

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 316**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4035 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2006 E 11151126 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.05.2014 EP 2301535**

54 Título: **Usos inmunológicos de compuestos inmunomoduladores para vacunas y terapia anti-enfermedades infecciosas**

30 Prioridad:

01.09.2005 US 712823 P

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

13.08.2014

73 Titular/es:

**CELGENE CORPORATION (100.0%)
86 Morris Avenue
Summit New Jersey 07901, US**

72 Inventor/es:

**BARTLETT, JUSTIN B.;
MULLER, GEORGE W.;
SCHAFER, PETER H.;
GALUSTIAN, CHRISTINE;
DALGLEISH, ANGUS C. y
MEYER, BRENDAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 485 316 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

Usos inmunológicos de compuestos inmunomoduladores para vacunas y terapia anti-enfermedades infecciosas

1. Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al uso de ciertas moléculas pequeñas no peptídicas conocidas como compuestos inmunomoduladores o IMiDs® en diversas aplicaciones inmunológicas, en particular como adyuvantes de vacunas, en particular adyuvantes de vacunas anticáncer. La invención también se refiere al uso de IMiDs® en combinación con vacunas para tratar o prevenir el cáncer.

2. Antecedentes

2.1 Vacunas

10 Tradicionalmente, las vacunas han consistido en patógenos atenuados vivos, organismos inactivados completos o toxinas inactivadas. En muchos casos, estas aproximaciones han sido eficaces para inducir una protección inmunitaria basada en las respuestas mediadas por anticuerpos. Sin embargo, ciertos patógenos, p.ej., VIH, VHC, TB, y malaria, requieren la inducción de la inmunidad mediada por células (IMC). Se ha demostrado que las vacunas inactivadas en general son ineficaces para producir IMC. Además, aunque las vacunas atenuadas pueden inducir
15 IMC, ciertas vacunas atenuadas pueden provocar la enfermedad en sujetos inmunodeprimidos. Como resultado de estos problemas, han surgido varias aproximaciones nuevas para el desarrollo de vacunas, tales como las subunidades de proteínas recombinantes, los péptidos sintéticos, los conjugados de polisacáridos con proteínas, y el ADN plasmídico. Aunque estas aproximaciones nuevas pueden ofrecer ventajas de seguridad importantes, un problema general es que las vacunas con frecuencia son poco inmunógenas por sí solas. Por lo tanto, existe una
20 necesidad continua de desarrollar adyuvantes potentes y seguros que se puedan usar en las formulaciones de vacunas para aumentar su inmunogenicidad. Véase, p.ej., Edelman, *Molecular Biotech.* 21: 129-148 (2002); O'Hagan *et al.*, *Biomolecular Engineering*, 18: 69-85 (2001); Singh *et al.*, *Pharm. Res.* 19(6): 715-28 (2000) para una revisión detallada del estado de la técnica en el desarrollo de vacunas.

25 Tradicionalmente, la inmunogenicidad de una formulación de vacuna se ha mejorado inyectándola en una formulación que incluye un adyuvante. Los adyuvantes inmunológicos fueron descritos inicialmente por Ramon (1924, *Ann. Inst. Pasteur*, 38: 1) "como sustancias usadas en combinación con un antígeno específico que producían una respuesta inmunitaria más fuerte que el antígeno solo". Se ha usado una amplia diversidad de sustancias, tanto biológicas como sintéticas, como adyuvantes. Sin embargo, a pesar del estudio exhaustivo de un gran número de
30 candidatos a lo largo de muchos años, los únicos adyuvantes aprobados actualmente por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. son los minerales basados en aluminio (denominados genéricamente alumbre). El alumbre tiene un registro de seguridad discutible (véase, p.ej., Malakoff, *Science*, 2000, 288: 1323), y los estudios comparativos demuestran que es un adyuvante débil para la inducción de anticuerpos hacia subunidades de proteínas y un mal adyuvante para la IMC. Además, los adyuvantes de alumbre pueden inducir una respuesta de anticuerpos IgE y se han asociado con reacciones alérgicas en ciertos sujetos (véase, p.ej., Gupta *et al.*, 1998, *Drug
35 Deliv. Rev.* 32: 155-72; Relyveld *et al.*, 1998, *Vaccine* 16: 1016-23). Muchos adyuvantes experimentales han avanzado hasta los ensayos clínicos desde el desarrollo del alumbre, y algunos han demostrado una potencia elevada, pero se ha demostrado que son demasiado tóxicos para el uso terapéutico en seres humanos. Así, existe una necesidad continua de adyuvantes seguros y potentes.

