinilo. Ejemplos no limitativos de grupos heterocíclicos monocíclicos insaturados incluyen grupos heterocíclicos insaturados de 5 o 6 miembros, como furilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, tienilo, piridilo o pirimidinilo. Ejemplos no limitativos de grupos heterocíclicos fusionados insaturados incluyen grupos heterocíclicos bicíclicos insaturados, como indolilo, isoindolilo, quinolilo, benzotiazolilo, cromanilo, benzofuranilo y similares. Un grupo Het puede ser un grupo heterocíclico saturado o un grupo heterocíclico insaturado, como un grupo heteroarilo.
- 40
- 45 R^c y R¹, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, pueden formar un anillo heterocíclico. Ejemplos no limitativos de anillos heterocíclicos incluyen anillos heterocíclicos saturados de 5 o 6 miembros, como 1-pirrolidinilo, 4-morfolinilo, 1-piperidilo, 1-piperazinilo o 1-pirazolidinilo, anillos heterocíclicos insaturados de 5 o 6 miembros, como 1-imidazolilo, y similares.

Los grupos heterocíclicos, alquilo, arilo de R^1 pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, iguales o diferentes, que incluyen alquilo inferior; cicloalquilo, hidroxilo; hidroxialquileno(C_{1-6}), como hidroximetilo, 2-hidroxietilo o 3-hidroxipropilo; alcoxi inferior; alcoxi(C_{1-6})alquilo(C_{1-6}), como 2-metoxietilo, 2-etoxietilo o 3-metoxipropilo; amino; alquilamino; dialquilamino; ciano; nitro; acilo; carboxilo; 5
alcoxicarbonilo inferior; halógeno; mercapto; alquiltio(C_{1-6}), como metiltío, etiltío, propiltío o butiltío; alquiltio(C_{1-6}) sustituido, como metoxietiltío, metiltioetiltío, hidroxietiltío o cloroetiltío; arilo; arilo(C_{6-10})
10 monocíclico o fusionado con un ciclo sustituido, como 4-hidroxifenilo, 4-metoxifenilo, 4-fluorofenilo, 4-clorofenilo o 3,4-diclorofenilo; heterocíclico insaturado de 5-6 miembros, como furilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, tienilo, piridilo o pirimidinilo; y heterocíclico insaturado bicíclico, como indolilo, isoindolilo, quinolilo, benzotiazolilo, cromanilo, benzofuranilo o ftalimino. En determinados ejemplos, uno o más de los grupos arriba indicados pueden ser excluidos expresamente como sustituyente de otros grupos diversos de las fórmulas.

En algunos ejemplos, el anillo de cinco miembros de la fórmula es un anillo tiazol, por ejemplo donde Y de la fórmula IA arriba mostrada es S y Q^2 no está presente.

15 Los grupos heterocíclicos, alquilo, arilo de R^2 pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, iguales o diferentes, que incluyen hidroxilo; alcoxi(C_{1-6}), como metoxi, etoxi o propoxi; carboxilo; alcoxicarbonilo(C_{2-7}), como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo o propoxicarbonilo, y halógeno.

Los grupos heterocíclicos, alquilo o arilo de R^c pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, iguales o diferentes, que incluyen cicloalquilo(C_{3-6}); hidroxilo; alcoxi(C_{1-6}); amino; ciano; arilo; 20
arilo sustituido, como 4-hidroxifenilo, 4-metoxifenilo, 4-clorofenilo o 3,4-diclorofenilo; nitro y halógeno.

El anillo heterocíclico formado junto con R^c y R^1 y el átomo de nitrógeno al que están unidos puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, sustituyentes, iguales o diferentes, que incluyen alquilo(C_{1-6}); hidroxialquileno(C_{1-6}); alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}); hidroxilo; alcoxi(C_{1-6}); y ciano.

25 En algunos ejemplos, cuando Q^1 es $O-Y^2$, Y^2 no es hidrógeno.

Un valor específico de X es N.

Otro valor específico de X es CH.

Evidentemente, únicamente uno de los dos enlaces indicados con líneas discontinuas puede estar presente en una molécula de un compuesto de la fórmula indicada. En un ejemplo, el enlace entre Y y el carbono 30
marcado con asterisco es un enlace doble. En otro ejemplo, el enlace entre Q^1 y el carbono marcado con asterisco es un enlace doble.

Un valor específico de Q^1 es O.

Otro valor específico de Q^1 es S.

Otro valor específico de Q^1 es NY^1 , por ejemplo =NH.

35 Otro valor específico de Q^1 es NNY^2Y^3 .

En un ejemplo, el enlace entre Q^1 y el carbono marcado con asterisco es un enlace simple.

Un valor específico de Q^1 es hidrógeno.

Otro valor específico de Q^1 es NH_2 .

Otro valor específico de Q^1 es $O-Y^2$.

40 Un valor específico de Y^1 es hidrógeno.

Otro valor específico de Y^1 es alquilo, por ejemplo alquilo(C_1-C_6), como metilo.

Otro valor específico de Y^1 es arilo, como fenilo.

Un valor específico de cada uno de Y^2 , Y^3 e Y^4 es hidrógeno.

Otro valor específico de cada uno de Y^2 , Y^3 e Y^4 (independientemente) es alquilo, por ejemplo alquilo(C_1-C_6), 45
como metilo.

Otro valor específico de cada uno de Y^2 , Y^3 e Y^4 (independientemente) es arilo, como fenilo.

Un valor específico de Z es O.

Otro valor específico de Z es S.

Otro valor específico de Z es NY^5 , siendo Y^5 igual a hidrógeno, metilo o fenilo.

5 Otro valor específico de Q^2 es hidrógeno.

Otro valor específico de Q^2 es metilo o fenilo.

Un valor específico de Q^3 es hidrógeno.

Otro valor específico de Q^3 es metilo o fenilo.

Un valor específico de X^1 es un átomo de azufre, un átomo de oxígeno o $-NR^c$.

10 Otro valor específico de X^1 es un átomo de azufre.

Otro valor específico de X^1 es un átomo de oxígeno.

Otro valor específico de X^1 es $-NR^c$.

Otro valor específico de X^1 es $-NH$.

Un valor específico de Y es N.

15 Otro valor específico de Y es S.

Un valor específico de R^c es hidrógeno, alquilo(C_{1-4}) o alquilo(C_{1-4}) sustituido.

En un valor específico de R^1 y R^c juntos, éstos forman un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido.

20 Otro valor específico de R^1 y R^c juntos es un anillo morfolino, piperidino, pirrolidino o piperazino, sustituido o no sustituido.

Un valor específico de R^1 es hidrógeno, alquilo(C_{1-4}) o alquilo(C_{1-4}) sustituido.

25 Otro valor específico de R^1 es 2-hidroxietilo, 3-hidroxiopropilo, 4-hidroxibutilo, 2-aminoetilo, 3-aminopropilo, 4-aminobutilo, metoximetilo, 2-metoxietilo, 3-metoxipropilo, etoximetilo, 2-etoxietilo, metiltimetilo, 2-metiltioetilo, 3-metiltiopropilo, 2-fluoroetilo, 3-fluoropropilo, 2,2,2-trifluoroetilo, cianometilo, 2-cianoetilo, 3-cianopropilo, metoxicarbonilmetilo, 2-metoxicarboniletilo, 3-metoxicarbonilpropilo, bencilo, fenetilo, 4-piridilmetilo, ciclohexilmetilo, 2-tienilmetilo, 4-metoxifenilmetilo, 4-hidroxifenilmetilo, 4-fluorofenilmetilo o 4-clorofenilmetilo.

Otro valor específico de R^1 es hidrógeno, CH_3 -, CH_3-CH_2 -, $CH_3CH_2CH_2$ -, hidroxialquileno(C_{1-4}) o alcoxi(C_{1-4})alquileno(C_{1-4}).

Otro valor específico de R^1 es hidrógeno, CH_3 -, CH_3-CH_2 -, $CH_3-O-CH_2CH_2$ - o $CH_3-CH_2-O-CH_2CH_2$ -.

30 Un valor específico de R^2 es hidrógeno, halógeno o alquilo(C_{1-4}).

Otro valor específico de R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, CH_3 - o CH_3-CH_2 -.

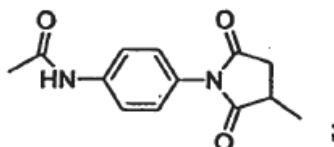
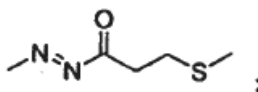
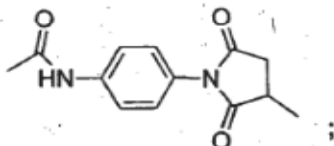
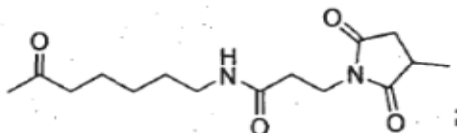
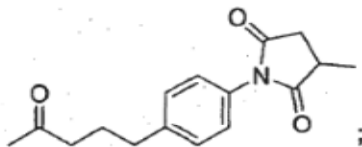
Algunos sustituyentes específicos para la sustitución de los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos son hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), amino, ciano, halógeno o arilo.

35 Un valor específico de X_2 es un enlace o una cadena que tiene hasta aproximadamente 24 átomos; seleccionándose los átomos de entre el grupo consistente en carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno no peróxido y fósforo.

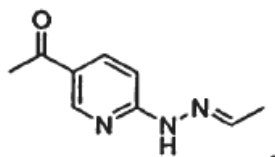
Otro valor específico de X^2 es un enlace o una cadena que tiene entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12 átomos.

Otro valor específico de X^2 es un enlace o una cadena que tiene entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9 átomos.

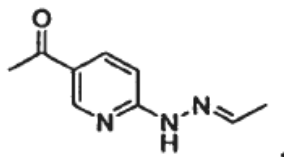
Otro valor específico de X_2 es



5



Otro valor específico de X^2 es



10 En determinados ejemplos, el engarce o el grupo X^2 no es un engarce dado a conocer en la Publicación de Solicitud PCT nº WO 2007/024707. Adicionalmente, en algunos ejemplos, R^3 no es un auxiliar dado a conocer en la Publicación de Solicitud PCT nº WO 2007/024707.

Una macromolécula específica es un aminoácido, un carbohidrato, un péptido, una proteína, un antígeno, un ácido nucleico, un lípido, un dendrímero, una sustancia corporal o una célula tal como un microbio.

Un péptido específico tiene de 2 a aproximadamente 20 residuos aminoácidos.

15 Otro péptido específico tiene de 10 a aproximadamente 20 residuos aminoácidos.

Una macromolécula específica incluye un carbohidrato.

Un ácido nucleico específico es ADN, ARN o PNA.

Una macromolécula específica es una célula, lípido, vitamina, lípido o cofactor.

Un antígeno específico es un microbio.

Un microbio específico es un virus, bacteria u hongo.

- 5 Otro microbio específico es un virus o una bacteria.

Bacterias específicas son *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Salmonella* o *Staphylococcus*.

Salmonella específicas son *S. typhimurium* o *S. enteritidis*.

Staphylococcus específicos incluyen *S. aureus*.

- 10 Virus específicos son ARN-virus, incluyendo RSV y virus de la gripe, un producto del ARN-virus o un ADN-virus, incluyendo el virus del herpes.

Un ADN-virus específico es el virus de la hepatitis B.

- 15 En otros ejemplos, la macromolécula no es un aminoácido, un carbohidrato, un péptido, un antígeno tal como un microbio, por ejemplo un virus (por ejemplo ARN-virus como VIS, virus de la hepatitis C o un coronavirus, un producto del ARN-virus, un ADN-virus como el virus de la hepatitis B), hongos o bacterias como *Bacillus anthracis* (ántrax), *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, o *Salmonella* (por ejemplo, typhimurium o enteritidis), un ácido nucleico tal como ADN, ARN o una sustancia corporal tal como una célula o lípido.

Un valor específico de k es 0. Otro valor específico de k es 1. Otro valor específico de k es 2. En algunas realizaciones, k no es 1.

- 20 Compuestos específicos de la solicitud tienen la fórmula general

IA-L-A¹;

IA-L-(A¹)₂;

IA-L-A¹-A¹;

IA-L-A¹-L-A¹;

- 25 (IA)₂-L-A¹-A¹;

(IA)₂-L-A¹-L-A¹;

(IA)₂-L-A¹; o

(IA)₂-L-(A¹)₂;

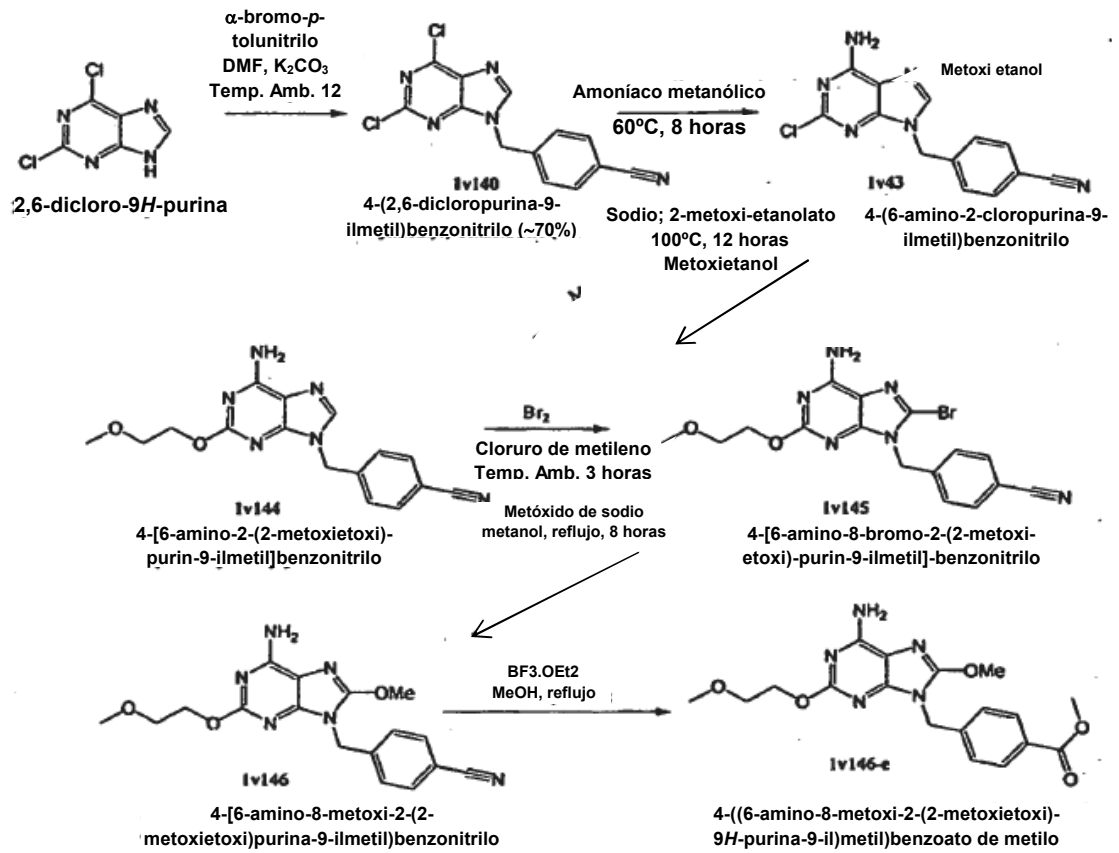
- 30 siendo IA tal como se da a conocer aquí; L no está presente o es un grupo de engarce; y cada grupo A¹ representa independientemente una macromolécula.

La solicitud da a conocer composiciones de un compuesto de la invención opcionalmente en combinación con otros agentes activos, por ejemplo ribavirina, mizoribina y micofenolato mofetilo. También se conocen otros ejemplos no limitativos que se describen en la solicitud de patente publicada US 20050004144.

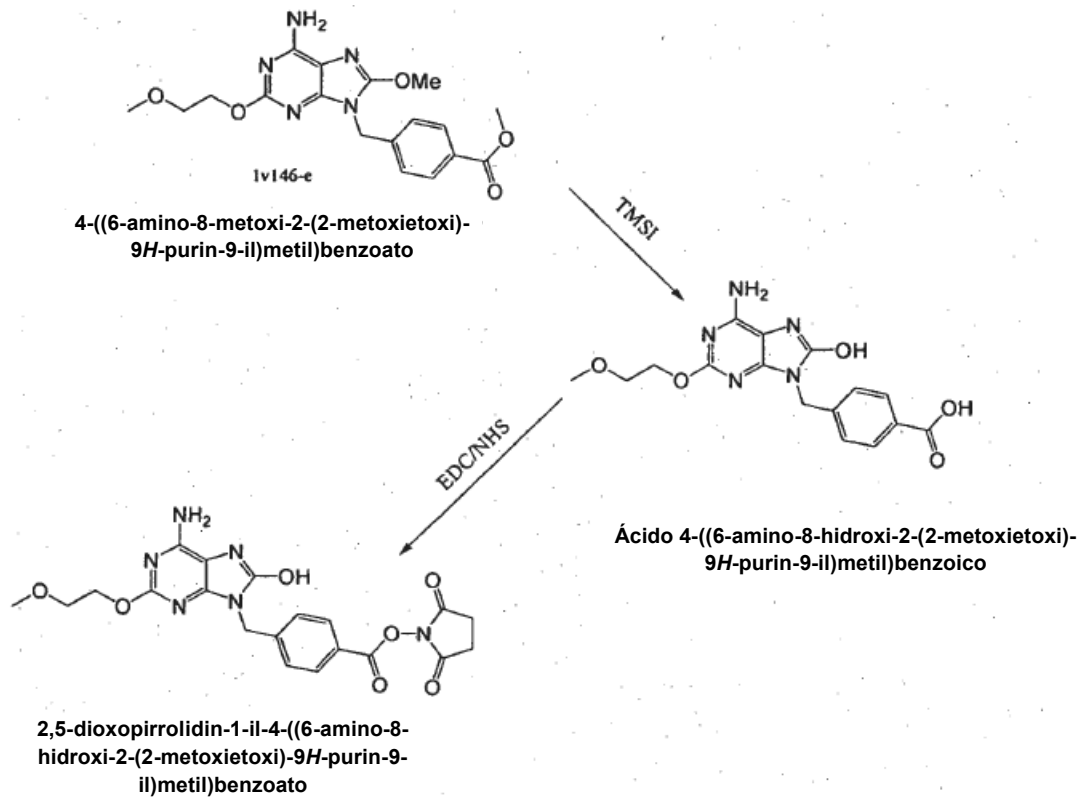
- 35 También se proporcionan como ejemplos adicionales de la solicitud procesos para preparar compuestos de la solicitud para preparar productos intermedios útiles para la preparación de compuestos de la solicitud. También se proporcionan como ejemplos adicionales de la solicitud productos intermedios para la preparación de compuestos de la solicitud.

- 40 Por ejemplo, los compuestos (conjugados) de la solicitud se pueden preparar utilizando métodos de síntesis estándar conocidos en la técnica. Más abajo se ilustra una síntesis general de éster y aldehído. El UC-1V150 se sintetizó en siete pasos a partir de 2,6-dicloropurina. El grupo aldehído libre en la fracción de bencilo del UC-1V150 nos ha permitido acoplar el agonista con muchas entidades químicas auxiliares diferentes, incluyendo proteínas, oligonucleótidos, moléculas aromáticas, lípidos, virus y células, a través de una molécula de engarce que contenía una hidrazina o un grupo amino.

Síntesis General



Síntesis de éster NHS



En general, la concentración efectiva (EC₅₀) de cada compuesto seguía una distribución en campana, siendo las dosis mayores inhibitoras. La estimulación máxima se produjo entre 10 y 1.000 nM. Las moléculas adyuvantes acopladas de forma covalente con el agonista de TLR mantenían la actividad, pero con valores EC₅₀ generalmente más bajos. El acoplamiento de UC-1V199 con ovoalbúmina de pollo prácticamente duplicó la supervivencia media de 22 a 35 días después de la provocación tumoral subcutánea en comparación con la ovoalbúmina de pollo sola.

Por consiguiente, el enlace covalente de un agonista de TLR7 con un antígeno tumoral estimuló la producción de citoquina de DC y protegió los ratones contra la provocación tumoral. El uso de un agonista de TLR7 adecuado que mantiene sus propiedades de estimulación inmunológica bajo condiciones fisiológicas después de su acoplamiento con una macromolécula, como un antígeno, puede resultar útil para el desarrollo de una vacuna *in situ* en la terapia de tumores sólidos.

Diversas purinas, piridinas e imidazoquinolinas, con pesos moleculares de 200-400 kD, han demostrado activar TLR7 y compuestos que eran ligandos de TLR7 específicos eran de 100 a 1.000 veces más potentes que el imiquimod en una base molar (Lee y col., *infra*). Dado que estos agonistas de TLR7 son estructuralmente muy similares a componentes normales de nucleótidos, es muy poco probable que induzcan una reacción inmunológica hapténica después de una administración reiterada.