40 Las vacunas contra el cáncer han sido objeto de mucha atención. Recientemente, parece haber un consenso creciente sobre el hecho de que es menos probable que las vacunas contra el cáncer sean eficaces en un contexto de masa/carga tumoral elevada (véase, p.ej., *Nature Medicine Commentary*, 10(12): 1278 (2004) y *Cancer Immunol. Immunother.*, 53(10): 844-54 (2004)). Esto se atribuye a una inmunosupresión eficaz mediada por el tumor debido a la secreción de IL-10, TGF- β y PGE-2, entre otros.

45 Por otro lado, las pruebas recientes sugieren que inmediatamente después de la resección o ablación tumoral existe un escape de células tumorales hacia la sangre periférica. Por lo tanto, la presencia de antígeno tumoral en el contexto de una masa tumoral baja, sin inmunosupresión asociada, puede permitir la re-sensibilización de la respuesta inmunitaria. Así, existe la necesidad de un agente que estimule la inmunidad antitumoral a largo plazo, posiblemente a través de respuestas inmunitarias celulares de tipo Th1.

2.2 Células T reguladoras (células T_{reg})

50 Las células T_{reg} se refieren a una población de células T especializadas que expresan CD4 y CD25. Las células T_{reg} son excepcionales, ya que su función principal parece ser la supresión de la función de otras células. A este respecto, las células T_{reg} se denominan también "células supresoras". Se ha informado de que una característica definitoria adicional de las células T_{reg} es la expresión del factor de transcripción Foxp3.

55 Debido a la diversidad de sus efectos, las células T_{reg} han sido objeto de mucho interés. Se ha informado que las células T_{reg} pueden influir en la respuesta a la infección, autoinmunidad, trasplante, cáncer y alergia. Se ha propuesto que los modos de supresión empleados por las células T_{reg} van desde las citocinas IL-10 y TGF- β hasta el

contacto célula-célula mediante la molécula inhibidora CTLA-4. Recientemente, se ha informado que las células dendríticas (CD) pueden inducir la activación y proliferación de las células T_{reg}, aunque las CD se reconocen como activadores potentes de la respuesta inmunitaria debido, en parte, a su potencia como células presentadoras de antígenos (APC). Véase Yamazaki *et al.*, *J. Exp. Med.*, 198: 235 (2003).

5 En general, se cree que las células T_{reg} inhiben la inmunidad del hospedador, y así impiden que un inmunógeno (p.ej., una vacuna) provoque una respuesta inmunitaria eficaz en el hospedador. Por otra parte, la ausencia de células T_{reg} puede conducir a un estallido de la respuesta inmunitaria, lo que a menudo da como resultado inflamación o autoinmunidad. Por lo tanto, para maximizar la inmunidad adquirida a partir de un inmunógeno, es necesario alcanzar un equilibrio con respecto al nivel o funcionalidad de las células T_{reg}.

10 2.3 Células T gamma delta (γδ)

Las células T humanas que albergan el receptor de células T γδ representan una población única de linfocitos con una distribución tisular característica, que están presentes en el tejido linfoide organizado y también en el tejido linfoide asociado a la piel y el intestino. Las células T γδ se activan de una manera no limitada por el MHC mediante metabolitos pequeños no peptídicos fosforilados, que incluyen el ligando prototípico pirofosfato de isopentenilo (IPP).
 15 Algunos de los ligandos de las células T γδ son intermedios microbianos de la ruta de síntesis de pirofosfato de farnesilo, que es ubicua y esencial para la supervivencia celular. Se ha propuesto que esta especificidad antigénica única es la más adecuada para la activación de las células centinela independientemente de los antígenos derivados de microbios individuales (De Libero, *Immunology Today*, 18: 22-26 (1997)). Los datos recientes sugieren que las células T γδ desempeñan un papel en la vigilancia tumoral, por ejemplo, de linfomas espontáneos de células B (Street *et al.*, *J Exp Med*, 199: 879-884(2004)), ya que se ha demostrado que estas células reconocen intermedios de la ruta de mevalonato, una ruta esencial que conduce a la biosíntesis de colesterol (Gober *et al.*, *J Exp Med*, 197: 163-168 (2003)). Estos ligandos tumorales de las células T γδ se pueden potenciar mediante tratamiento con amino-bisfosfonatos (los fármacos de bisfosfonato que contienen nitrógeno incluyen pamidronato y zolodronato, y se usan en el tratamiento de mielomas), lo que sugiere que el pretratamiento con estos fármacos podría sensibilizar a las células tumorales hacia la destrucción mediada por las células T γδ. Las células T γδ también pueden aumentar la
 20 inmunidad antitumoral estimulando la maduración de las células dendríticas (Ismaili *et al.*, *Clin Immunol*, 103: 296-302 (2002)).