Un TLR7 pharmacore basado en adenina puede tener que estar unido de forma covalente con un "grupo auxiliar" (macromolécula) para promover la absorción en los endosomas de células dendríticas, donde se expresa TLR7, y para retener el agonista de TLR. Por consiguiente, se preparó el agonista de TLR7 UC-1V150 y se acopló por su función aldehído y un engarce con grupos amino libres en diversas proteínas, incluyendo albúmina de ratón (MSA) (Figura 3). Los conjugados eran 100 veces más potentes *in vitro* e *in vivo* que el análogo de adenina no acoplado. Además, la administración intrapulmonar del conjugado de albúmina (UC-1V150/MSA) a ratones indujo una producción de citoquinas local en el líquido de lavado alveolar bronquial (*bronchial alveolar lavage fluid* - BALF) sin liberación de citoquina sistémica. Por el contrario, el suministro del fármaco no ligado a las vías respiratorias disparó rápidamente la liberación de citoquinas en la corriente sanguínea.

En una realización, un agonista de TLR7 aumenta al máximo la producción de citoquinas estimuladoras de Th1 (interferones e IL-12) en comparación con TNF α e IL-1. El TLR7 está localizado sobre las superficies interiores de las vesículas endosómicas que son sintetizadas constantemente y experimentan maduración en DC. Por ejemplo, para prevenir el asma es preferible un agonista de TLR estable y potente que se desplaza a los endosomas tempranos de células dendríticas e induce principalmente interferones de Tipo I. Un agonista de TLR se unió de forma covalente con un grupo auxiliar de fosfolípido previendo que el conjugado UC-1V199/L (Figura 6) se insertaría rápidamente y de forma estable en membranas lipídicas de las células, incluyendo en las vesículas endosómicas. Sorprendentemente, una cantidad tan baja como 30 picomolar UC-1V199/L indujo la síntesis de citoquinas en células mononucleares de ratón derivadas de médula ósea. Las Figuras 7-8 muestran datos de la síntesis de IL-12.

Los ligandos de TLR7 que son purinas o imidazoquinolinas tienen una propiedad peculiar, esto es una curva dosis-respuesta bifásica. En altas concentraciones, el fármaco no induce síntesis de citoquinas. El efecto bifásico se observa en células dendríticas altamente purificadas y parece ser autónomo con respecto a la célula. Sin embargo, la notable potencia del UC-1V199/L ha posibilitado el reexamen del fenómeno, utilizando concentraciones de fármaco farmacológicamente aceptables (Figura 9). La producción máxima de citoquinas se observó con UC-1V199/L 10 nM, mientras que las concentraciones mayores inducían progresivamente menos liberación de IL-12 (y TNF).

Es sabido que, si se mantienen altas concentraciones de agonistas de TLR7, éstos inducen una refractariedad a la reestimulación de TLR que puede durar 24 horas o más. Aparentemente, este complejo sistema de regulación forma parte de un mecanismo fiable que evita la autodestrucción de células y tejidos durante la respuesta inflamatoria. Por consiguiente, era interesante determinar si algunas concentraciones de UC-1V199/L que no inducían una síntesis significativa de citoquinas podrían no obstante inducir "tolerancia al TLR". De hecho, al exponer células mononucleares derivadas de médula ósea a una concentración no activadora de UC-1V199/L (1 mM) y reestimarlas 24 horas después con el mismo compuesto, con UC-1V150 o con pam3Cis (P3C, un activador de TLR2), éstas mostraron una notable disminución de la respuesta a las citoquinas. En cambio, las células tratadas con UC-1V199/L mantuvieron su nivel de respuesta a ligandos de TLR3 y TLR4, que van a través de la vía TRIF (resultados no mostrados). Los experimentos preliminares indicaban que también se inducía una falta de respuesta *in vivo*. Por consiguiente, la administración diaria de UC-1V199/L, y fármacos relacionados, puede suprimir la inflamación inducida por estímulos dependientes de MiD88, sin los efectos secundarios sistémicos asociados a la activación de TLR.

En un aspecto, los conjugados de la solicitud pueden ser útiles para prevenir, inhibir o tratar el asma. El asma se caracteriza por episodios de constricción intermitentes y reversibles de las vías respiratorias, hiperplasia de los músculos lisos bronquiales e inflamación crónica. La enfermedad atópica predispone al asma, pero la

mitad de los pacientes afectados no son atópicos. Otros factores de riesgo ambientales para el asma incluyen el tabaco y los contaminantes atmosféricos. Además, los accesos de la enfermedad en pacientes asmáticos afectados no sólo pueden estar provocados por alérgenos, sino también por sustancias irritantes de las vías respiratorias, cambios de temperatura e infecciones.

- 5 El desarrollo inicial de una respuesta alérgica está regulado en parte por un equilibrio entre los linfocitos Th1 y Th2 y sus respectivas citoquinas, especialmente los interferones y la IL-4. La vacunación de animales con un alérgeno junto con un agonista de TLR7 o TLR9 expande preferentemente células de memoria Th1 específicas del alérgeno. Por consiguiente, la inmunización subsiguiente con antígeno junto con un adyuvante con propensión a Th2 no provoca fácilmente una respuesta a la IgE. Los ratones vacunados con antígeno y
10 agonistas de TLR7 o TLR9 eran resistentes al asma experimental.

- Para el tratamiento del asma con agonistas de TLR se requiere un enfoque diferente al de la prevención del asma. En pacientes afectados, las vías respiratorias y los tejidos pulmonares ya están infiltrados con una población diversa de células inflamatorias, incluyendo muchos subgrupos de linfocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y neutrófilos. En esta situación, los agonistas de TLR pueden exacerbar
15 potencialmente la enfermedad aumentando la liberación de mediadores inflamatorios, como TNF-alfa e IL-1. De hecho, la capacidad de diversos agentes microbianos para activar los TLR puede explicar por qué provocan ataques asmáticos.

- Un agonista de TLR para la prevención del asma preferentemente está limitado a los pulmones, pero también aumenta al máximo la producción de citoquinas estimuladoras de Th1 (interferones e IL-2), en comparación
20 con TNF-alfa e IL-1. Tanto el TLR7 como el TLR9 están localizados sobre las superficies interiores de las vesículas endosómicas que son sintetizadas constantemente y experimentan maduración en células dendríticas. Los oligonucleótidos activadores de TLR9 que son oligonucleótidos de fosfodiéster agregados permanecen más tiempo en las vesículas endosómicas tempranas y, en consecuencia, inducen más interferones de Tipo I que los oligonucleótidos de fosforotioato no agregados, que van a vesículas maduras.
25 Los resultados indican que la organización espacial de los agonistas de TLR rige su transmisión y su patrón de síntesis de citoquinas inducida. Para prevenir el asma es preferible un agonista de TLR estable, potente y caracterizado molecularmente, que se dirige a los endosomas tempranos de células dendríticas e induce principalmente interferones de Tipo I.

- Para estudiar el efecto de conjugados de la solucitud sobre el asma alérgica se induce una inflamación de las vías respiratorias sensibilizando ratones por una inyección subcutánea de 20 µg de ovoalbúmina absorbida
30 con 500 µg de alumbre por ratón, en solución salina, el día 0 y el día 7. Los días 16 y 21, los ratones son provocados vía i.n. con 5 µg de ovoalbúmina por ratón. Los conjugados se administran vía i.n., p.o. o i.v. en diferentes momentos antes de la primera provocación con ovoalbúmina el día 16. Veinticuatro horas después de la última provocación (día 22) se mide la capacidad de respuesta de las vías respiratorias, los ratones son sacrificados y se recogen células BALF y muestras de pulmón y bazo. Como controles se utilizan ratones
35 naive y ratones sensibilizados con respecto a la ovoalbúmina/alumbre. La cantidad total de células en el BALF se recuenta y se tiñe con Wright-Giemsa para determinar la cantidad de eosinófilos, linfocitos, neutrófilos y mastocitos. Los niveles de citoquinas en el BALF se determinan mediante ensayos Luminex. La capacidad de respuesta de las vías respiratorias a la metacolina se evalúa 24 horas después de la última provocación utilizando un pletismógrafo de cuerpo entero y cámara simple. Para controlar la capacidad de
40 respuesta de las vías respiratorias se utiliza el Penh, un valor adimensional que presenta una buena correlación con la resistencia pulmonar medida por pletismografía de dos cámaras convencional.

- Los compuestos de esta solucitud se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz a un sujeto que requiere tratamiento. La administración de las composiciones de la invención puede tener lugar por cualquier
45 vía de administración adecuada, en particular vía parenteral, por ejemplo intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraestomal, intracraneal, intramuscular o subcutánea. Dicha administración puede tener lugar en forma de una única inyección de bolo, múltiples inyecciones o como una infusión de corta o larga duración. También se pueden emplear dispositivos implantables (por ejemplo bombas de infusión implantables) para el suministro parenteral periódico a lo largo del tiempo de
50 dosis equivalentes o variables de la formulación particular. Para dicha administración parenteral, los compuestos se formulan preferentemente como solución estéril en agua u otro disolvente o mezcla de disolventes adecuados. La solución puede contener otras sustancias, como sales, azúcares (en particular glucosa o manitol), para hacer la solución isotónica con la sangre, agentes tampón como los ácidos acético, cítrico y/o fosfórico y sus sales de sodio, así como conservantes.

- 55 Los compuestos de la invención se pueden formular como composiciones farmacéuticas y administrar a un huésped mamífero, tal como un paciente humano, en diversas formas adaptadas a la vía de administración elegida, es decir, vía oral o parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Por consiguiente, los presentes compuestos pueden ser administrados sistémicamente, por ejemplo vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente inerte o un soporte

comestible asimilable. Pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina dura o blanda, pueden estar comprimidos en tabletas o se pueden incorporar directamente en el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede combinar con uno o más excipientes y utilizar en forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Dichas composiciones y preparaciones deberían contener al menos un 0,1% de compuesto activo. Evidentemente, el porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variar y puede oscilar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosis eficaz.

Las tabletas, pastillas, píldoras, cápsulas y similares pueden contener también los siguientes ingredientes: aglutinantes como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo, o se puede añadir un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria, o aromatizante de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, además de los materiales del tipo arriba indicado también puede contener un vehículo líquido, como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros materiales diversos pueden estar presentes como revestimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, las tabletas, píldoras o cápsulas pueden estar revestidas con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil- y propil-parabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aromatizante de cereza o naranja. Evidentemente, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y esencialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y dispositivos de liberación controlada.

El compuesto activo también puede ser administrado vía intravenosa o intraperitoneal, mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezclada con un agente tensioactivo no tóxico. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de las mismas y en aceites. Bajo condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el desarrollo de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones acuosas estériles o dispersiones de polvos estériles que comprenden el ingrediente activo y que están adaptadas para la preparación magistral de soluciones o dispersiones estériles inyectables o administrables por infusión, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final ha de ser estéril, fluida y estable bajo las condiciones de producción y almacenamiento. El soporte o vehículo líquido puede ser un disolvente o un medio de dispersión líquido, incluyendo, por ejemplo, agua, etanol, un polioliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, glicerilésteres no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, o usando agentes tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser llevada a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes de retraso de absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes arriba enumerados, según sea necesario, seguido de esterilización por filtro. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferentes son las técnicas de secado en vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones previamente filtradas de forma estéril.

Para la administración tópica, los presentes compuestos se pueden aplicar en forma pura, es decir, cuando están en estado líquido. Sin embargo, en general será deseable aplicarlos a la piel en forma de composiciones o formulaciones en combinación con un soporte dermatológicamente aceptable, que puede consistir en un sólido o un líquido.

Los soportes sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos, como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los soportes líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en los que los presentes compuestos se pueden disolver o dispersar en niveles efectivos, opcionalmente con ayuda de agentes tensioactivos no tóxicos. También se pueden añadir adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las

composiciones líquidas resultantes se pueden aplicar desde tampones absorbentes, utilizar para impregnar vendajes y otros apósitos, o pulverizar sobre el área afectada utilizando pulverizadores de aerosol de tipo bomba.

5 También es posible utilizar espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados, con soportes líquidos para formar pastas untables, geles, ungüentos, jabones y similares, para una aplicación directa en la piel del usuario.

10 Además, en una realización, la invención proporciona diversas formulaciones de dosificación de los conjugados para administración por inhalación. Por ejemplo, se pueden diseñar formulaciones para uso en aerosol en dispositivos tales como inhaladores dosificadores, inhaladores de polvo seco y nebulizadores.

En la técnica se conocen ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden ser utilizadas para administrar los compuestos de la invención en la piel; véase, por ejemplo, Jacquet y col. (Pat. US nº 4.608.392), Geria (Pat. US nº 4.992.478), Smith y col. (Pat. US nº 4.559.157) y Wortzman (Pat. US nº 4.820.508).

15 Las dosis útiles de los compuestos de la invención se pueden determinar comparando su actividad *in vitro* e *in vivo* en modelos animales. Los métodos para extrapolar las dosis efectivas en ratones y otros animales a humanos son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, la Pat. US nº 4.938.949. La capacidad de un compuesto de la invención para actuar como agonista de TLR se puede determinar utilizando modelos farmacológicos bien conocidos en la técnica, incluyendo los procesos dados a conocer por Lee y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 6646 (2003).

20 En general, la concentración del compuesto o de los compuestos de la invención en una composición líquida, como una loción, oscilará entre aproximadamente el 0,1 y el 25% en peso, preferentemente entre aproximadamente el 0,5 y el 10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo oscilará entre aproximadamente el 0,1 y el 5% en peso, preferentemente entre aproximadamente el 0,5 y el 2,5% en peso.

30 El ingrediente activo se puede administrar para alcanzar concentraciones en plasma máximas de compuesto activo entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 75 μM , preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 μM , de forma especialmente preferente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 30 μM . Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la inyección intravenosa de una solución del 0,05 al 5% del ingrediente activo, opcionalmente en solución salina, o la administración oral en forma de un bolo que contiene aproximadamente 1-100 mg del ingrediente activo. Los niveles deseables en sangre se pueden mantener mediante infusión continua para proporcionar aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg o mediante infusiones intermitentes que contienen aproximadamente 0,4-15 mg/kg del ingrediente o los ingredientes activos.

35 La cantidad del compuesto, o de una sal o derivado activo del mismo, necesaria para el uso en un tratamiento variará no sólo en función de la sal particular seleccionada, sino también de la vía de administración, la naturaleza de la afección tratada y la edad y el estado del paciente, y finalmente estará a discreción del médico o clínico que ordena el tratamiento. No obstante, una dosis adecuada oscilará en general entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo entre aproximadamente 10 y 40 aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal al día, por ejemplo entre 3 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del receptor al día, preferentemente entre 6 y 90 mg/kg/día, de forma especialmente preferente entre 15 y 60 mg/kg/día.

45 El compuesto se administra convenientemente en forma de dosis unitarias que contienen, por ejemplo, de 5 a 1.000 mg, convenientemente de 10 a 750 mg, de forma especialmente conveniente de 50 a 500 mg del ingrediente activo por forma de dosis unitaria.

50 La dosis deseada se puede presentar convenientemente en una única dosis o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La propia subdosis puede estar dividida, por ejemplo en una serie de administraciones discretas separadas por intervalos libres; como múltiples inhalaciones desde un insuflador o mediante la aplicación de múltiples gotas en el ojo. La dosis, y quizá la frecuencia de las dosis, también variará en función de la edad, el peso, el estado y la respuesta del paciente individual. En general, la dosis diaria total de uno o más compuestos de fórmula (I), para las afecciones aquí descritas, puede oscilar entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 5.000 mg, en dosis unitarias o divididas. Preferentemente, una dosis diaria debería oscilar entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 4.000 mg, de forma especialmente preferente entre 500 y 3.000 mg, en dosis unitarias o divididas, por ejemplo 750 mg de compuesto 55 administrado vía oral cada 6 horas. Esto permite alcanzar niveles en plasma de aproximadamente 500-750

μM , que pueden ser eficaces para matar células cancerosas. En la gestión del paciente, la terapia debería iniciarse con una dosis baja y aumentar ésta después en función de la respuesta general del paciente.

- 5 Tal como se describe más arriba, las composiciones que contienen un compuesto de la invención son útiles para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección, por ejemplo en humanos u otros mamíferos (por ejemplo animales bovinos, caninos, equinos, felinos, ovinos y porcinos), y quizá también en otros animales. Dependiendo del compuesto particular, la composición será útil por ejemplo para tratar cáncer, una infección, aumentar la inmunidad adaptativa (por ejemplo producción de anticuerpos, activación de células T, etc.), y vacunas, y/o para estimular el sistema nervioso central.

La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

10 Ejemplo I

Aquí se proporcionan procesos para preparar compuestos de fórmula (I) como realizaciones adicionales de la invención, que se ilustran mediante los siguientes procedimientos en los que los significados de los grupos genéricos son tal como se indican más arriba, a no ser que se señale algo distinto.

- 15 Química general. Los reactivos y disolventes se adquirieron de Aldrich, Milwaukee, WI. Los puntos de fusión no corregidos se determinaron en un aparato de punto de fusión de capilares Laboratory Device Mel-Temp II. Los espectros de resonancia magnética nuclear se registraron en un espectrofotómetro Varian Unity 500 NMR a 499,8 MHz o en un espectrofotómetro Varian Mercury NMR a 400,06 MHz. Los desplazamientos químicos se registraron en ppm en la escala de la referencia indicada. El Department of Chemistry UCSD, San Diego, CA llevó a cabo espectros de masas de bucle de iones positivos y negativos. NuMega Resonance
20 Labs, San Diego, CA llevó a cabo análisis elementales. La cromatografía en columna se llevó a cabo en E Merck gel de sílice (malla 230-400) con el sistema disolvente indicado. La cromatografía en capa fina (*thin layer chromatography* - TLC) se llevó a cabo en placas 60 F-254 de gel de sílice (EM Reagents).

- 25 Preparación de 4-(2,6-dicloropurin-9-ilmetil)benzonitrilo. Se disuelve 2,6-dicloro-9H-purina (16 mmol) en DMF (50 ml) y se añade carbonato de potasio (50 mmol). Luego se añade α -bromo-*p*-tolunitrilo (22 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Después de filtración para eliminar sales inorgánicas insolubles, el filtrado se vierte en agua (1500 ml) y se extrae con acetato de etilo (2 x 400 ml), se seca sobre sulfato de magnesio y se evapora, para obtener un residuo que se somete a cromatografía flash en gel de sílice utilizando acetato de etilo/acetona/hexanos 1:2:10. Rendimiento 3,33 g (69%). UV, NMR y MS son coherentes con la asignación de estructura.

- 30 Preparación de 4-(6-amino-2-cloropurin-9-ilmetil)benzonitrilo. El producto arriba indicado (1,9 g) se dispone en un recipiente de reacción de acero y se añade amoníaco metanólico (80 ml, 7N). El recipiente sellado se calienta a 60°C durante 12 horas, se enfría con hielo y se filtra el producto sólido. Rendimiento 1,09 g. UV, NMR y MS son coherentes con la asignación de estructura.

- 35 Preparación de 4-[6-amino-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo. Se prepara una sal sódica de 2-metoxietanol disolviendo metal sodio (81 mg) en 2-metoxietanol (30 ml) con calor. A esta solución se añade el producto del ejemplo 2 (1,0 g) disuelto en metoxietanol (300 ml, con calor). La mezcla de reacción se calienta durante 8 horas a una temperatura del baño de 115°C, se concentra en vacío hasta cerca de la sequedad y el residuo se divide entre acetato de etilo y agua. Una cromatografía flash en gel de sílice utilizando 5% metanol en diclorometano da como resultado 763 mg de producto. La NMR es coherente con la asignación de
40 estructura.

- 45 Preparación de 4-[6-amino-8-bromo-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo. El producto inmediatamente anterior (700 mg) se disuelve en diclorometano (400 ml) y se añade bromo (7 ml) gota a gota. La mezcla se agita una noche a temperatura ambiente y se extrae con una disolución acuosa de tiosulfato de sodio (2 l 0,1M) y después con bicarbonato de sodio acuoso (500 ml, saturado). El residuo de la capa orgánica se cromatografía en gel de sílice utilizando 3% metanol en diclorometano para obtener 460 mg de producto de bromo. NMR, UV y MS son coherentes con la asignación de estructura.

- 50 Preparación de 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo. Se prepara metóxido de sodio por reacción de metal sodio (81 mg) en metanol seco (30 ml). El producto inmediatamente anterior (700 mg) se disuelve en dimetoxietano seco y la temperatura se aumenta a 100°C. Después de una noche de reacción, la mezcla se concentra en vacío y el residuo se cromatografía en sílice utilizando 5% metanol en diclorometano. Rendimiento 120 mg. La NMR es coherente con la asignación de estructura.

Preparación de hidruro de N,N'-(dimetiletilendiamino)aluminio-litio. Este agente reductor utilizado para convertir el nitrilo en la función aldehído se prepara esencialmente tal como se describe en Bull. Korean Chem. Soc., 23:1697 (2002). Se prepara una solución 0,5 M en THF seco.

5 Preparación de 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzaldehído. Se disuelve 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo (100 mg) en THF seco (3 ml) y se enfría a 0°C bajo argón. El reactivo de hidruro de aluminio preparado más arriba (0,72 ml) se añade al matraz de reacción y la mezcla se agita a 0-5°C durante 1 hora y después se extingue mediante adición de HCl 3M. Luego se extrae la mezcla con acetato de etilo seguido por diclorometano, y se concentra en vacío para obtener 85 mg. La NMR es coherente con la asignación de estructura.