En situaciones distintas del cáncer, las células T γδ desempeñan un papel en la protección de la infección viral, p.ej., contra el virus del Nilo Occidental (Wang *et al.*, *J Immunol*, 171: 2524-2531 (2003)). Además, las células T γδ intraepiteliales desempeñan un papel protector en la inflamación intestinal (Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 14338-14343 (2002); e Inagaki-Ohara *et al.*, *J Immunol*, 173: 1390-1398 (2004)). Además, las células dendríticas epidérmicas que albergan TCR γδ desempeñan un papel en la cicatrización de heridas (Jameson *et al.*, *Science*, 296: 747-749 (2002)).

2.4 Compuestos inmunomoduladores

35 Se han llevado a cabo varios estudios con el objetivo de proporcionar compuestos que se puedan usar de manera segura y eficaz para tratar enfermedades asociadas a la producción anormal de TNF-α. Véase, p.ej., Marriott, J.B., *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.* 1(4):1-8 (2001); G.W. Muller, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(17): 3238-3240 (1996); y G.W. Muller, *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8: 2669-2674 (1998). Algunos estudios se han centrado en un grupo de compuestos seleccionados por su capacidad de inhibir intensamente la producción de
 40 TNF-α por las PBMC estimuladas con LPS. L.G. Corral, *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 58 (supl. 1): 1107-1113 (1999). Estos compuestos, que se denominan IMiDs[®] (Celgene Corporation) o Fármacos Inmunomoduladores, muestran no solamente una inhibición potente de TNF-α, sino también una inhibición notable de la producción de IL1β e IL12 por los monocitos inducida por LPS. IL6 inducida por LPS también se inhibe mediante los compuestos inmunomoduladores, aunque parcialmente. Estos compuestos son estimuladores potentes de IL10 inducida por LPS.
 45 *Id.* Los ejemplos particulares de IMiDs[®] incluyen, pero sin limitación, las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) ftalimidias sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindoles sustituidos descritos y reivindicados en las patentes de Estados Unidos N^os 6.281.230 y 6.316.471, ambas de G.W. Muller, *et al.*

3. Sumario de la invención

Esta descripción se refiere a los usos inmunológicos y de otro tipo de los IMiDs[®]. En particular, abarca el uso de
 50 IMiDs[®] en combinación con un inmunógeno (p.ej., una vacuna) en un régimen de dosis específico, que proporciona una respuesta inmunitaria aumentada partir del inmunógeno en comparación con las respuestas obtenidas cuando no se usan IMiDs[®].

Hernandez-Ilizaliturri *et al.* "Immunomodulatory drug CC-5013 or CC-4047 and rituximab enhance antitumor activity in a severe combined immunodeficient mouse lymphoma model", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 11, n^o. 16,
 55 15 de agosto de 2005, páginas 5984-5992, describe ensayos in vitro e in vivo del efecto combinado de lenalidomida y rituximab sobre células cancerosas. Los ensayos se llevan a cabo en células y ratones que no se han hecho resistentes previamente a rituximab.

En particular, la invención proporciona un compuesto IMiD, que es 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isindol-2-il)-

piperidin-2,6-diona, para el uso en un método para reducir la resistencia adquirida a rituximab en un paciente de cáncer, en el que el compuesto se administra antes de la administración de rituximab. En una realización de la invención, el IMiD de la invención se administra en combinación con IL-2. Según otra realización, el IMiD de la invención se administra al paciente durante cinco días antes de la administración de rituximab.

- 5 Se debería indicar que los IMiDs[®] se pueden administrar además durante y/o después de la exposición del sujeto al inmunógeno o alérgeno.

4. Descripción breve de las figuras

La FIG. 1 es una lista no limitante de vacunas que se pueden usar con respecto a esta invención.

- 10 La FIG. 2A ilustra el efecto de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona sobre la función de las células T reguladoras.

La FIG. 2B ilustra el efecto de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona sobre la función de las células T reguladoras.

La FIG. 2C ilustra el efecto de talidomida sobre la función de las células T reguladoras.

- 15 La FIG. 3 ilustra el efecto de los compuestos inmunomoduladores y talidomida sobre la expresión del marcador de T_{reg} Foxp3 (Fig. 3A - control de DMSO; Fig. 3B - 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona 1 μM; Fig. 3C - 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona 0,01 μM; Fig. 3D - 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona 1 μM; Fig. 3E - 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona 0,01 μM; Fig. 3F - talidomida 1 μM; y Fig. 3G - talidomida 0,01 μM).

- 20 La FIG. 4 ilustra el efecto de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona sobre el número de células T reguladoras.

La FIG. 5A ilustra el efecto de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona sobre la expresión de células T γδ en PBMC activadas con IL-2 e IPP.

La FIG. 5B ilustra el efecto de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona sobre la expresión de células T γδ en PBMC activadas con IL-2 e IPP.

- 25 La FIG. 5C ilustra el efecto de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona sobre la expresión de NKG2D en PBMC activadas con IL-2 e IPP.

La FIG. 5D ilustra el efecto de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona sobre la expresión de NKG2D en PBMC activadas con IL-2 e IPP.

- 30 La FIG. 6 ilustra el efecto de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona sobre la apoptosis en células T γδ en el día 4 (Fig. 6A), día 5 (Fig. 6B), día 6 (Fig. 6C), y día 7 (Fig. 6D) después del tratamiento.

Las FIGs. 7A y 7B ilustran la comparación de la producción de IFN-γ en células tratadas con αCD3 solo (Fig. 7A) y las tratadas con αCD3 y 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona (Fig. 7B) en células T γδ recién preparadas.

- 35 Las FIGs. 7C y 7D ilustran la comparación de la producción de TNF-α en células tratadas con αCD3 solo (Fig. 7C) y las tratadas con αCD3 y 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona (Fig. 7D) en células T γδ recién preparadas.

Las FIGs. 7E y 7F ilustran la comparación de la producción de IFN-γ en células tratadas con IPP solo (Fig. 7E) y las tratadas con IPP y 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona (Fig. 7F) en células T γδ recién preparadas.

- 40 Las FIGs. 7G y 7H ilustran la comparación de la producción de TNF-α en células tratadas con IPP solo (Fig. 7G) y las tratadas con IPP y 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona (Fig. 7H) en células T γδ recién preparadas.

La FIG. 8A ilustra la producción de IFN-γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor:γδ T = 0,5:1) sin preincubación con pamidronato.

- 45 La FIG. 8B ilustra la producción de IFN-γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor:γδ T = 0,5:1) sin preincubación con pamidronato, pero con tratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona.

La FIG. 8C ilustra la producción de IFN-γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor:γδ T = 1:1) sin preincubación con pamidronato.

La FIG. 8D ilustra la producción de IFN- γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor: $\gamma\delta$ T = 1:1) sin preincubación con pamidronato, pero con tratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona.

5 La FIG. 8E ilustra la producción de IFN- γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor: $\gamma\delta$ T = 2:1) sin preincubación con pamidronato.

La FIG. 8F ilustra la producción de IFN- γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor: $\gamma\delta$ T = 2:1) sin preincubación con pamidronato, pero con tratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona.

10 La FIG. 8G ilustra la producción de IFN- γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor: $\gamma\delta$ T = 0,5:1) con preincubación con pamidronato.

La FIG. 8H ilustra la producción de IFN- γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor: $\gamma\delta$ T = 0,5:1) con preincubación con pamidronato y tratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona.

La FIG. 8I ilustra la producción de IFN- γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor: $\gamma\delta$ T = 1:1) con preincubación con pamidronato.

15 La FIG. 8J ilustra la producción de IFN- γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor: $\gamma\delta$ T = 1:1) con preincubación con pamidronato y tratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona.

La FIG. 8K ilustra la producción de IFN- γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor: $\gamma\delta$ T = 2:1) con preincubación con pamidronato.