10 Preparación de 4-[6-amino-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzaldehído (UC-1V150). El producto inmediatamente anterior (800 mg) se combina con yoduro de sodio (504 mg) y acetonitrilo (40 ml), y después se añade lentamente clorotrimetilsilano (0,5 ml). La mezcla se calienta a 70°C durante 3,5 horas, se enfría y se filtra. El producto sólido se lava con agua y después con éter para obtener 406 mg. NMR, UV y MS son coherentes con la asignación de estructura. Este material es adecuado para reacciones de conjugación entre engarces y macromoléculas.

15 Preparación de 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzoato de metilo. El procedimiento es conforme a la descripción de Jayachitra y col., Synth. Comm., 33: 3461 (2003). Se disuelve 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo (1 mmol) en metanol seco (5 ml) y después se añade a la solución BF₃ eterato (4 mmol) recién destilado. La mezcla resultante se somete a reflujo bajo argón durante 20 horas. El disolvente se retira en vacío, el residuo se recoge en diclorometano (10 ml) y se extrae con bicarbonato de sodio acuoso diluido (2 x 10 ml), y la capa orgánica se seca sobre sulfato de magnesio. Después de evaporación, el producto se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando 5% metanol en diclorometano para obtener 0,8 mmol.

20

Preparación de ácido 4-[6-amino-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]-benzoico. Se combina 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzoato (100 mg) con yoduro de sodio (63 mg) y acetonitrilo (10 ml), y después se añade lentamente clorotrimetilsilano (120 ml). La mezcla se calienta a 70°C durante 6 horas, se enfría y se filtra. El producto sólido se lava con agua y después con éter para obtener 51 mg.

25 Preparación de 4-[6-amino-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo. Se disuelve 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzoato (2 mmol) en diclorometano o dioxano (10 ml) y se añade EDC (2 mmol). A esta solución se añade N-hidroxisuccinimida (2 mmol) y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se lleva a sequedad en vacío y el producto crudo se purifica mediante cromatografía en gel de sílice para obtener 2 mmol de producto, que es adecuado para reacciones de conjugación en las que intervienen aminas primarias.

30

Ejemplo II

Se acopló UC-1V 150 de forma covalente con MSA previamente modificada con un engarce de succinimidil 6-hidrazin-nicotinamida acetona hidrazona (SANH) para obtener una molécula estable con un espectro UV alterado de forma característica. El conjugado de UC-1V150/MSA se identificó mediante un pico de absorción UV a 342 nm debido a la formación de hidrazona, mientras que el SANH sólo se absorbía a 322 nm. La cuantificación de moléculas de UC-1V150 conjugadas por MSA se extrapoló a partir de una curva estándar de UC-1V150-SANH (Figura 1). Consecuentemente, los conjugados de UC-1V150/MSA se obtuvieron en una relación aproximadamente 5:1. Los estudios biológicos aquí presentados se realizaron utilizando UC-1V150/MSA 5:1.

35

40 Modificación de MSA con SANH. 200 µl de MSA (25 mg/ml) se mezclaron con 100 µl de tampón de conjugación (NaPi 1M, pH = 7,2) y 690 ml de PBS. A la solución de proteína se añadieron 844 µg de SANH en 10 µl de DMF (exceso molar en un factor 40 con respecto a la MSA) (la concentración final de MSA en la mezcla de reacción es de 5 mg/ml). Después de mezclar suavemente, la reacción continuó a temperatura ambiente durante 2 horas. Para eliminar el exceso de SANH, la mezcla de reacción se cargó en una columna NAP-10 equilibrada con PBS y la MSA modificada se eluyó con 1,5 ml de PBS.

45

Unión de IV150 a MSA modificada con SANH. 460 mg de IV150 disuelto en 10 ml de DMF se añadieron a MSA modificada con SANH y la mezcla de reacción se incubó a TA una noche. Para eliminar el exceso de IV150, la mezcla de reacción se concentró en primer lugar a 1 ml utilizando una columna micro-spin (Millipore: BIOMAX 5K) y se cargó en una columna NAP-10 tal como se menciona más arriba. También se conjugaron agonistas de TLR7 con oligodesoxinucleótidos (ODN) (Figuras 20-21), un virus (Figuras 18-19), y con un componente lípido que se puede incorporar después en un liposoma (Figuras 24-25).

50

Síntesis de agonistas de TLR7 regulados espacialmente. Cada conjugado se prepara mediante técnicas estándar bien conocidas en la química de la bioconjugación. La caracterización de cada uno mediante métodos UV, LC/MS y PAGE determina la "valencia" o relación de agonista de TLR con respecto a su grupo auxiliar (macromolécula). A partir de esta información, se estiman fácilmente el tamaño y la forma de los conjugados mediante técnicas de modelado. La diversidad de tamaño, forma y valencia de los conjugados se introduce a través de la selección de la macromolécula, representada en el esquema estructural como R3.

55

Por ejemplo, cuando R3 es un dendrímero, tal como la variedad de poli(amidoamina) común, la cantidad de grupos funcionales superficiales para la unión del agonista de TLR se define precisamente según el número de puntos de ramificación o generaciones de dicho dendrímero particular. Una primera generación (G1) tiene 8 grupos amino superficiales, una G2 tiene 16, etc., lo que resulta en un alto nivel de control de la valencia y el tamaño de los conjugados (véase la Figura 2). Adicionalmente, algunas nanopartículas de dendrímero pueden contener tanto un ligando de fijación de objetivo como el agonista de TLR7. Los conjugados de agonista de TLR7-lípido también pueden tener una variedad de "valencias", dependiendo de la selección de los lípidos. Por ejemplo, el potente conjugado UV-1V199/L (Figura 6) se preparó acoplado un derivado carboxi del agonista de TLR7 (UC-1V199) con el grupo etanolamino de una dioleanilfosfatidiletanolamina (DOPE) comercial.

Estos conjugados de lípido se formulan en varias nanopartículas de liposoma mediante combinación con colesterol, DOPE y otros lípidos para producir partículas con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 100 nm (Figuras 24-25). Los hexágonos de la figura representan UC-1V199/L y agonista de TLR7 relacionado con colas de fosfolípido.

Se ha comprobado que los agonistas de TLR7 y dímeros, así como los conjugados de TLR, presentan liberación de citoquinas y/o actividad de citoquinas *in vivo* de acuerdo con la determinación a través de ensayos tales como los aquí descritos. Por ejemplo, han demostrado actividad todas las siguientes sustancias: imiquimod, bropirimina, UC-1V138, UC-1V136, UC-1V150, UC-1X105, UC-1V199, UC-1W236, UC-1X51, UC-1W247, UC-1X113, UC-1V199/L, UC-1V150/BSA, conjugados de UC-1V150 con o sin engarce y MSA, OVA, viriones, y/u ODN, conjugados de UC-1V199 y DOPE, sílice, lípido, o esporas irradiadas, y conjugados de UC-1V1043 y UC-1V1018 con OVA.

Ejemplo III

Materiales y métodos

Evaluación de compuestos *in vitro*. La capacidad de los conjugados de TLR7 para estimular y/o inhibir la producción de citoquinas se evalúa en células mononucleares derivadas de médula ósea murina (*bone marrow derived mononuclear cells* - BMDM), muy ricas en células dendríticas, así como en células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMC) humana. Las BMDM se disponen en placas de 96 pocillos y se tratan por triplicado con vehículo o con diversas dosis partiendo de 10 μ M diluidas, bajando en incrementos de un factor 3 hasta concentraciones picomolares. Después de 24 horas, los sobrenadantes se recogen y ensayan en relación con hasta 30 citoquinas diferentes, quimioquinas y otros mediadores, utilizando un sistema de ensayo de gránulos Luminex, y reactivos comerciales. Los resultados ELISA de citoquinas/quimioquinas se complementan con medidas de la expresión de ARNm cuantitativa y con análisis de fosfoproteína bidimensionales, para comprender mejor el alcance y el mecanismo de la inducción de tolerancia. En el momento de la recogida del sobrenadante, los medios son sustituidos en los pocillos por MTT, como evaluación colorimétrica de la supervivencia celular. Las PBMC humanas se aíslan de paquetes de sangre comerciales y se tratan de modo similar.

Para evaluar el tráfico de los dendrímeros y nanoliposomas conjugados con agonista de TLR, las nanopartículas respectivas se cargan o modifican con un fluorocromo. La localización subcelular se determina microscópicamente, en algunos casos en células que han sido tratadas con inhibidores de maduración endosómica.

Para comparar las actividades antiinflamatorias de los conjugados de TLR7 con diferentes grupos auxiliares, las BMDM se tratan primero con los compuestos más potentes a concentraciones previamente determinadas que tenían efectos mínimos en la estimulación de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1). Después de 24 horas, el medio se sustituye y las células se provocan con ligandos activadores de diferentes miembros de la familia de los TLR (Pam3Cys para TLR2, poli(I:C) para TLR3, LPS para TLR4, flagelina para TLR5, Malp-2 para TLR6, UC-1V150 para TLR7, R848 para TLR7/8, oligonucleótidos CpG para TLR9, y similares) en concentraciones que inducen eficazmente la producción de citoquinas en células con tratamiento simulado. Las células se evalúan mediante inmunoensayo múltiple, PCR cuantitativa y transferencia de fosfoproteína. Para entender mejor la cinética de inducción y mantenimiento de tolerancia, también se provocan células cebadas con conjugado de TLR7 en diferentes intervalos de tiempo y se analizan en cuanto al patrón de producción de citoquinas.

Evaluación de compuestos *in vivo*. Aquí se evalúa la producción líquida de lavado alveolar bronquial (BALF) frente a las citoquinas sistémicas después de la administración en las vías respiratorias de ratones. A unos ratones C57BL/6 hembra emparejados por edades y anestesiados se les administran vía nasal (i.n.), oral (p.o.) o intravenosa (i.v.) diversas cantidades de los conjugados de TLR7 tal como se describe más arriba, o los liposomas o dendrímeros en vehículos apropiados. Después de la recuperación en diferentes momentos, se recogen suero y BALF y se analizan en cuanto a citoquinas y quimioquinas mediante un ensayo Luminex.

Los pesos, temperaturas y patrones de absorción de fluido de los animales tratados se registran como sucedáneo clínico de un "síndrome de citoquinas" sistémico.

Experimentos posteriores evalúan la capacidad de los diferentes agentes para producir refractariedad local y sistémica (tolerancia a TLR) a la activación de TLR después de una administración de una alta dosis i.n., p.o. o i.v., de acuerdo con la determinación de citoquinas en suero y BALF. Se seleccionan altas dosis de los diversos conjugados de TLR7, que no inducen una producción significativa de citoquinas *in vivo* ni signos clínicos de síndrome de citoquinas. Se tratan ratones con las altas dosis seleccionadas administradas por las diferentes vías de administración, y después son provocados con activadores de diferentes TLR en diferentes momentos. Luego se recogen y analizan suero y BALF y se registran los síntomas clínicos. Las actividades antiinflamatorias de los conjugados se confirman con un modelo de *shock* letal previamente utilizado para estudiar LPS y CpG. En este modelo, ratones Balb/c a los que previamente se les ha administrado D-galactosamina vía i.p. sucumben después de una provocación sistémica con diferentes activadores de TLR, debido a la estimulación de citoquinas y el daño hepático. Los fármacos antiinflamatorios activos no logran inducir síntomas clínicos en animales sensibilizados y también evitará el *shock* causado por otros ligandos de TLR. Con un desenlace definido, este modelo es especialmente útil para determinar la cinética y duración de la tolerancia a TLR.

Ejemplo IV

Materiales y métodos

Ratones. De Harlan West Coast (Germantown, CA) se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra (5-6 semanas de edad) y de The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) se compraron ratones A/J hembra (6-8 semanas de edad). Los ratones A/J se utilizaron para infección con la cepa Sterne de *B. anthracis* (Kenney y col., J. Infect. Dis., 190:774 (2004)). Los ratones se criaron y mantuvieron bajo condiciones estándar en la Universidad de California en la San Diego Animal Facility, que está autorizada por la American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care. Todos los protocolos animales recibieron la aprobación previa por el Institutional Review Board. Para el estudio de la gripe HaN1 se obtuvieron ratones BALB/c hembra (16-18 g) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) y se mantuvieron en el Laboratory Animal Research Center de la Universidad del Estado de Utah, autorizado por la American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care.

Estimulación *in vitro* de BMDM. BMDM aisladas de diversas cepas de ratón se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células por pocillo. Los compuestos se añadieron a cultivos de 10 días de antigüedad a una concentración final entre 0,01 y 10 μ M o tal como se indica de otro modo. Después de 24 horas de incubación, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y analizaron en cuanto a inducciones de citoquinas mediante ELISA en sándwich (BD Pharmingen, San Diego, CA) o mediante ensayo Luminex múltiple (Austin, TX) utilizando el *kit* personalizado Beadlyte Mouse MultiCytokine (Upstate, Charlottesville, VA, y eBiosciences, San Diego, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Administración de compuestos a ratones. A ratones C57BL/6 hembra emparejados por edad se les inyectaron 100 μ l de solución salina que contenía UC-1V150 o UC-1V150/MSA, que incluían en cada caso el equivalente de 0,38-38 nmol del farmacore a través de la vena caudal. Para la administración intrapulmonar, los ratones fueron anestesiados con solución i.p. de Avertin y afeitados alrededor del área del cuello. Se expuso la tráquea con una pequeña incisión y se inyectaron 50 μ l de solución salina que contenía diversas cantidades de UC-1V 150/MSA o el fármaco no conjugado. Después de la recuperación en diferentes momentos, se recogieron suero y BALF y se analizaron en cuanto a IL-6, IL-12p40, IFN- γ , RANTES y MCP-1 mediante un ensayo Luminex. En otros experimentos, los ratones fueron anestesiados con una solución intramuscular de ketamina/sileno y se les administró la misma cantidad de UC-1V150/MSA en dosis i.t. de 50 μ l o dosis i.n. de 20 μ l. Dado que en el BALF se observaron niveles similares de citoquinas 24 horas después de la administración mediante cualquiera de los dos métodos, en los estudios con modelos infecciosos se utilizó la vía i.n., más conveniente.

Infección de ratones A/J con esporas de *B. anthracis*. Se prepararon esporas de la cepa Sterne de *B. anthracis* (pXO1⁺pXO2⁺) tal como se describe más arriba (Sabet y col., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 47:369 (2006); Guidi-Rontani y col., Mol. Microbiol., 42:931 (2001)). Las esporas purificadas se conservaron en PBS entre 1×10^8 y 4×10^8 cfu/ml a 4°C. Antes de la infección, las esporas se calentaron a 65°C durante 30 minutos para iniciar la germinación. Se anestesiaron ratones A/J vía intramuscular con una solución de ketamina/xileno y se les administraron vía i.n. 0,75 nmol de UC-1V150 o UC-1V150/MSA por ratón 1 día antes de infectarlos con ántrax. Los ratones control recibieron sólo una solución salina o una solución salina que contenía MSA en cantidades equivalentes a las de UC-1V 150/MSA. La infección se llevó a cabo vía i.n. con 2×10^5 a 8×10^5 esporas de *B. anthracis* en un volumen de 20 ml. Se observó la supervivencia durante 13 días, ya que la mayoría de los ratones tratados con solución salina murieron en 3-6 días. Se obtuvieron resultados de ocho ratones por grupo.

Infección de ratones Balb/c con virus de la gripe. En los Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA) se obtuvo un virus de la gripe A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1). El virus se propagó dos veces en células renales caninas Madin Darbi (*Madin Darbi canine kidney* - MDCK) y además se pasó 7 veces por ratones para hacerlo virulento, seguido de otro paso por cultivo celular para amplificarlo. Los ratones fueron anestesiados vía i.p. con ketamina (100 mg/kg) e infectados vía i.n. con el virus en una cantidad de aproximadamente $10^{5,0}$ dosis infecciosas de cultivo celular por ratón, en un volumen de inóculo de 50 μ l. Veinticuatro horas antes de la exposición al virus, se administró una sola dosis intranasal de 75 μ l de solución salina sola o de solución salina que contenía UC-1V10/MSA, hasta 5 nmol por ratón. Se hizo un seguimiento de la supervivencia durante 21 días de diez ratones infectados por grupo tratado y 20 animales de control con placebo.

Estadística. Los niveles de citoquinas se compararon mediante el ensayo U de Mann Whitney con $p \leq 0,05$ para determinar la significancia estadística. Para comparar las diferencias en la supervivencia se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y pruebas log rank utilizando el *software* GraphPad Prism versión 4.0c (San Diego, CA).

15 *Resultados*

Potente liberación de citoquinas *in vitro* e *in vivo* en respuesta a conjugados de UC-1V 150/MSA. La incubación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) exclusivamente con UC-1V150m estimuló la liberación de citoquinas (Figura 10). Cuando se conjugaron con MSA se detectaron niveles similares o mayores de citoquinas con una concentración equivalente 10 veces menor del agonista de TLR7. Los experimentos con transformantes de TLR, realizados tal como se describe más arriba, confirmaron que el UC-1V150, similar al compuesto que carece de la modificación de aldehído (UC-1V136), era un agonista de TLR7 específico (Lee y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:1828 (2006)). Después de una inyección i.v. en ratones, el UC-1V150 indujo niveles de citoquinas en suero que alcanzaron un valor máximo aproximadamente 2 horas después de la inyección y luego disminuyeron rápidamente hasta cerca de niveles basales (datos no mostrados). La comparación de los perfiles de producción de citoquinas del UC-1V150 frente al UC-1V150/MSA 2 horas después de la inyección i.v. en diversas dosis demostró que el conjugado de MSA aumentó la potencia en un factor entre 10 y 100 (Figura 11). Los sueros de grupos de control de solución salina o MSA mostraron niveles de citoquinas muy bajos o no detectables (datos no mostrados).

Los conjugados de UC-1V150/MSA proporcionan actividad pulmonar prolongada y localizada. Para asegurar el suministro adecuado de los agonistas de TLR7 al sistema respiratorio, inicialmente los fármacos se administraron directamente en la tráquea. En el líquido de lavado alveolar bronquial (BALF) extraído de ratones tratados vía intratraqueal (i.t.) con UC-1V 150/MSA se observó una inducción esencial de citoquinas, mientras que los niveles de citoquinas en suero eran muy bajos y cercanos a los niveles basales en los mismos animales (Figura 12). Por el contrario, se observaron niveles similares de citoquinas tanto en BALF como en sueros de ratones inyectados vía i.t. con agonistas de TLR7 de moléculas pequeñas, que a veces inducían cambios de comportamiento, como pelo de punta al final y escalofríos, lo que sugiere un síndrome de citoquinas (Tabla 2). Estudios posteriores con UC-1V150 mostraron que la administración intranasal (i.n.) también inducía una producción selectiva de citoquinas en el BALF, probablemente debido a la aspiración de fármaco. Por consiguiente, para evaluar los conjugados de UC-1V150 en dos modelos animales infecciosos de neumonía se utilizó una administración i.n. Los ratones tratados previamente vía i.n. con UC-1V 150/MSA un día antes de la infección con esporas de *B. anthracis* presentaron una supervivencia media prolongada de 7,5 días, en comparación con 5 días en los ratones de control ($P < 0,025$) (Figura 14A). En cambio, en ratones tratados con solución salina, con la cantidad equivalente de MSA o con UC-1V150 no se observó ninguna diferencia significativa. Estos datos confirmaron que el conjugado de UC-1V150 tenía actividad inmunoterapéutica intrapulmonar, pero no el fármaco libre. Por consiguiente, la conjugación del agonista de TLR7 con MSA aumentó su potencia y redujo su toxicidad después del suministro local al tracto respiratorio.

En otro estudio, se trataron ratones BALB/c previamente vía i.n. con el conjugado de UC-1V150/MSA 1 día antes de infectarlos con el virus de la gripe (cepa H1N1). La supervivencia media de los ratones tratados se prolongó a 11,5 días, en comparación con 7 días en los controles no tratados ($P < 0,0001$) (Figura 14B). En conjunto, estos resultados sugieren que la conjugación del agonista de TLR7 con MSA aumentaba su potencia y reducía su toxicidad después de una administración local en el tracto respiratorio.

El UC-1V 150/MSA se administró vía i.n. antes de la infección con ántrax, seguida de tratamiento con ciprofloxacina (25 mg/kg) el día 4. Un tratamiento con placebo seguido por un tratamiento con ciprofloxacina resultó en una supervivencia de aproximadamente el 15-25%, mientras que un tratamiento con un conjugado y ciprofloxacina resultó en una supervivencia de aproximadamente el 90%. Por consiguiente, el conjugado es particularmente útil como coadyuvante con una vacuna del ántrax.

Discusión

El compuesto UC-1V150 es uno de los ligandos de TLR7 de moléculas pequeñas sintético más potente y versátil descubierto hasta la fecha porque (i) es activo a concentraciones nanomolares; (ii) se puede acoplar a diversas macromoléculas con intensificación de la actividad en algunos casos; y (iii) sus propiedades farmacocinéticas se pueden cambiar modificando los grupos auxiliares. El conjugado de proteína de TLR7 UC-1V150/MSA se caracterizaba por tener aproximadamente cinco moléculas pequeñas unidas de forma covalente a cada molécula de proteína de MSA. El conjugado retenía la actividad de agonista de TLR7 y de hecho era más potente y tenía una mayor duración de acción, en comparación con el fármaco monomérico libre. Además, este conjugado se podía suministrar eficazmente al sistema respiratorio mediante administración i.n. o i.t. Se comprobó que la administración del fármaco vía i.n. era eficaz en un modelo de ratón de infección bacteriana. Cuando se considera el suministro al sistema respiratorio, una ventaja potencialmente importante de la preparación de agonistas de TLR7 como conjugados de macromoléculas es que es posible evitar los efectos secundarios sistémicos limitando la actividad inmunoestimuladora al entorno de mucosa local.