20 La FIG. 8L ilustra la producción de IFN- γ en respuesta al co-cultivo con células RPMI con (proporción tumor: $\gamma\delta$ T = 2:1) con preincubación con pamidronato y tratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona.

La FIG. 9A ilustra el efecto de los compuestos inmunomoduladores sobre la citotoxicidad de las células T $\gamma\delta$ sobre líneas celulares de MM en las que los compuestos se preincuban con las células tumorales.

25 La FIG. 9B ilustra el efecto de los compuestos inmunomoduladores sobre la citotoxicidad de las células T $\gamma\delta$ sobre líneas celulares de MM en las que los compuestos no se preincuban con las células tumorales, sino que se añaden durante el ensayo de liberación de cromo solamente.

5. Descripción detallada de la invención

Esta invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los inventores de que el pre-tratamiento con compuestos inmunomoduladores antes de la introducción de un inmunógeno (p.ej., una vacuna) da como resultado una respuesta inmunitaria aumentada en un hospedador, tal como se determina mediante los experimentos descritos en la presente memoria. Sin limitarse a una teoría particular, la administración de un compuesto inmunomodulador a un hospedador, preferiblemente antes de la introducción de un inmunógeno, aumenta la función de las células dendríticas como células presentadoras de antígenos y/o inhibe la proliferación y/o función de las células T_{reg}, lo que da como resultado una respuesta inmunitaria aumentada en el hospedador. Además, sin limitarse a ninguna teoría particular, los compuestos inmunomoduladores aumentan la actividad antitumoral innata de las células T $\gamma\delta$. Además, sin limitarse a ninguna teoría particular, también se cree que los compuestos inmunomoduladores favorecen las respuestas inmunitarias celulares de tipo Th1 eficaces necesarias para una actividad antitumoral eficaz a largo plazo, retrasando o impidiendo por ello las recidivas tumorales.

40 Por lo tanto, la invención proporciona un compuesto IMiD, que es 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona, para el uso en un método para reducir la resistencia adquirida a rituximab en un paciente de cáncer, en el que el compuesto se administra antes de la administración de rituximab. En una realización de la invención, el IMiD de la invención se administra en combinación con IL-2. Según otra realización, el IMiD de la invención se administra al paciente durante cinco días antes de la administración de rituximab.

Además, la solicitud describe IMiDs y métodos terapéuticos adicionales que usan IMiDs como tales o en combinación con un inmunógeno.

45 Por lo tanto, en la presente memoria se describen métodos para reducir o inhibir la proliferación y/o actividad inmunosupresora de las células T reguladoras que comprenden poner en contacto las células T reguladoras con un compuesto inmunomodulador de la invención durante un tiempo suficiente para reducir o inhibir la proliferación y/o actividad inmunosupresora.

50 Tal como se usa en la presente memoria, y a menos que se especifique de otra manera, la expresión "reducir o inhibir la proliferación", cuando se usa con respecto a las células T reguladoras, significa que el número de células T reguladoras en un cultivo celular o un hospedador tratado con un compuesto inmunomodulador es menor que el número de células T reguladoras en un cultivo celular o un hospedador sin el tratamiento con un compuesto inmunomodulador, tal como se determina mediante los métodos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se

describen en la presente memoria. Un método típico implica la tinción de un marcador y el análisis de la tinción mediante el uso, por ejemplo, de análisis FACS. Preferiblemente, una proliferación reducida significa que el número de células T en el cultivo u hospedador tratado con el compuesto inmunomodulador es de alrededor del 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, o 90% o menor que el del cultivo u hospedador sin tal tratamiento.

5 Tal como se usa en la presente memoria, y a menos que se especifique de otra manera, la expresión "reducir o inhibir la actividad inmunosupresora", cuando se usa con respecto a las células T reguladoras, significa que la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras, cuando se tratan o se ponen en contacto con un compuesto inmunomodulador, es menor que sin tal tratamiento o contacto. La actividad inmunosupresora se puede determinar mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en la presente memoria. En general,
10 la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras se puede estudiar monitorizando la proliferación, por ejemplo, de células CD25- estimuladas con anti-CD3 en respuesta a una señal de TCR. Preferiblemente, una actividad inmunosupresora reducida significa que la actividad de las células T reguladoras tratadas con un compuesto inmunomodulador es de alrededor del 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, o 90% o menor que la actividad de aquellas sin tal tratamiento.