Es de esperar que el conjugado macromolecular sea absorbido en la circulación sistémica más lentamente que el fármaco libre y, de hecho, puede ser capturado ávidamente por macrófagos residentes y células dendríticas que expresan TLR7. Por consiguiente, el conjugado debería mitigar el tipo de efectos secundarios graves asociados al suministro sistémico de agonistas de TLR7/8. El conjugado UC-1V150/MSA también puede proporcionar una actividad inmunoterapéutica beneficiosa cuando se administra a mucosas, como los tractos genitourinario y gastrointestinal, para el control de enfermedades infecciosas, alérgicas o malignas. El soporte macromolecular del agonista de TLR7 también puede proporcionar un método mejorado para suministrar selectivamente el agente inmunoterapéutico a un órgano o tejido específico. Por ejemplo, los conjugados de lípido de UC-1V150 se pueden incorporar en liposomas de diferentes tamaños y composiciones, mientras que los conjugados de proteína del agonista de TLR7 pueden estar dirigidos a diferentes subgrupos de células dendríticas. Las diferencias en el tráfico intracelular del conjugado de UC-1V150 pueden inducir distintos patrones de producción de citoquinas, análogamente a los efectos observados con oligonucleótidos activadores de TLR9 (Rothenfusser y col., Hum. Immunol., 63:111 (2002)).

Un problema potencial observado con los fármacos conjugados con proteínas es el desarrollo de anticuerpos contra la parte similar a hapteno de bajo peso molecular de la molécula. Sin embargo, el UC-1V150, a diferencia de los conjugados de vacuna de TLR7/8 anteriormente estudiados, tiene una estructura simple similar a la adenina, que es poco probable que induzca reacciones de hipersensibilidad. De hecho, no se han observado anticuerpos anti-UC-1V150 después de la administración de los conjugados de proteína, excepto después de la administración reiterada de un soporte de hemocianina de *Megathura crenulata* (lapa californiana) en adyuvante completo de Freud (datos no publicados).

Actualmente se buscan nuevos agentes para la prevención y el tratamiento de infecciones por el virus de la gripe, en particular con la propagación de cepas altamente patógenas de Asia. Todos los años se produce una alta morbilidad y mortalidad por las cepas que circulan normalmente. El tratamiento de la infección se puede llevar a cabo mediante fármacos antivirales aprobados, que son moderadamente eficaces si se inician de forma temprana. También se está investigando un reforzamiento del sistema inmunológico como una estrategia que podría acelerar las respuestas antivirales protectoras, en especial en huéspedes con el sistema inmunológico comprometido. Es posible que la activación inmunológica sistémica a través de señales de TLR no cree el gradiente de citoquinas y quimioquinas local necesario para movilizar células inmunológicas hacia el lugar de infección. Apoyando esta hipótesis, el UC-1V150, que es rápidamente absorbido a través de la mucosa, no protegió los ratones frente a la infección por *B. anthracis*, mientras que el conjugado de UC-1V150 sí fue eficaz.

El *B. anthracis* se ha convertido en un agente de bioterrorismo. Una respuesta rápida contra patógenos microbianos es crítica para una biodefensa eficaz. En general, un anticuerpo o respuesta inmune celular puede proteger contra estos patógenos; sin embargo, la generación de estas respuestas protectoras requiere rápidamente una exposición previa a antígenos específicos para cada organismo. Aunque es sabido que el virus de la gripe se acopla con TLR7 (Barchet y col., Eur. J. Immunol., 35: 360 (2005)), el ántrax bacteriano muy probablemente se pueda acoplar con TLR2, TLR4 y TLR9. Además de ser un producto intermedio de señales común para los TLR, también se ha demostrado que el MyD88 es necesario para la resistencia a la infección en un modelo de ántrax en ratones (Hughes y col., Infect. Immun., 73: 7535 (2005)). Dado que el conjugado de UC-1V150 funciona eficazmente como adyuvante contra infecciones que utilizan diferentes vías, puede ser aplicado como una estrategia de biodefensa que no necesitaría ser específica para los antígenos de un microbio en particular y que sería útil tanto en caso de ataques mixtos como de ataques simples.

Ejemplo V

No existe ninguna vacuna de SA conocida que sea suficientemente potente o que pueda actuar con suficiente rapidez para prevenir infecciones por SA en pacientes "de riesgo" antes de la hospitalización. Una sola inyección de un agonista de TLR7 potente y bacterias gram-positivas inactivadas, por ejemplo SA, o una

subunidad de las mismas, puede estimular una inmunidad protectora frente a las bacterias en un plazo de una semana desde la administración. La inyección puede incluir, por ejemplo, 1) un agonista de TLR7, tal como UC-IV199, conjugado directamente con grupos amino libres en bacterias gram positivas inactivadas, 2) un agonista de TLR7, tal como UC-IV199, conjugado con albúmina en combinación con bacterias gram-positivas inactivadas, 3) un agonista de TLR7, tal como UC-IV199, conjugado con una proteína bacteriana gram-positiva recombinante, o 4) un agonista de TLR7, tal como UC-IV199, conjugado con polisacáridos bacterianos gram-positivos (por ejemplo a través de engarces conocidos en la técnica, tal como el utilizado en StaphVax®).

5

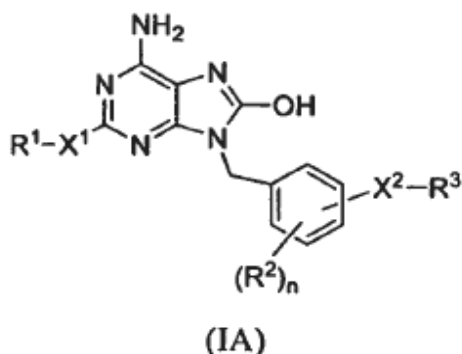
10 Tal como se describe más arriba, un agonista de TLR7 se conjugó con esporas irradiadas letalmente de la cepa de vacuna Sterne de *Bacillus anthracis* (BA). Como el SA, el BA es una bacteria gram-positiva. En comparación con las esporas solas, la bacteria conjugada era un potente activador de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratón de acuerdo con la medición mediante secreción de citoquinas (IL-12 e IL-6). En otro experimento, una sola inyección en ratones de esporas irradiadas letalmente de la cepa Sterne de BA, mezcladas con un agonista de TLR7 conjugado con albúmina de ratón (MSA) protegió los animales

15 contra una provocación letal con BA intrapulmonar administrada solo seis días después. En cambio, la inyección de los animales solo con esporas de BA, o con BA más un adyuvante convencional, toxina del cólera (CT), no protegió los animales. Por consiguiente, una vacuna de albúmina de agonista de TLR7/esporas irradiadas indujo una inmunidad protectora frente al *Bacillus anthracis* en un plazo de 6 días. Esta rapidez de la respuesta en un animal naive era totalmente inesperada. La misma tecnología de vacuna

20 probablemente protegerá a los humanos frente a las infecciones por SA adquiridos en hospital.

REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso en un método para prevenir o inhibir una infección bacteriana gram-positiva en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición que comprende un antígeno bacteriano de una bacteria gram-positiva y una cantidad de un compuesto de fórmula (IA):



donde

X^1 es -O-, -S-, o NR^c ; siendo R^c hidrógeno, alquilo(C₁₋₁₀) o alquilo(C₁₋₁₀) sustituido, o R^c y R^1 , junto con el átomo de nitrógeno, pueden formar un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C₁₋₆), hidroxialquilen(C₁₋₆), alcoxi(C₁₋₆), cicloalquilo(C₃₋₆), alcoxi(C₁₋₆)alquilen(C₁₋₆), amino, ciano, halógeno o arilo;

R^1 es hidrógeno, alquilo(C₁₋₁₀), alquilo(C₁₋₁₀) sustituido, arilo(C₆₋₁₀) o arilo(C₆₋₁₀) sustituido, heterociclilo(C₅₋₉), heterociclilo(C₅₋₉) sustituido; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C₁₋₆), hidroxialquilen(C₁₋₆), alcoxi(C₁₋₆), cicloalquilo(C₃₋₆), alcoxi(C₁₋₆)alquilen(C₁₋₆), amino, ciano, halógeno o arilo;

cada R^2 es, independientemente, hidrógeno, -OH, alquilo(C₁₋₆), alquilo(C₁₋₆) sustituido, alcoxi(C₁₋₆), alcoxi(C₁₋₆) sustituido, -C(O)-alquilo(C₁₋₆) (alcanoilo), -C(O)-alquilo(C₁₋₆) sustituido, -C(O)-arilo(C₆₋₁₀) (arilo), -C(O)-arilo(C₆₋₁₀) sustituido, -C(O)OH (carboxilo), -C(O)Oalquilo(C₁₋₆) (alcoxi-carbonilo), -C(O)Oalquilo(C₁₋₆) sustituido, -NR^aR^b, -C(O)NR^aR^b (carbamoilo), -C(O)NR^aR^b sustituido, halo, nitro o ciano; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C₁₋₆), hidroxialquilen(C₁₋₆), alcoxi(C₁₋₆), cicloalquilo(C₃₋₆), alcoxi(C₁₋₆)alquilen(C₁₋₆), amino, ciano, halógeno o arilo;

cada R^a y R^b es, independientemente, hidrógeno, alquilo(C₁₋₆), cicloalquilo(C₃₋₆), alcoxi(C₁₋₆), haloalquilo(C₁₋₆), cicloalquilo(C₃₋₆)alquilo(C₁₋₆), alcanoilo(C₁₋₆), hidroxialquilo(C₁₋₆), arilo, arilalquilo(C₁₋₆), Het, Het(C₁₋₆)alquilo o alcocarbonilo(C₁₋₆);

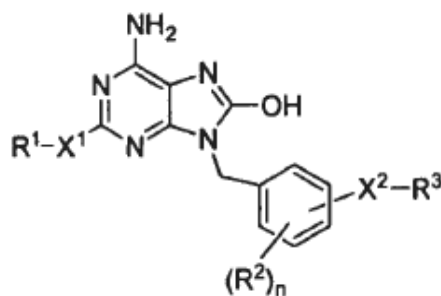
X^2 es un enlace o un grupo enlazante;

n es 1, 2, 3, o 4; y

R^3 es una macromolécula que comprende un péptido heterólogo, una proteína heteróloga, un lípido heterólogo, un gránulo, tal como un gránulo de poliestireno, una molécula de ácido nucleico heteróloga o un dendrímero;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo sus hidratos.

2. Compuesto para su uso en un método para prevenir o inhibir una infección bacteriana gram-positiva en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva del compuesto de fórmula (IB):



(IB)

donde

5 X^1 es -O-, -S-, o NR^c ; siendo R^c hidrógeno, alquilo(C_{1-10}) o alquilo(C_{1-10}) sustituido, o R^c y R^1 ,
siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}),
hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}), amino, ciano,
halógeno o arilo;

10 R^1 es hidrógeno, alquilo(C_{1-10}), alquilo(C_{1-10}) sustituido, arilo(C_{6-10}) o arilo(C_{6-10}),
heterociclilo(C_{5-9}), heterociclilo(C_{5-9}) sustituido; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo
o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})
alquileno(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;

15 cada R^2 es, independientemente, hidrógeno, -OH, alquilo(C_{1-6}), alquilo(C_{1-6}) sustituido, alcoxi(C_{1-6}),
alcoxi(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-alquilo(C_{1-6}) (alcanoílo), -C(O)-alquilo(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-
arilo(C_{6-10}) (aróilo), -C(O)-arilo(C_{6-10}) sustituido, -C(O)OH (carboxilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6})
15 (alcoxicarbonilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6}) sustituido, - NR^aR^b , -C(O) NR^aR^b (carbamoílo), -C(O) NR^aR^b
sustituido, halo, nitro o ciano; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos
hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}),
amino, ciano, halógeno o arilo;

20 cada R^a y R^b es, independientemente, hidrógeno, alquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6}),
haloalquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6})alquilo(C_{1-6}), alcanoílo(C_{1-6}), hidroxialquilo(C_{1-6}), arilo,
arilalquilo(C_{1-6}), Het, Het-alquilo(C_{1-6}) o alcoxicarbonilo(C_{1-6});

X^2 es un enlace o un grupo enlazante;

n es 1, 2, 3, o 4; y

25 R^3 es una bacteria gram-positiva, una proteína o un péptido antigénico aislado de la bacteria
gram-positiva, o un polisacárido aislado de una bacteria gram-positiva;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo hidratos de éste, no siendo la bacteria
gram-positiva *Bacillus ni Listeria*.

30 3. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde X^1 es un átomo de
azufre.

4. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde X^1 es un átomo de
oxígeno.

35 5. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde X^1 es - NR^c -, siendo R^c
hidrógeno, alquilo(C_{1-6}) o alquilo(C_{1-6}) sustituido; siendo los sustituyentes para alquilo cicloalquilo(C_{3-6}),
hidroxilo, alcoxi(C_{1-6}), amino, ciano o arilo.

6. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 5, donde X^1 es -NH-.

7. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R^1 y R^c
juntos forman un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido.

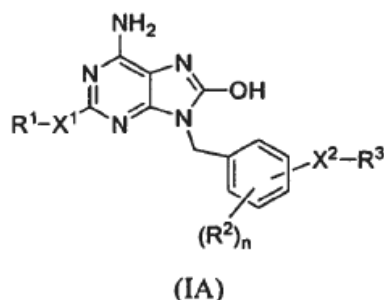
40 8. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 7, donde R^1 y R^c juntos forman un
anillo morfolino, piperidino, pirrolidino o piperazino, sustituido o no sustituido.

9. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R^1 es
hidrógeno, alquilo(C_{1-4}) o alquilo(C_{1-4}) sustituido.

10. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 9, donde R^1 es hidrógeno CH_3 -, CH_3 -
 CH_2 -, $CH_3CH_2CH_2$ -, hidroxialquileno(C_{1-4}) o alcoxi(C_{1-4})alquileno(C_{1-4}).

11. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 10, donde R¹ es hidrógeno, CH₃-, CH₃-CH₂-, CH₃-O-CH₂CH₂- o CH₃-CH₂-O-CH₂CH₂-.
12. Composición o compuesto para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde R² es hidrógeno, halógeno o alquilo(C₁₋₄).
- 5 13. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 12, donde R² es hidrógeno, cloro, bromo, CH₃- o CH₃-CH₂-.
14. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos son hidroxilo, alquilo(C₁₋₆), hidroxialquilen(C₁₋₆), alcoxi(C₁₋₆), alcoxi(C₁₋₆)alquilen(C₁₋₆), cicloalquilo(C₃₋₆), amino, ciano, halógeno o arilo.
- 10 15. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde X² es un enlace o una cadena que tiene hasta aproximadamente 24 átomos, seleccionándose los átomos de entre el grupo consistente en carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno no peróxido y fósforo.
- 15 16. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 15, donde X² es un enlace o una cadena que tiene entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12 átomos.
17. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 15, donde X² es un enlace o una cadena que tiene entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9 átomos.
18. Composición o compuesto para su uso según la reivindicación 15, donde X² es
-
- 20 19. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 18, caracterizada porque la macromolécula es un fosfolípido, un liposoma o un dendrímero.
20. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 18, caracterizada porque el péptido heterólogo tiene entre 2 y aproximadamente 200 residuos aminoácidos.
- 25 21. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, caracterizado porque el péptido tiene entre 2 y aproximadamente 200 residuos de aminoácidos.
22. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 18, caracterizada porque el péptido heterólogo tiene entre 10 y aproximadamente 200 residuos de aminoácidos.
23. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, caracterizado porque el péptido tiene entre 10 y aproximadamente 200 residuos de aminoácidos.
- 30 24. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 18, caracterizada porque la macromolécula comprende un carbohidrato.
25. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 18, caracterizada porque la molécula de ácido nucleico incluye ADN, ARN o PNA.
- 35 26. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, donde la bacteria gram-positiva es *Staphylococcus aureus*.
27. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, donde el mamífero es un humano.
28. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, donde el mamífero presenta un riesgo de infección bacteriana gram-positiva.
- 40 29. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, donde el mamífero tiene el sistema inmunológico comprometido.

30. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, donde el mamífero presenta una respuesta inmune efectiva a la administración aproximadamente 6 días después de la misma.
- 5 31. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 30, caracterizada porque comprende una preparación de bacterias gram-positivas inactivadas.
32. Composición o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, donde la cantidad es efectiva para prevenir la infección aproximadamente 6 días después de la administración.
- 10 33. Vacuna que comprende una composición que incluye un antígeno bacteriano de una bacteria de *S. aureus* y una cantidad de un compuesto de fórmula (IA):

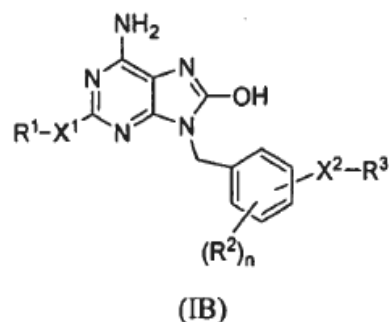


donde

- 15 X^1 es -O-, -S-, o NR^c ; siendo R^c hidrógeno, alquilo(C_{1-10}) o alquilo(C_{1-10}) sustituido, o R^c y R^1 , junto con el átomo de nitrógeno, pueden formar un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;
- 20 R^1 es hidrógeno, alquilo(C_{1-10}), alquilo(C_{1-10}) sustituido, arilo(C_{6-10}) o arilo(C_{6-10}) sustituido, heterociclilo(C_{5-9}), heterociclilo(C_{5-9}) sustituido; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;
- 25 cada R^2 es, independientemente, hidrógeno, -OH, alquilo(C_{1-6}), alquilo(C_{1-6}) sustituido, alcoxi(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-alquilo(C_{1-6}) (alcanoilo), -C(O)-alquilo(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-arilo(C_{6-10}) (arilo), -C(O)-arilo(C_{6-10}) sustituido, -C(O)OH (carboxilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6}) (alcoxi-carbonilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6}) sustituido, - NR^aR^b , -C(O)NR^aR^b (carbamoilo), -C(O)NR^aR^b sustituido, halo, nitro o ciano; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;
- 30 cada R^a y R^b es, independientemente, hidrógeno, alquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6}), haloalquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6})alquilo(C_{1-6}), alcanoilo(C_{1-6}), hidroxialquilo(C_{1-6}), arilo, arilalquilo(C_{1-6}), Het, Het(C_{1-6})alquilo o alcocarbonilo(C_{1-6});
- X^2 es un enlace o un grupo enlazante; n es 1, 2, 3, o 4; y
- 35 R^3 es una macromolécula que comprende un péptido heterólogo, una proteína heteróloga, un lípido heterólogo, un gránulo, tal como un gránulo de poliestireno, una molécula de ácido nucleico heterólogo o un dendrímero;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo sus hidratos.

34. Vacuna que comprende un compuesto de fórmula (IB):



donde

- 5 X^1 es -O-, -S-, o NR^c ; siendo R^c hidrógeno, alquilo(C_{1-10}) o alquilo(C_{1-10}) sustituido, o R^c y R^1 , junto con el átomo de nitrógeno, pueden formar un anillo heterocíclico o heterocíclico sustituido, siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;
- 10 R^1 es hidrógeno, alquilo(C_{1-10}), alquilo(C_{1-10}) sustituido, arilo(C_{6-10}) o arilo(C_{6-10}), heterociclilo(C_{5-9}), heterociclilo(C_{5-9}) sustituido; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;
- 15 cada R^2 es, independientemente, hidrógeno, -OH, alquilo(C_{1-6}), alquilo(C_{1-6}) sustituido, alcoxi(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-alquilo(C_{1-6}) (alcanoilo), -C(O)-alquilo(C_{1-6}) sustituido, -C(O)-arilo(C_{6-10}) (aróilo), -C(O)-arilo(C_{6-10}) sustituido, -C(O)OH (carboxilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6}) (alcoxycarbonilo), -C(O)Oalquilo(C_{1-6}) sustituido, - NR^aR^b , -C(O) NR^aR^b (carbamoilo), -C(O) NR^aR^b sustituido, halo, nitro o ciano; siendo los sustituyentes para los grupos alquilo, arilo o heterocíclicos hidroxilo, alquilo(C_{1-6}), hidroxialquileno(C_{1-6}), alcoxi(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-6}), alcoxi(C_{1-6})alquileno(C_{1-6}), amino, ciano, halógeno o arilo;
- 20 cada R^a y R^b es, independientemente, hidrógeno, alquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-8}), alcoxi(C_{1-6}), haloalquilo(C_{1-6}), cicloalquilo(C_{3-8})alquilo(C_{1-6}), alcanoilo(C_{1-6}), hidroxialquilo(C_{1-6}), arilo, arilalquilo(C_{1-6}), Het, Het-alquilo(C_{1-6}) o alcoxycarbonilo(C_{1-6});
- X^2 es un enlace o un grupo enlazante; n es 1, 2, 3, o 4; y
- 25 R^3 es una bacteria *S. aureus*, una proteína o un péptido antigénico aislado de *S. aureus*, o un polisacárido aislado de *S. aureus*.
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo sus hidratos.

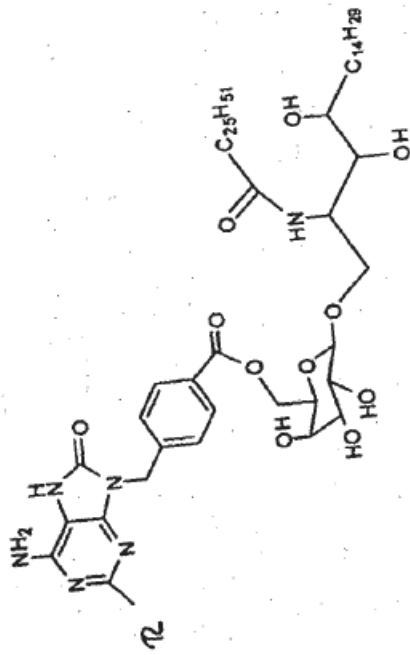
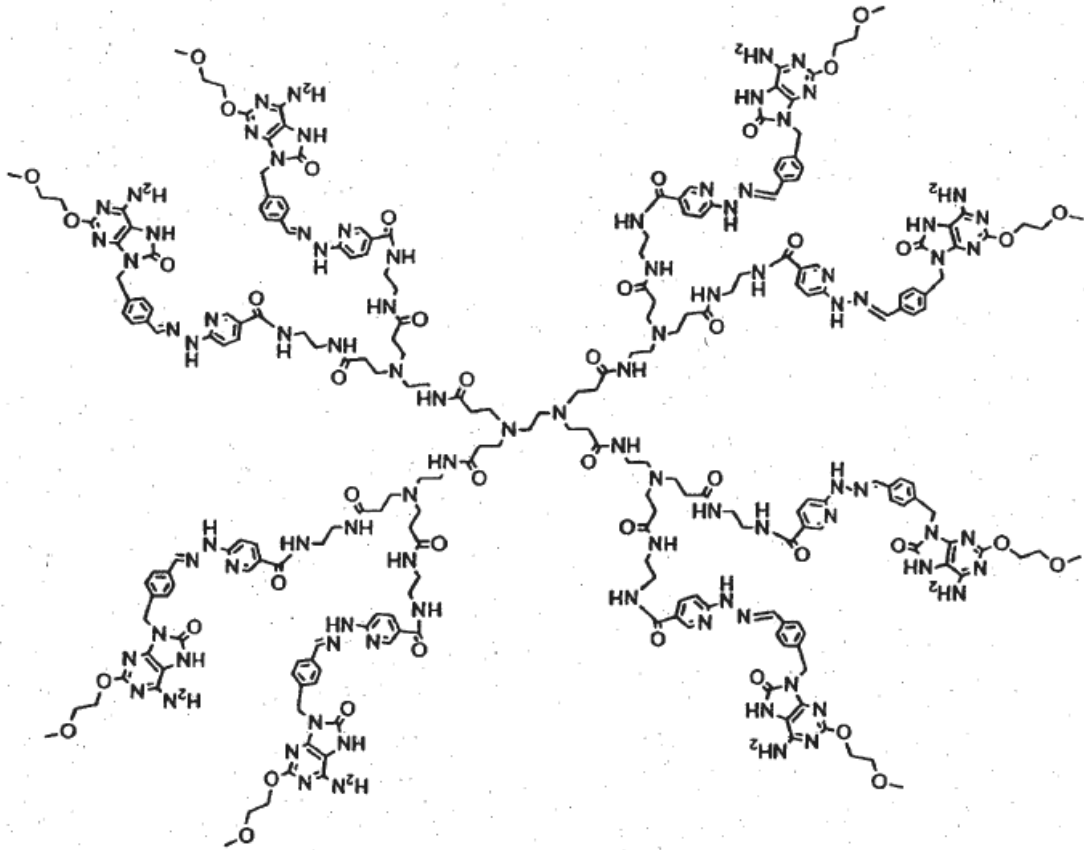


FIG. 1

FIG. 2



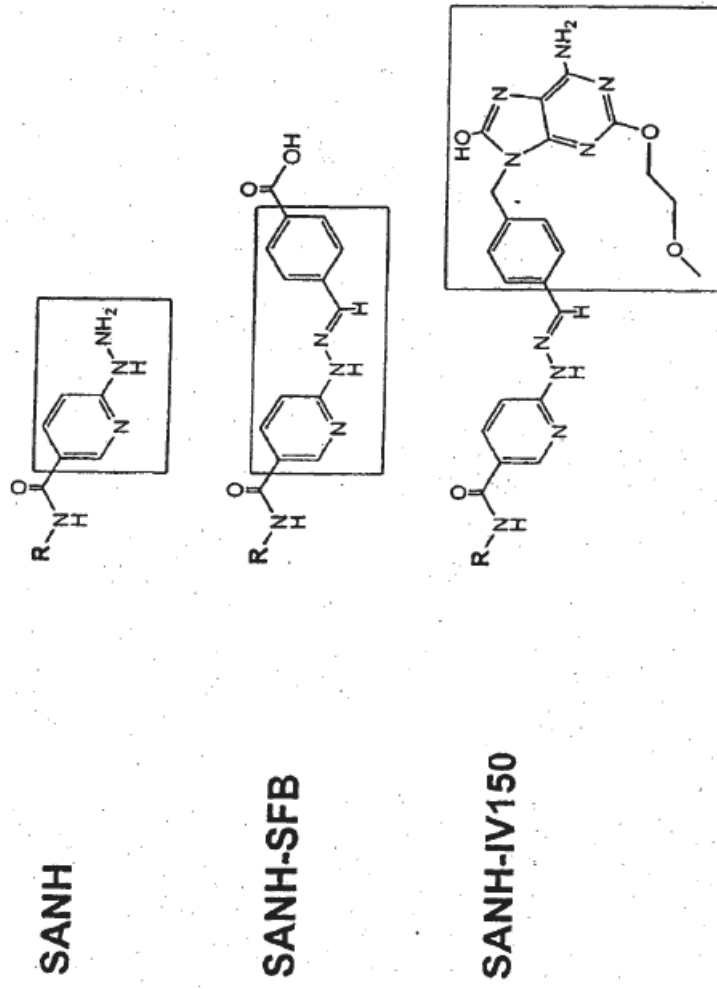
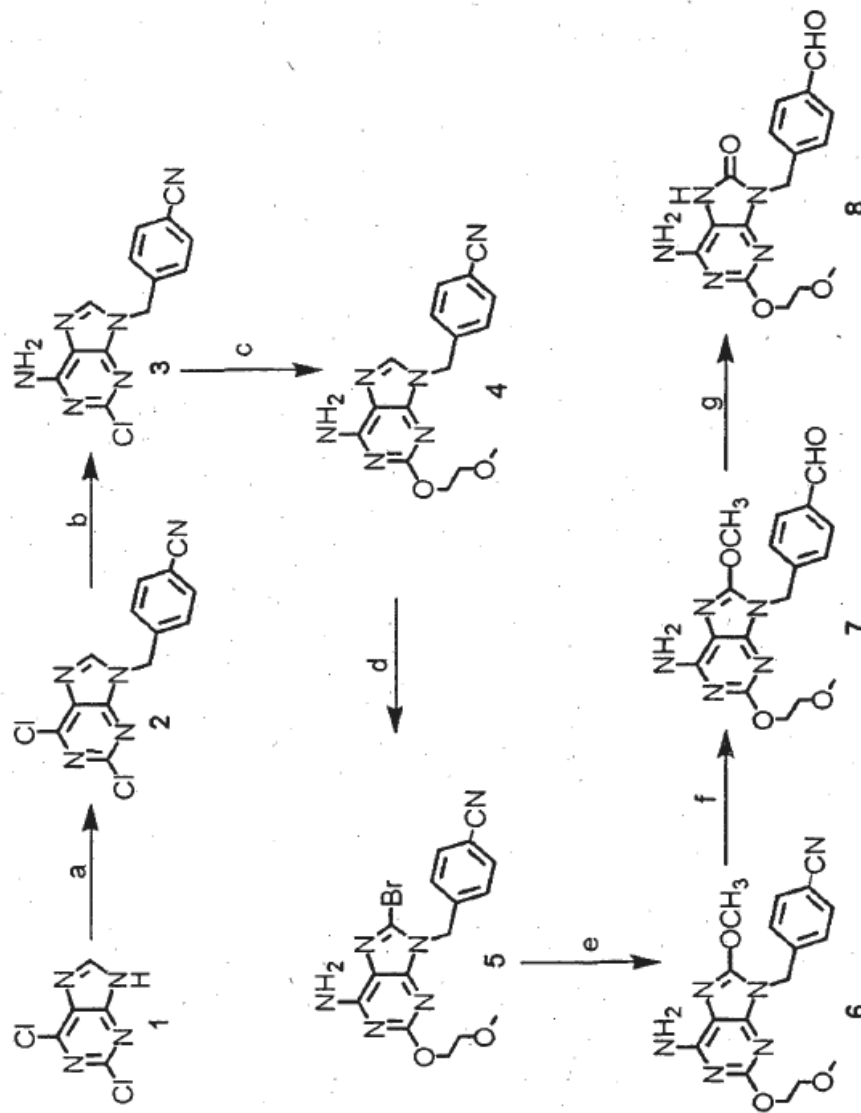