15 También se describen métodos para generar una respuesta inmunitaria aumentada a partir de un inmunógeno en un sujeto (p.ej., un ser humano) que comprenden administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la administración del inmunógeno al sujeto.

Tal como se usa en la presente memoria, y a menos que se especifique de otra manera, el término "inmunógeno" significa cualquier sustancia u organismo que provoca una respuesta inmunitaria (produce inmunidad) cuando se
20 introduce en el cuerpo. Se puede usar un inmunógeno en situaciones terapéuticas en forma de una vacuna.

Tal como se usa en la presente memoria, y a menos que se especifique de otra manera, la expresión "respuesta inmunitaria aumentada" significa que, cuando se administra un inmunógeno en combinación con un compuesto inmunomodulador, hay una formación incrementada de anticuerpos, medida mediante el uso de cualquier método habitual conocido en la técnica o descrito en la presente memoria, en un sujeto que recibe tal administración en
25 comparación con un sujeto al que se le administra la misma cantidad de inmunógeno solo. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "administración en combinación con", usada con respecto a dos o más agentes terapéuticos, significa que tales agentes se administran de manera simultánea, concurrente, o secuencial mediante el uso de las mismas o diferentes vías. Preferiblemente, una respuesta inmunitaria aumentada significa un incremento de alrededor del 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, o 100% o más en la formación de anticuerpos.

30 Como se describe en la presente memoria, se administra un compuesto inmunomodulador a un sujeto alrededor de 30 días, 20 días, 15 días, 12 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 1 día, 12 horas, o 5 horas antes de la administración del inmunógeno. Como se describe adicionalmente, se administra un compuesto inmunomodulador de alrededor de 30 días a alrededor de 5 horas, de alrededor de 20 días a alrededor de 5 horas, de alrededor de 15 días a alrededor de 12 horas, de alrededor de 12 días a alrededor de 5 horas, de alrededor de 10 días a alrededor
35 de 12 horas, de alrededor de 7 días a alrededor de 12 horas, de alrededor de 5 días a alrededor de 12 horas, de alrededor de 5 días a alrededor de 1 día, de alrededor de 3 días a alrededor de 12 horas, o de alrededor de 3 días a alrededor de 1 día antes de la administración de un inmunógeno.

Como se describe adicionalmente, los métodos comprenden además una segunda administración de un compuesto inmunomodulador después de la administración de un inmunógeno. Sin limitarse a ninguna teoría particular, se cree
40 que la administración de un compuesto inmunomodulador después de la administración de un inmunógeno puede aumentar la respuesta inmunitaria obtenida a partir del inmunógeno mejorando la presentación de antígenos de las células hospedadoras, aumentando la actividad de las células T (p.ej., positivas a TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$) y generando una respuesta efectora citotóxica y una respuesta inmunitaria de memoria a largo plazo (p.ej., de tipo Th1). Como se describe adicionalmente, hay al menos dos administraciones de un compuesto inmunomodulador, una pre-
45 inmunógeno y una post-inmunógeno.

Como se describe adicionalmente, se administra un compuesto inmunomodulador a un sujeto alrededor de 30 días, 20 días, 15 días, 12 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 1 día, 12 horas, o 5 horas después de la administración del inmunógeno. Como se describe adicionalmente, se administra un compuesto inmunomodulador de alrededor de 5 horas a alrededor de 30 días, de alrededor de 5 horas a alrededor de 20 días, de alrededor de 12 horas a alrededor
50 de 15 días, de alrededor de 5 horas a alrededor de 12 días, de alrededor de 12 horas a alrededor de 10 días, de alrededor de 12 horas a alrededor de 7 días, de alrededor de 12 horas a alrededor de 5 días, de alrededor de 1 día a alrededor de 5 días, de alrededor de 12 horas a alrededor de 3 días, o de alrededor de 1 día a alrededor de 3 días después de la administración de un inmunógeno.

En la presente memoria también se describen métodos para generar una respuesta alérgica reducida en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la exposición del sujeto a un alérgeno. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "exposición del sujeto al alérgeno" abarca la exposición de un sujeto a un alérgeno que es previsible (p.ej., la ingesta de alimentos o la exposición a los alérgenos que se dan de manera natural), así como la vacunación contra alergias, en la que se administra un alérgeno a un sujeto según un esquema de dosificación a lo largo de un periodo de tiempo. Sin limitarse a una teoría particular, se

crea que los compuestos inmunomoduladores no solamente inducen preferentemente la respuesta inmunitaria Th1, sino que también inhiben y/o invierten la diferenciación de Th2, lo que da como resultado una respuesta inmunitaria más suave, que no es aguda, hacia un alérgeno mediada por las células Th1.