FIG. 3A



UC-1V150

FIG. 3B

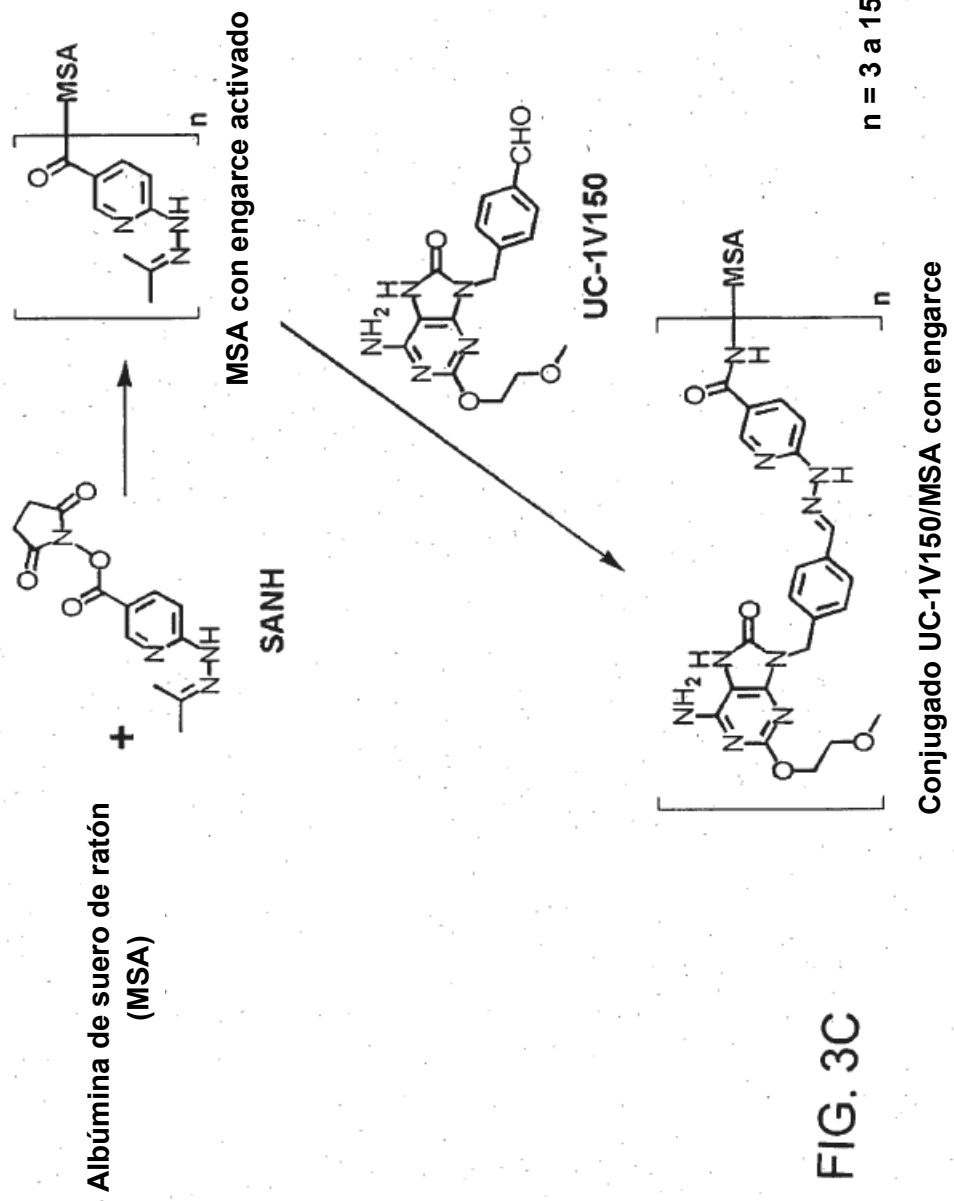


FIG. 3C

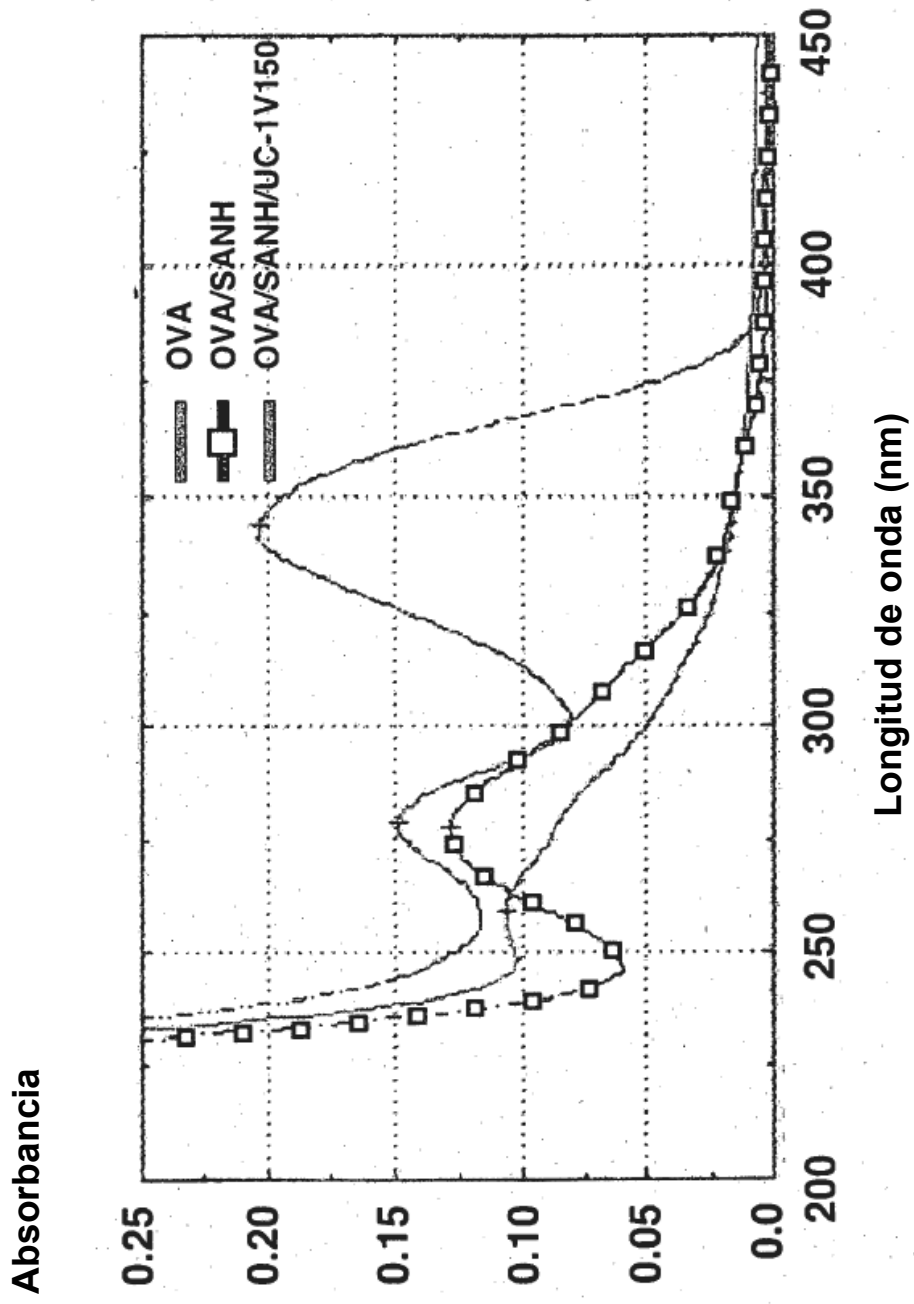


FIG. 4

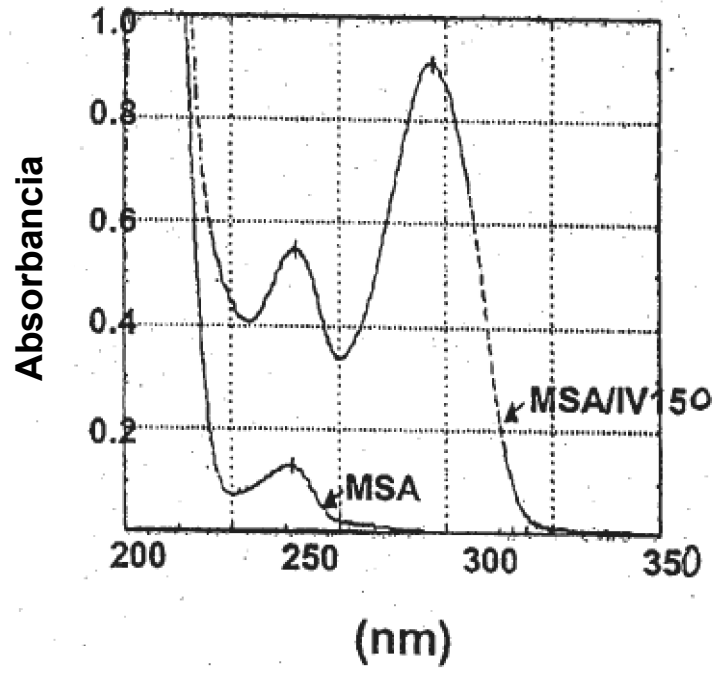


FIG. 5

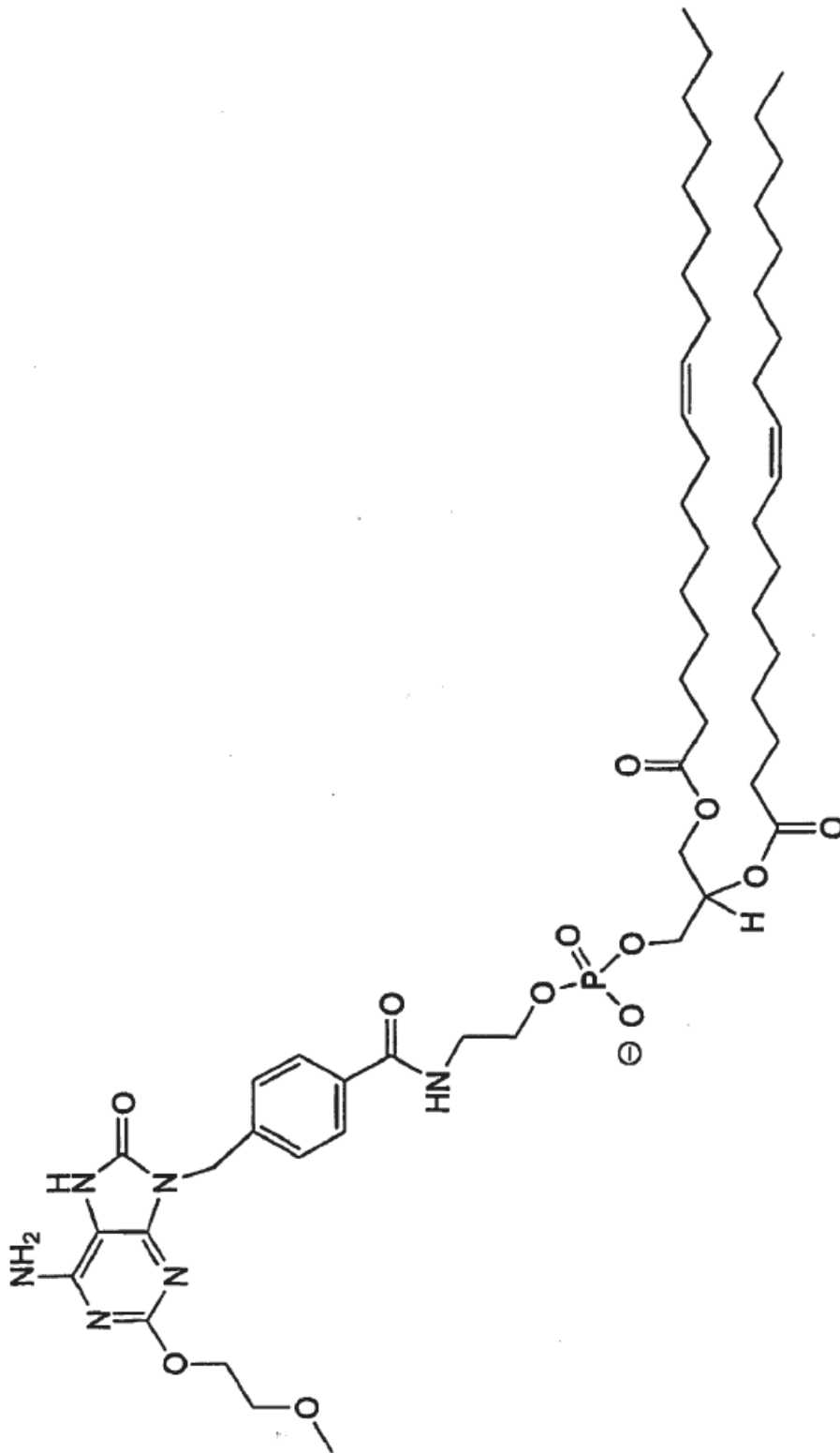


FIG. 6

El UC-1V199/L puede actuar como un inhibidor de las señales de TLR7

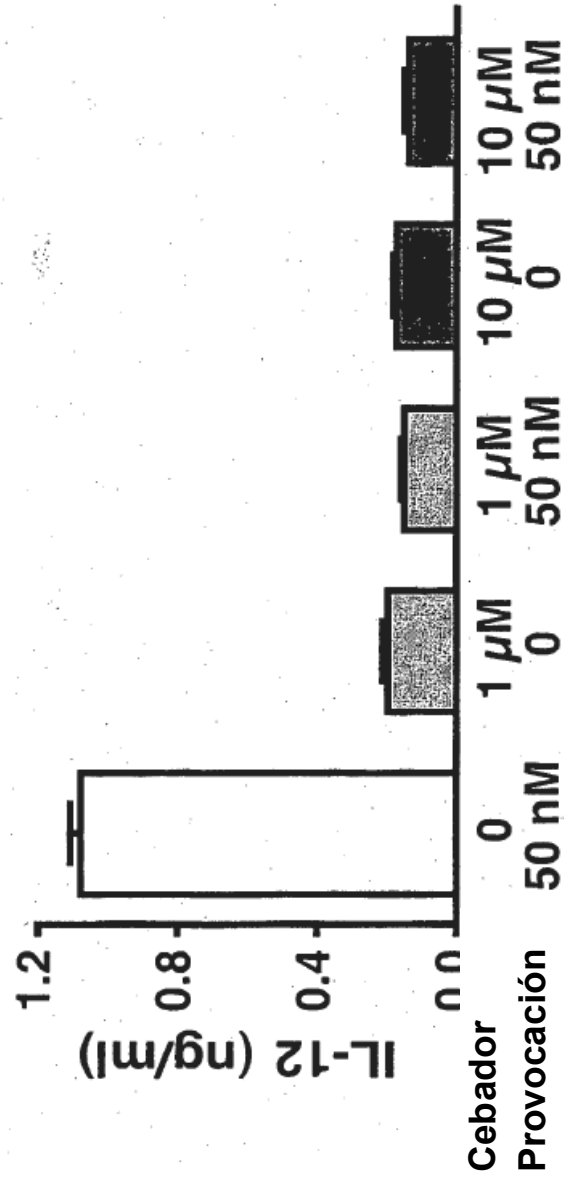


FIG. 7

El UC-1V199/L inhibe las señales de TLR7

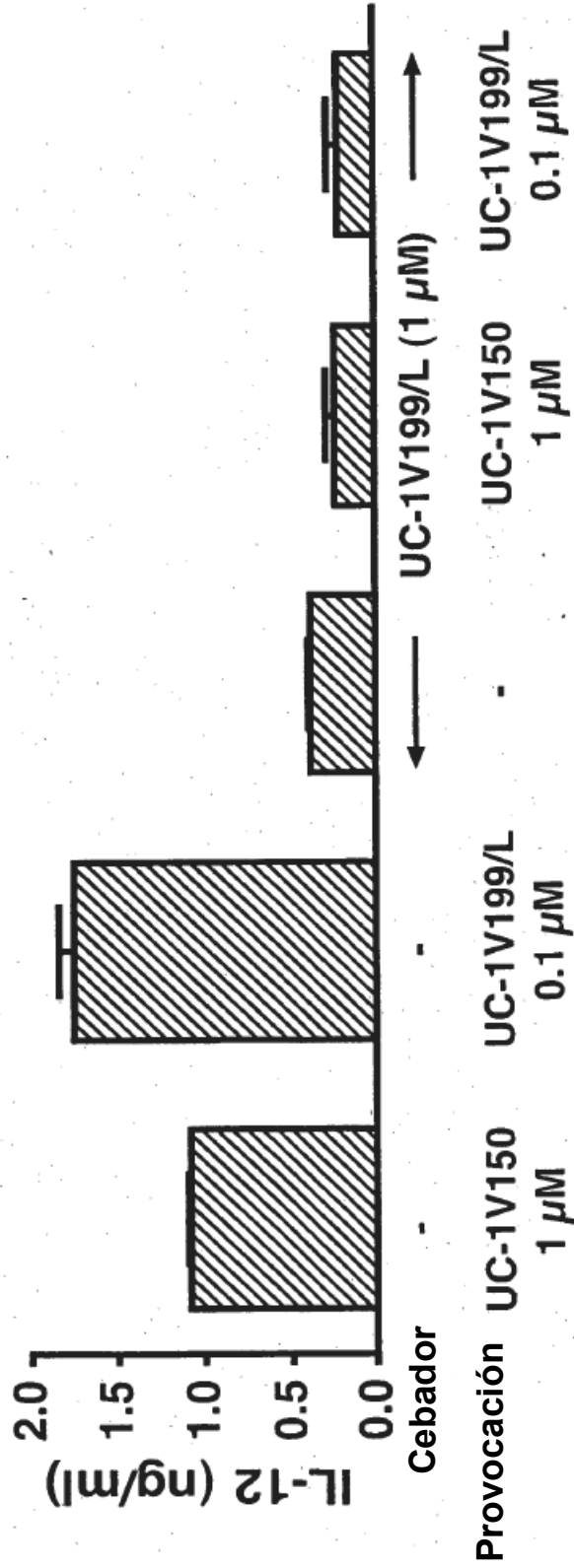


FIG. 8A

El UC-1V199/L inhibe las señales de TLR2

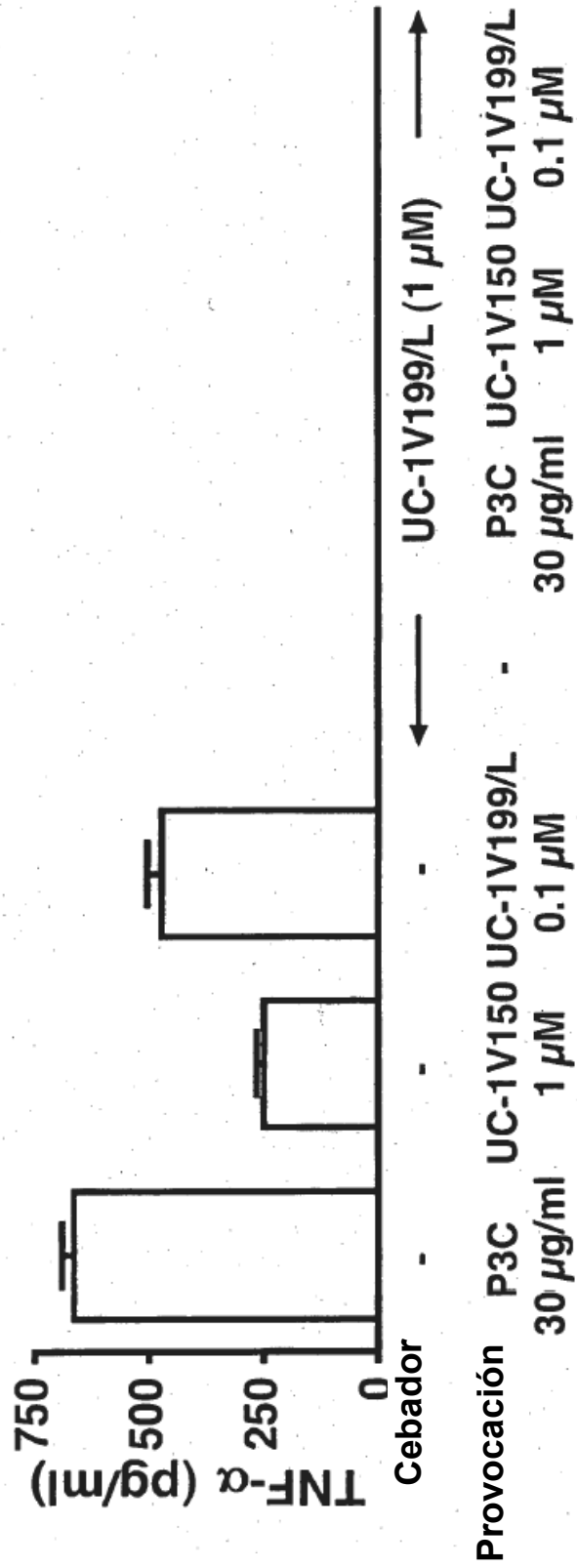


FIG. 8B

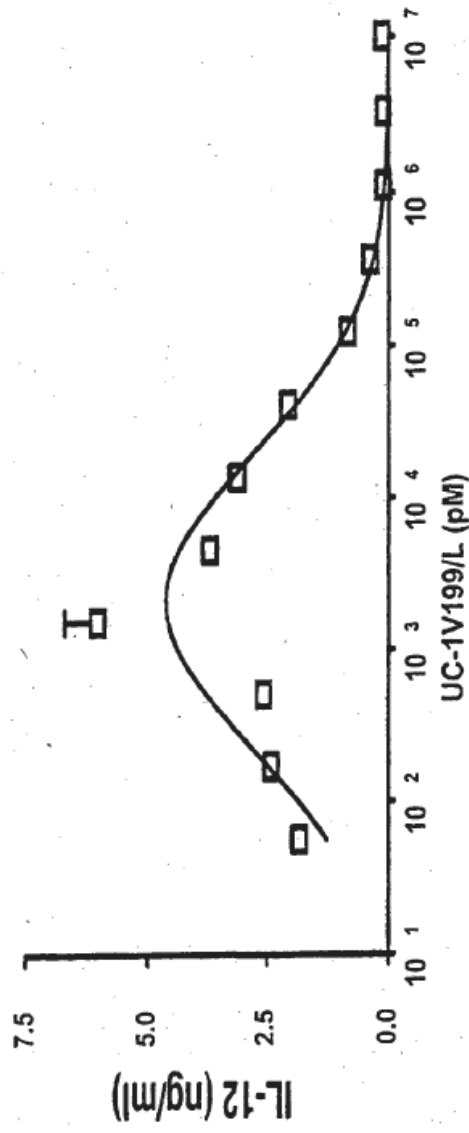


FIG. 9

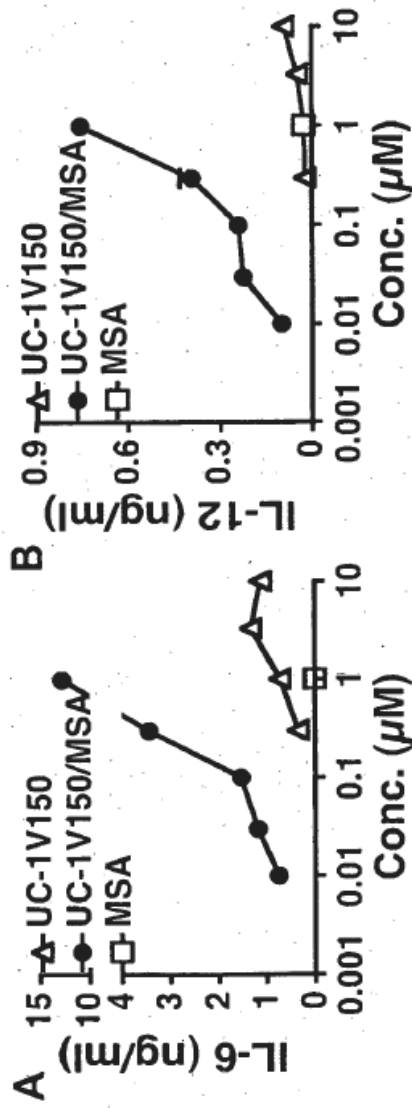


FIG. 10B

FIG. 10A

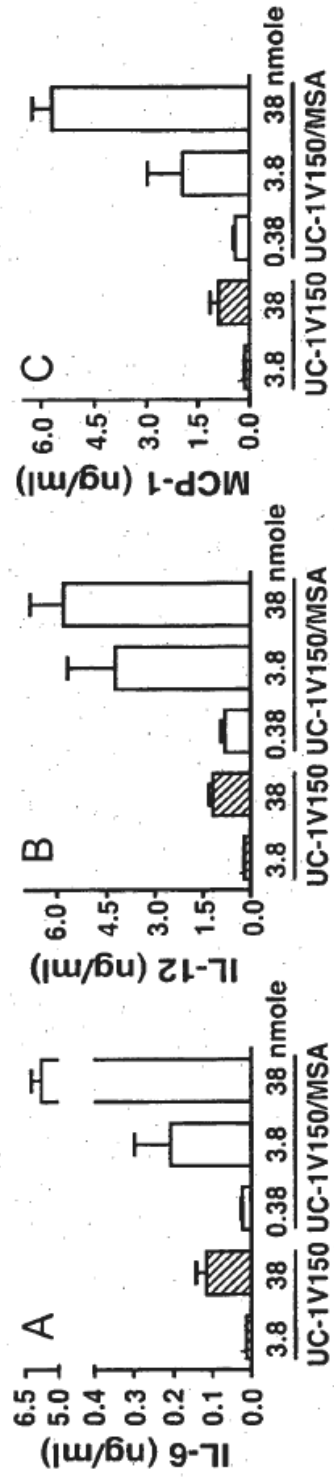


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

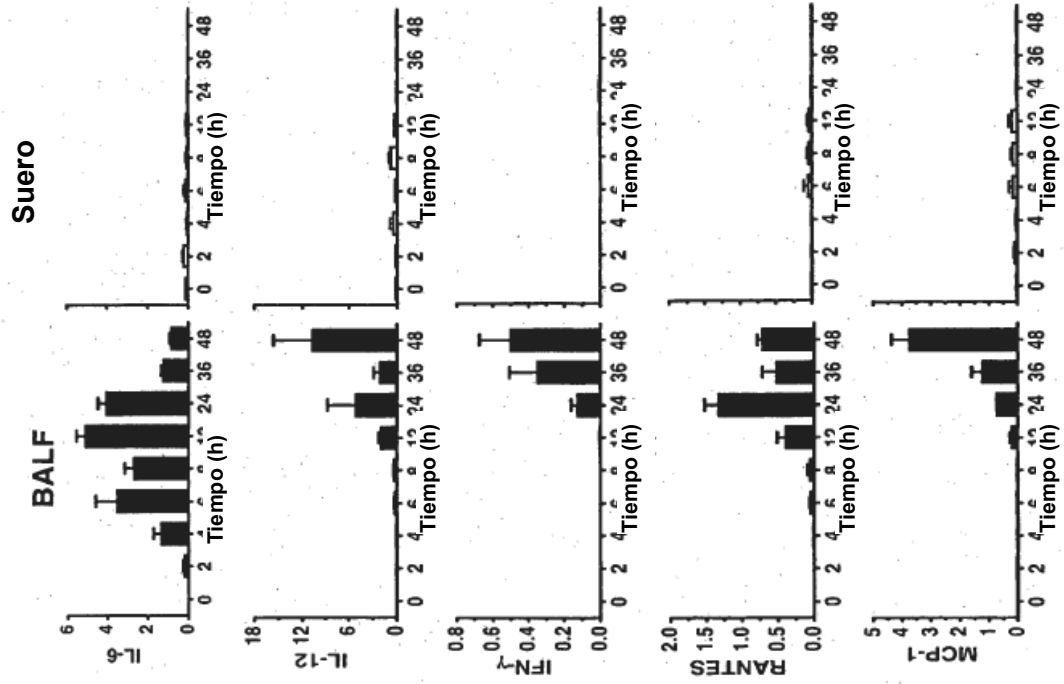


FIG. 12

**Inducción de citoquinas en BMDM mediante
conjugado de esporas de ántrax irradiadas**

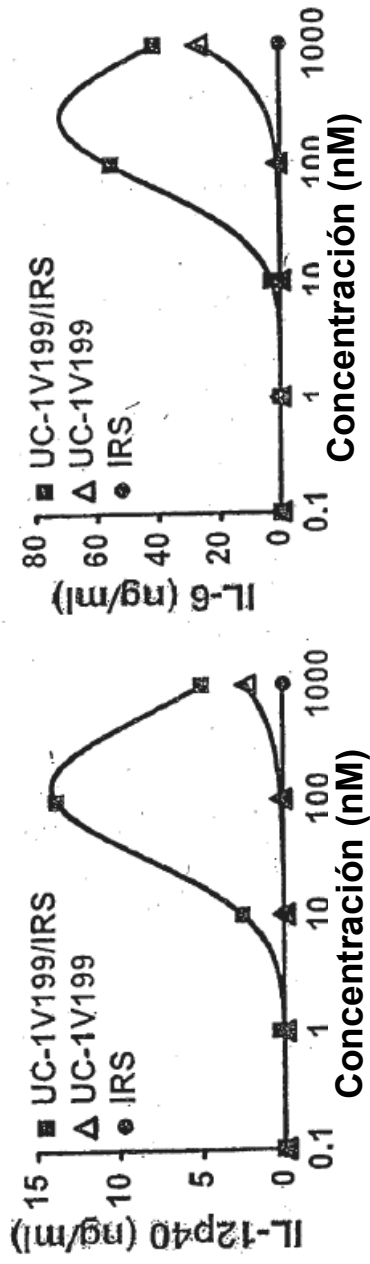


FIG. 13

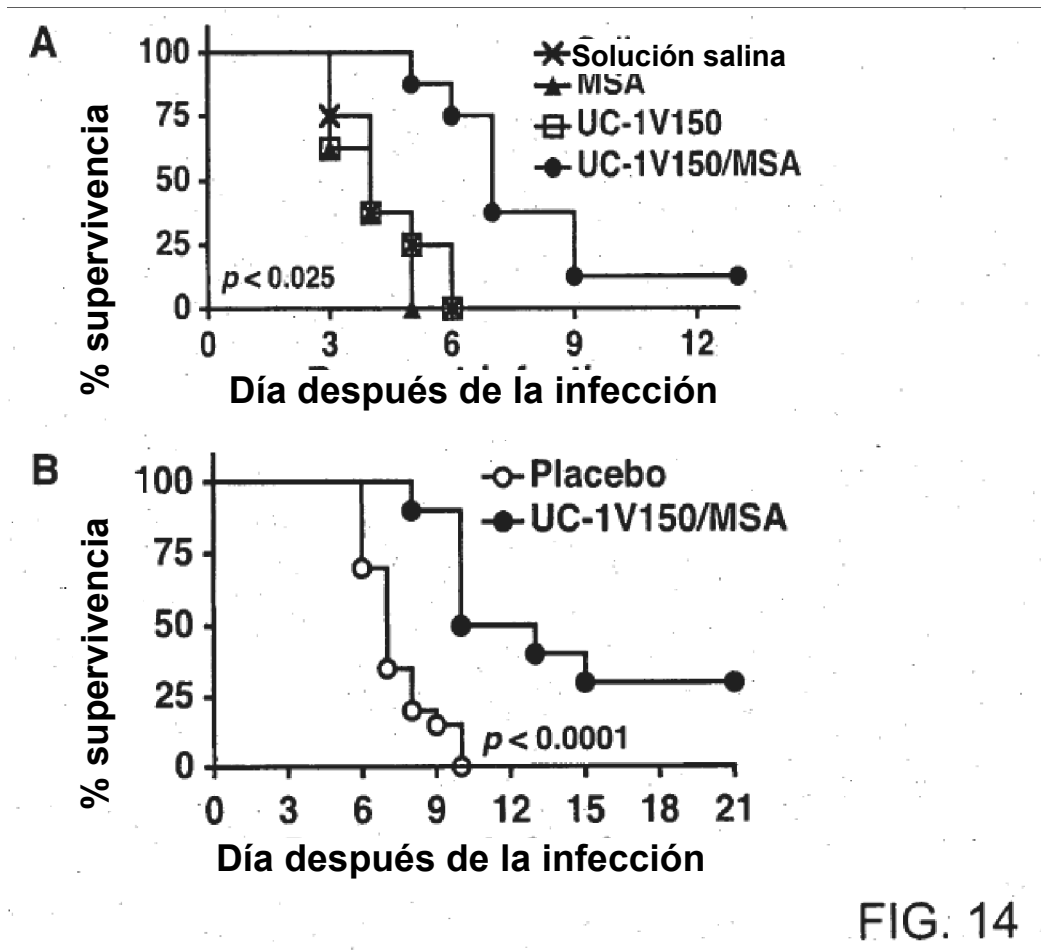


FIG. 14

UC-1V150/MSA como adyuvante de vacuna de esporas de ántrax: (I) Una inmunización 6 días antes de la infección

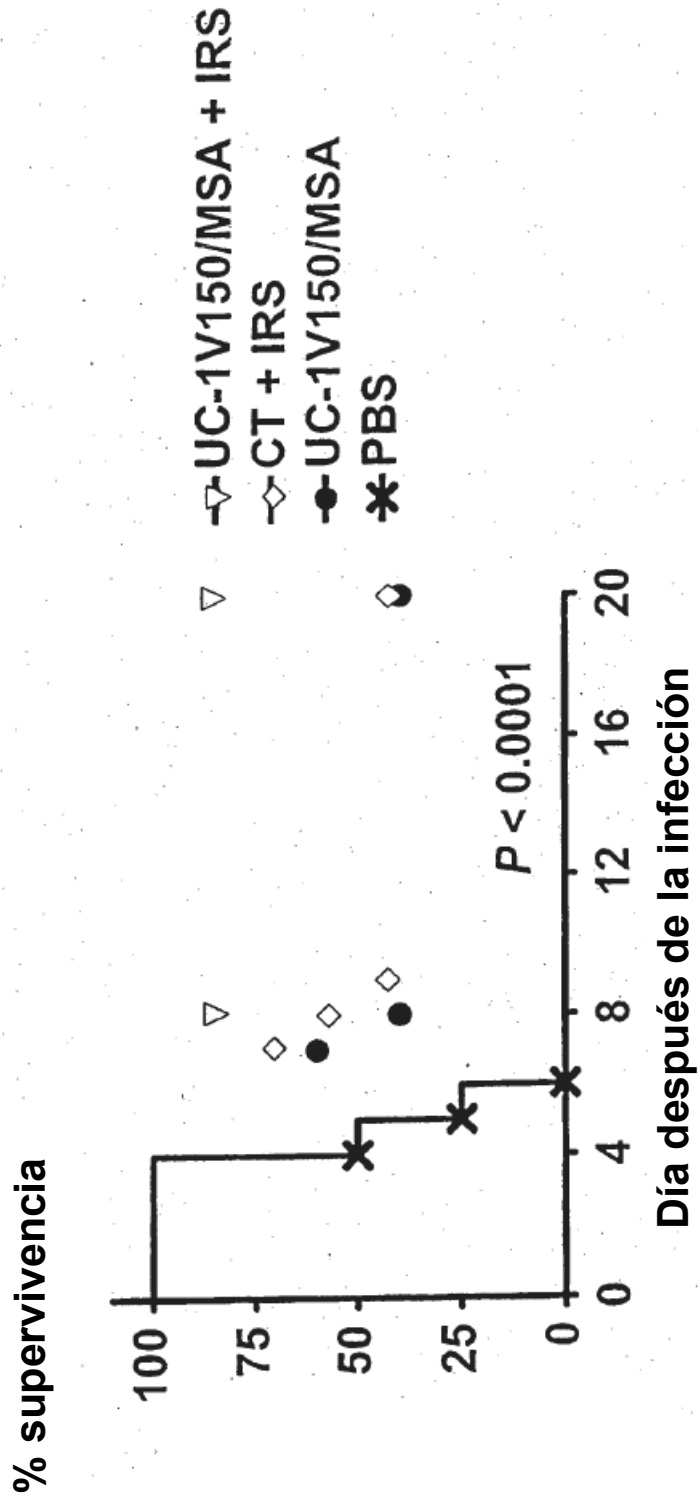


FIG. 15

La protección provocada por esporas de ántrax irradiadas con gamma depende de células CD4+

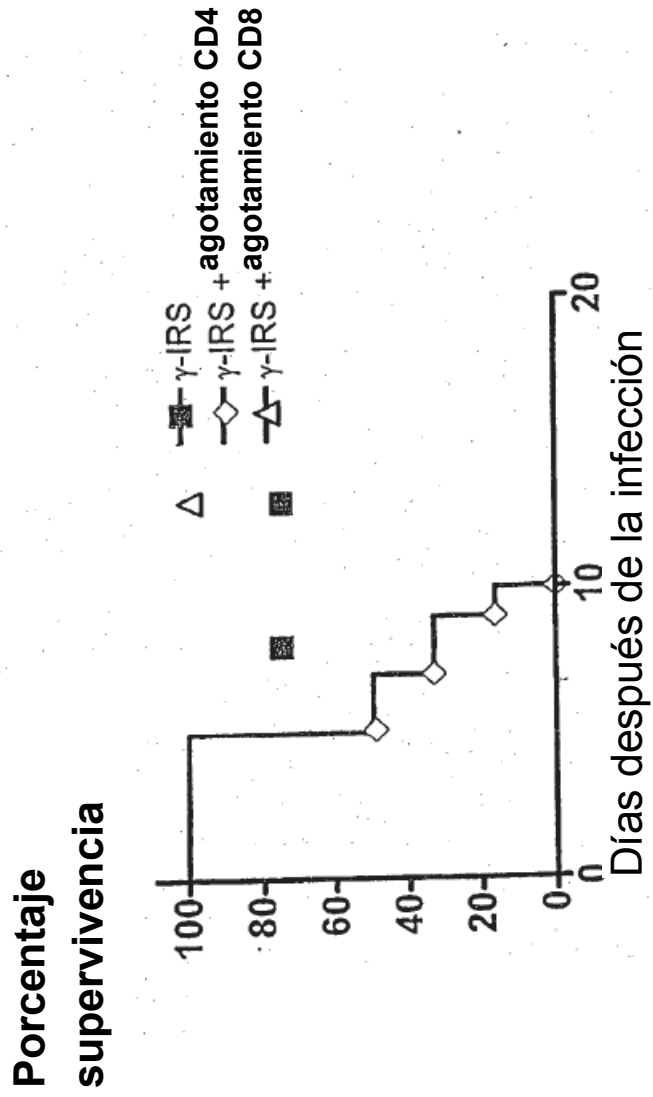


FIG. 16

Citoquina	Tiempo (h)	Conjugado				No conjugado					
		BALF		Suero		BALF		Suero		Relación	
		ng/ml	SEM	ng/ml	SEM	ng/ml	SEM	ng/ml	SEM		
IL-6	2	0.25	0.09	0.28	0.00	0.9	0.73	0.40	5.00	1.14	0.1
	4	1.34	0.38	0.06	0.02	22.1	1.09	0.64	2.93	1.53	0.4
	6	3.50	1.07	0.14	0.05	24.3	3.00	0.76	3.95	1.24	0.8
	24	4.06	0.41	0.03	0.00	117.2	4.39	0.84	1.08	0.31	4.1
IL-12p40	2	0.06	0.00	0.23	0.03	0.2	0.11	0.09	0.53	0.53	0.2
	4	0.11	0.00	0.50	0.39	0.2	0.06	0.03	0.23	0.23	0.3
	6	0.29	0.04	0.25	0.06	1.1	0.00	0.00	2.82	0.46	0.0
	24	5.05	3.70	0.11	0.00	45.1	0.01	0.01	0.49	0.47	0.0
TNF-a	2	1.25	1.02	0.08	0.01	16.4	2.62	0.83	0.52	0.21	5.0
	4	9.67	1.01	0.02	0.01	580.1	1.53	0.73	0.32	0.16	4.8
	6	8.28	1.72	0.02	0.00	427.5	2.03	0.67	0.39	0.15	5.2
	24	4.22	2.80	0.01	0.00	551.8	0.93	0.47	0.15	0.04	6.2

FIG. 17

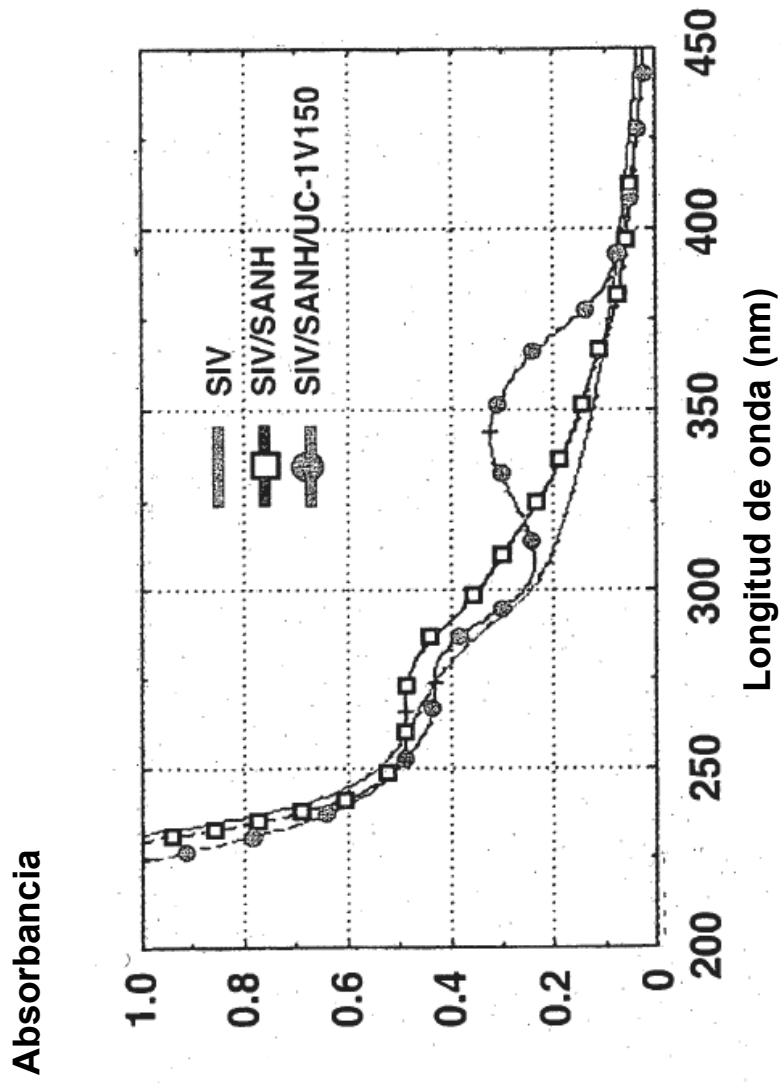


FIG. 18

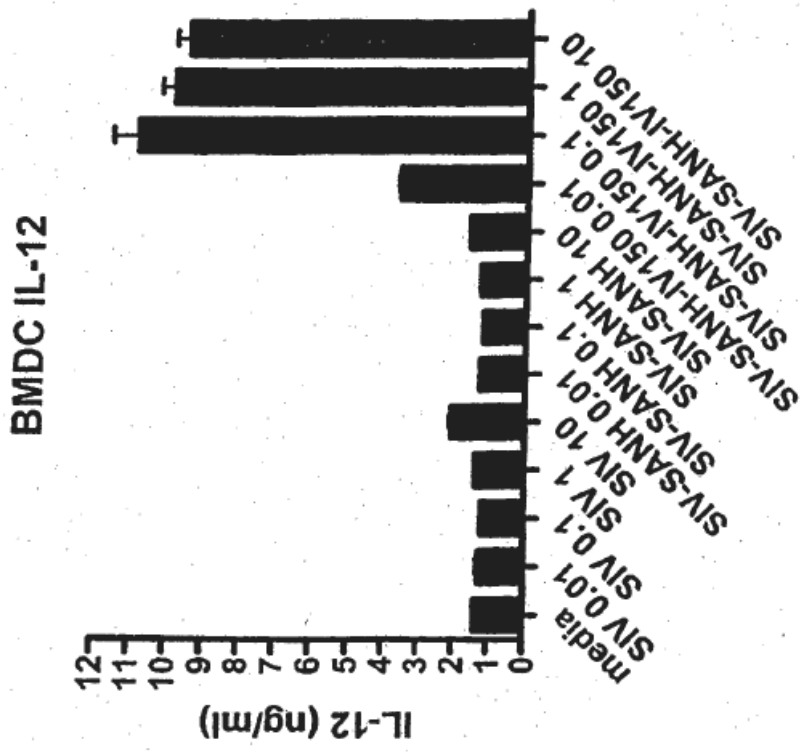


FIG. 19

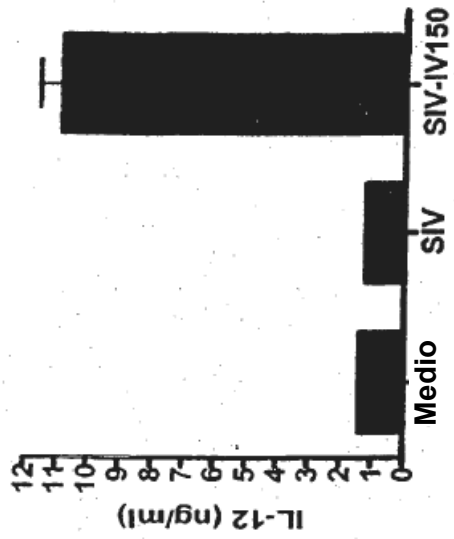


FIG. 20A

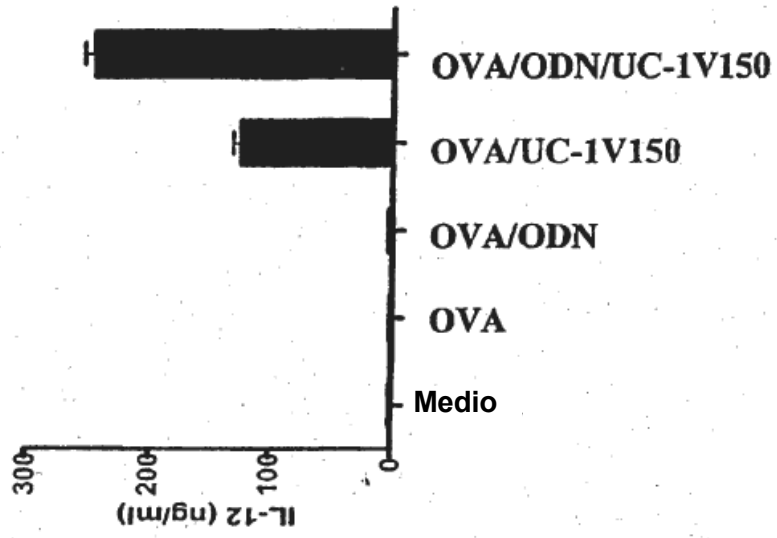


FIG. 20B

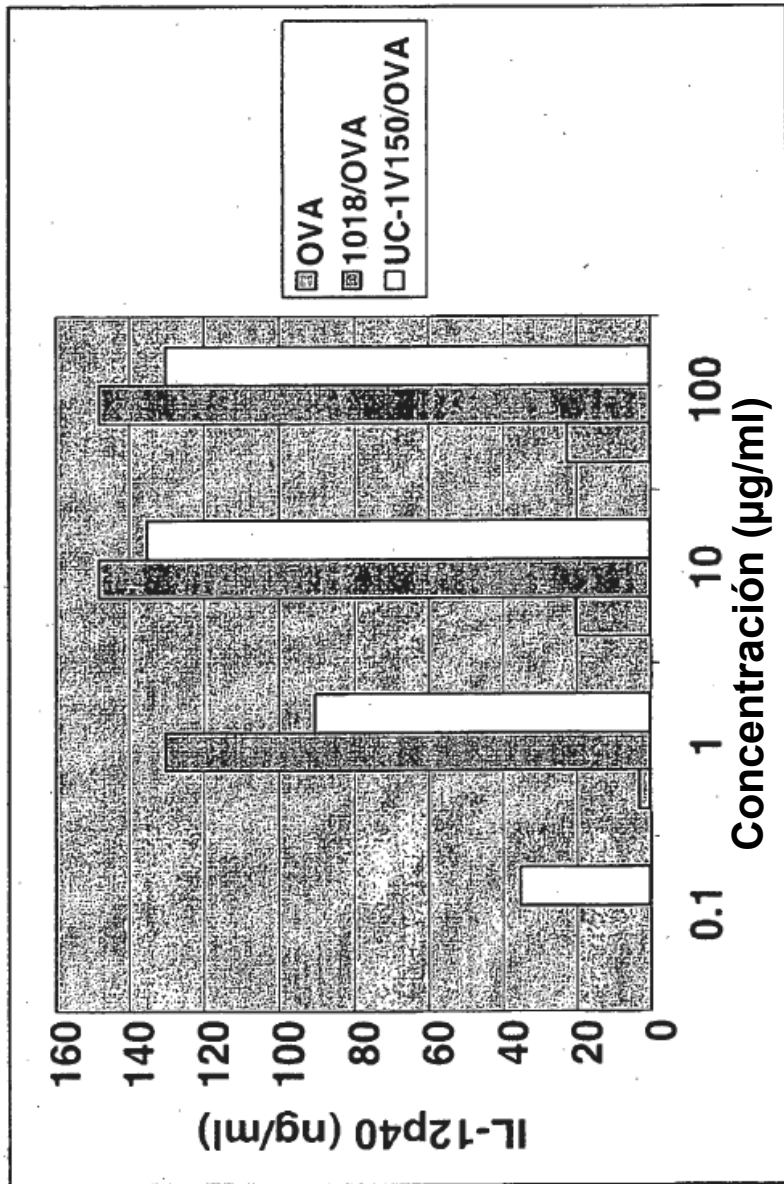


FIG. 21

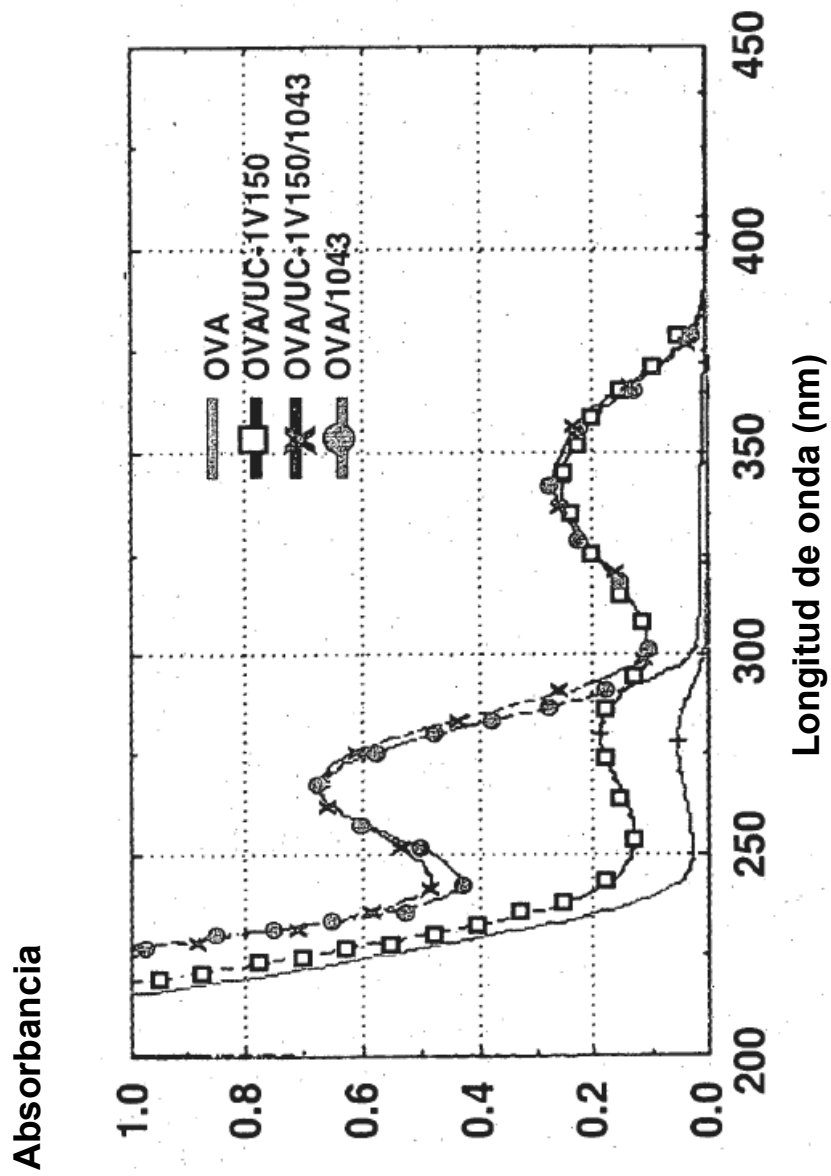


FIG. 22

Inducción de IL-2 en BMDC

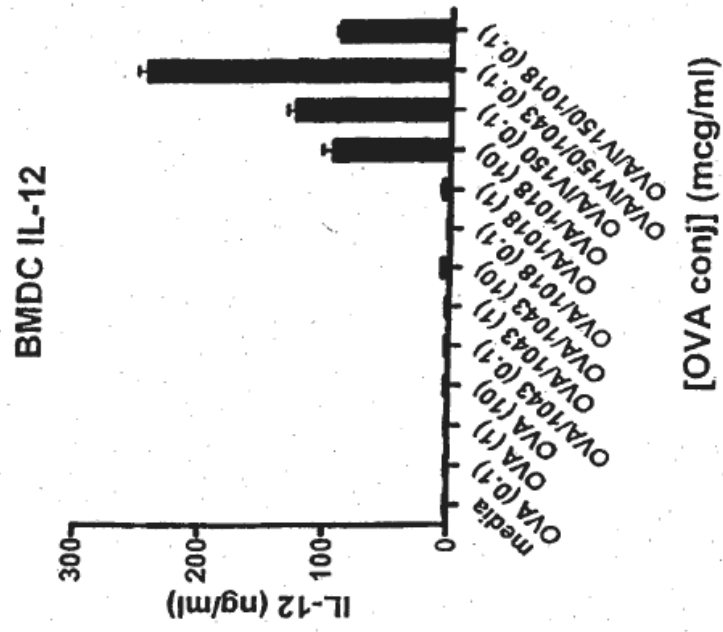


FIG. 23

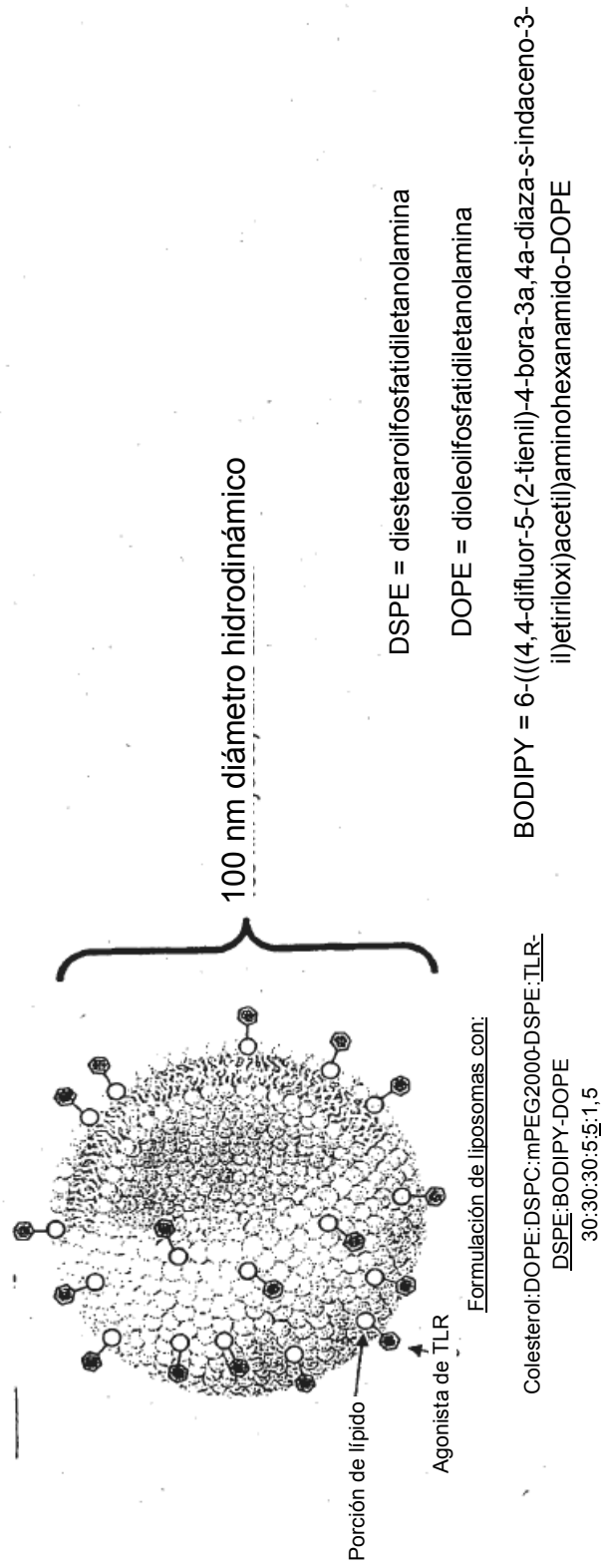


FIG. 25

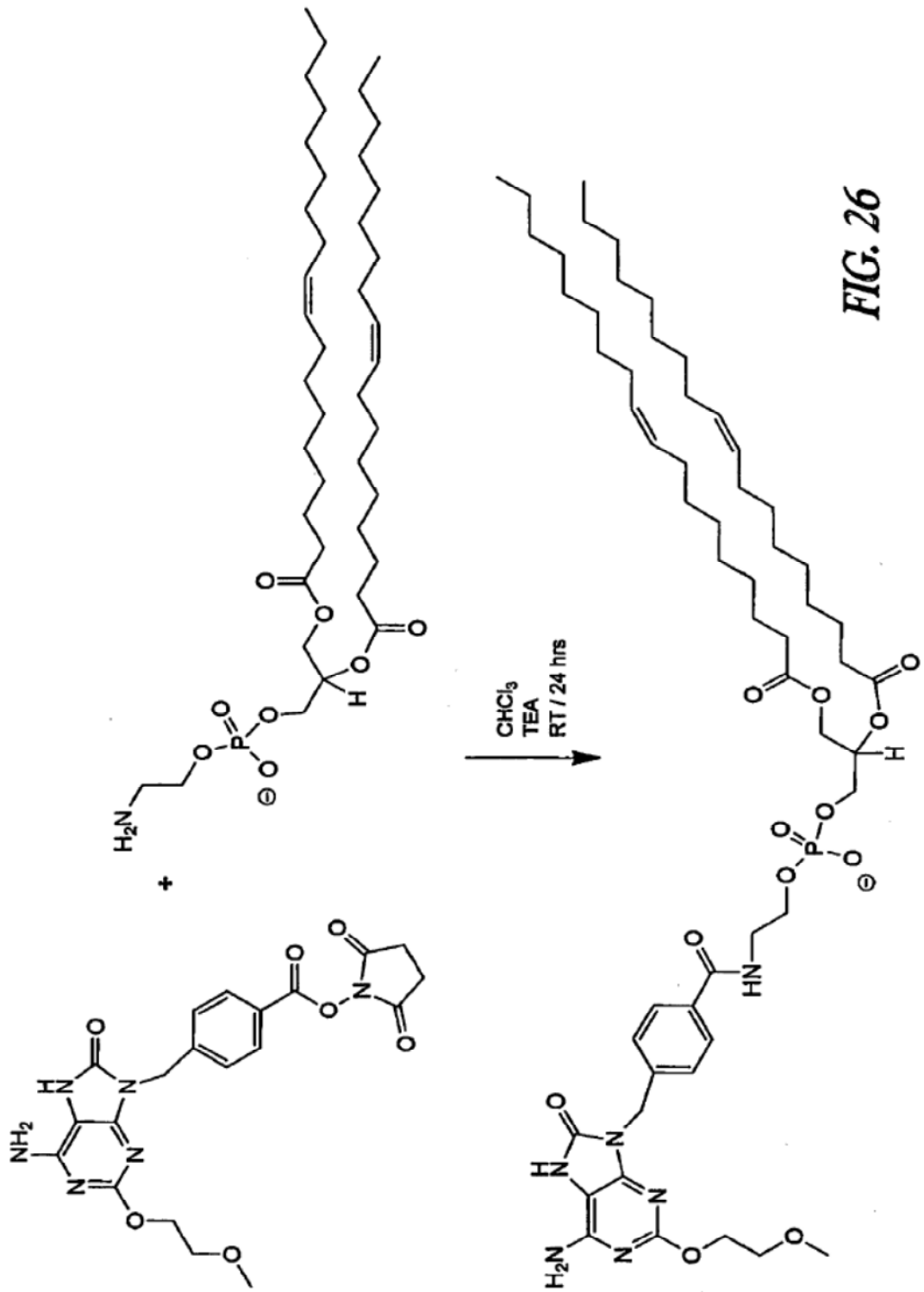
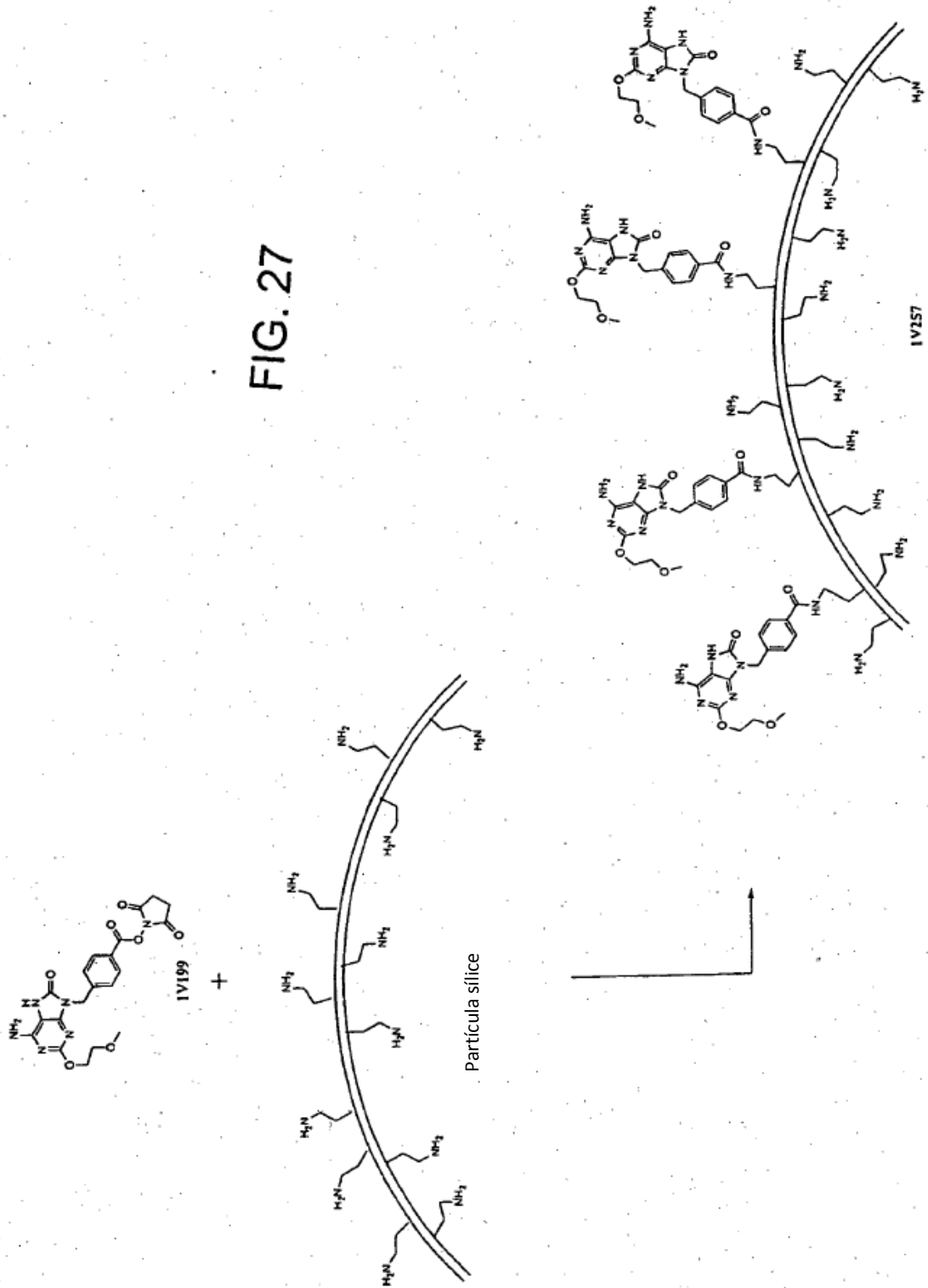


FIG. 26

FIG. 27



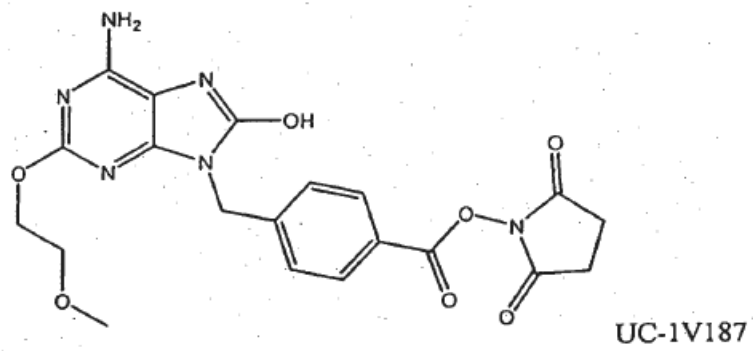
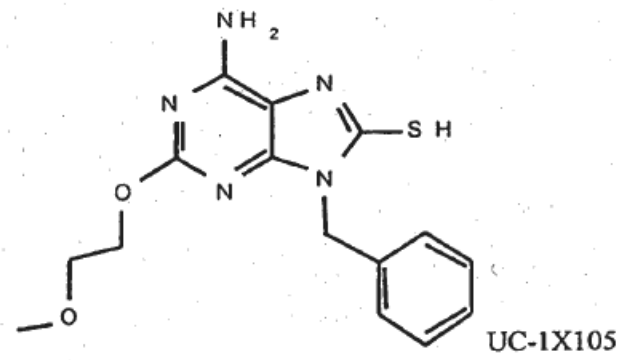
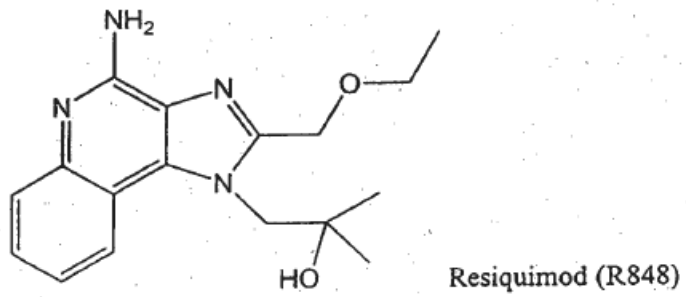
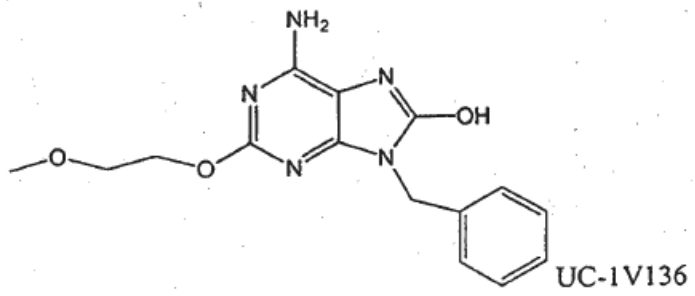
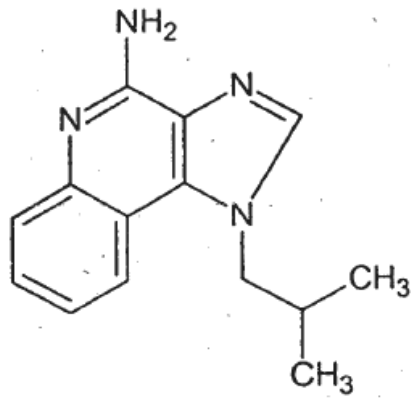
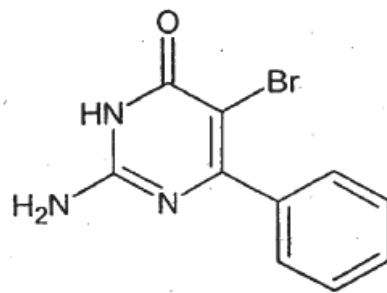


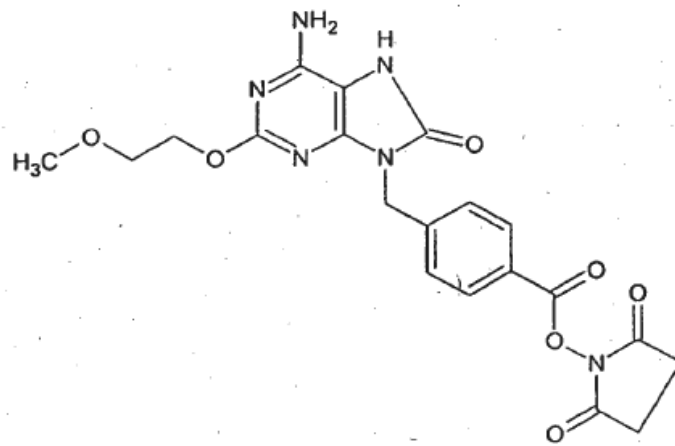
FIG. 28



Imiquimod

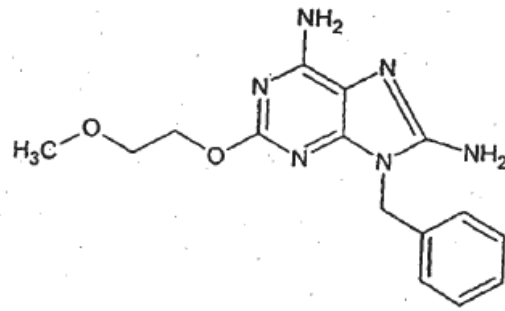


Bropirimina

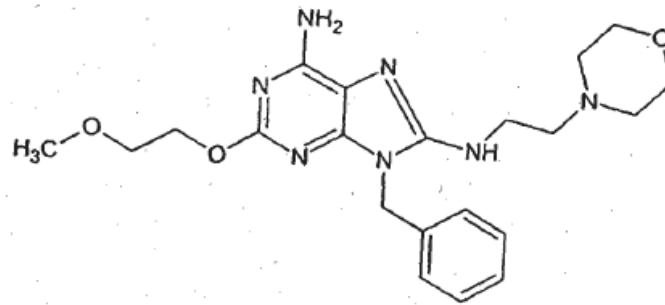


UC-1V199

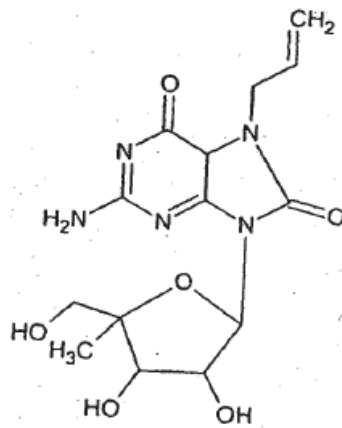
FIG. 28 (continuación)



UC-1W236

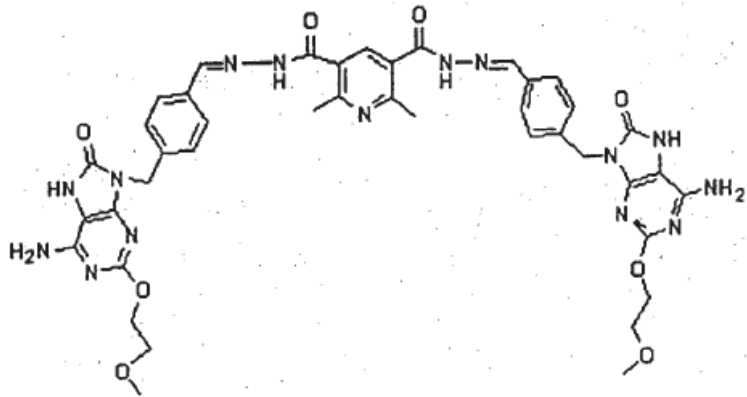


UC-1X51

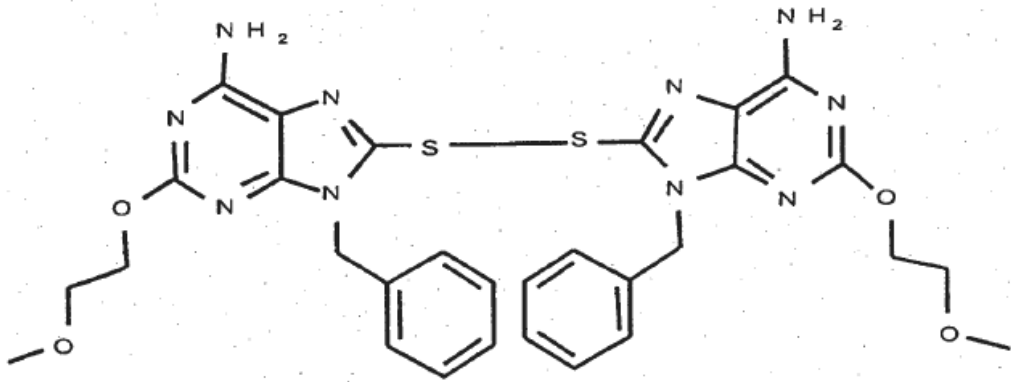


Loxoribina

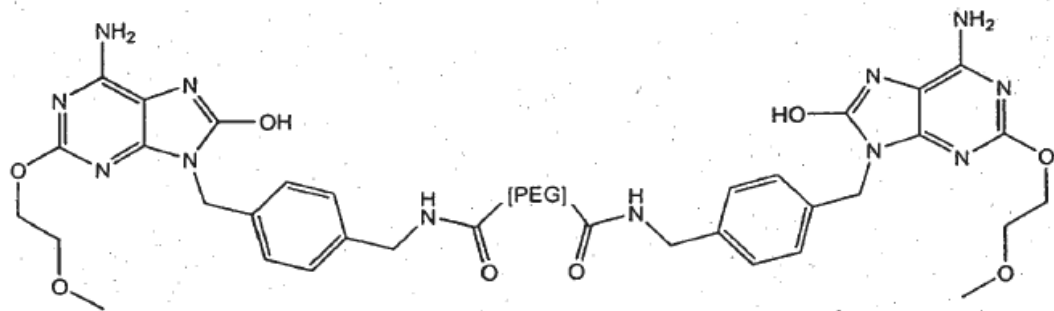
Fig. 28 (continuación)



UC-1W247



UC-1X113



UC-1V186

FIG. 28 (continuación)