5 Como se describe adicionalmente, se administra un compuesto inmunomodulador a un sujeto alrededor de 30 días, 20 días, 15 días, 12 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 1 día, 12 horas, 5 horas, 2 horas, o 30 minutos antes de la exposición del sujeto a un alérgeno. Como se describe adicionalmente, se administra un compuesto inmunomodulador de alrededor de 30 días a alrededor de 30 minutos, de alrededor de 20 días a alrededor de 1 hora, de alrededor de 15 días a alrededor de 1 hora, de alrededor de 12 días a alrededor de 30 minutos, de alrededor de 10 días a alrededor de 2 horas, de alrededor de 7 días a alrededor de 2 horas, de alrededor de 5 días a alrededor de 2 horas, de alrededor de 5 días a alrededor de 1 hora, de alrededor de 1 día a alrededor de 30 minutos, o de alrededor de 1 día a alrededor de 2 horas antes de la exposición del sujeto a un alérgeno.

15 Como se describe adicionalmente, los métodos comprenden además una segunda administración de un compuesto inmunomodulador después de la exposición del sujeto a un alérgeno. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que administrar un compuesto inmunomodulador después de la exposición del sujeto a un alérgeno puede generar una respuesta inmunitaria de memoria a largo plazo (p.ej., de tipo Th1). Como se describe adicionalmente, hay al menos dos administraciones de un compuesto inmunomodulador de la invención, una pre-alérgeno y una post-alérgeno.

20 Como se describe adicionalmente, se administra un compuesto inmunomodulador a un sujeto alrededor de 30 días, 20 días, 15 días, 12 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 1 día, 12 horas, o 5 horas después de la exposición del sujeto a un alérgeno. Como se describe adicionalmente, se administra un compuesto inmunomodulador de alrededor de 5 horas a alrededor de 30 días, de alrededor de 5 horas a alrededor de 20 días, de alrededor de 12 horas a alrededor de 15 días, de alrededor de 5 horas a alrededor de 12 días, de alrededor de 12 horas a alrededor de 10 días, de alrededor de 12 horas a alrededor de 7 días, de alrededor de 12 horas a alrededor de 5 días, de alrededor de 1 día a alrededor de 5 días, de alrededor de 12 horas a alrededor de 3 días, o de alrededor de 1 día a alrededor de 3 días después de la exposición del sujeto a un alérgeno.

5.1 Inmunógenos y vacunas

30 Se pueden usar diversos inmunógenos con respecto a los métodos descritos en la presente memoria. Los inmunógenos se administran normalmente a un sujeto en forma de una composición inmunógena (p.ej., una vacuna), pero se pueden administrar en cualquier forma que sea aceptable para el uso en animales, en particular, seres humanos.

5.1.1 Inmunógenos

35 Los inmunógenos que se pueden usar en las composiciones inmunógenas incluyen antígenos de un animal, una planta, una bacteria, un protozoo, un parásito, un virus o una combinación de los mismos. Los inmunógenos pueden ser cualquier sustancia que en condiciones adecuadas den como resultado una respuesta inmunitaria en un sujeto, que incluyen, pero sin limitación, polipéptidos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, lípidos, ácidos nucleicos (p.ej., ARNs y ADN) y polisacáridos.

Una composición inmunógena puede comprender uno o más inmunógenos. La cantidad del inmunógeno usado en las composiciones puede variar dependiendo de la naturaleza química y de la potencia del inmunógeno.

40 Los inmunógenos pueden ser cualquier péptido, proteína, polipéptido viral, o un fragmento de los mismos, derivado de un virus.

45 Los inmunógenos usados en los métodos de la invención pueden ser un antígeno de un virus patógeno tal como, pero sin limitación: adenoviridae (p.ej., mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (p.ej., virus herpes simplex 1, virus herpes simplex 2, virus herpes simplex 5, y virus herpes simplex 6), leviviridae (p.ej., levivirus, fago MS2 de enterobacterias, allovirus), poxviridae (p.ej., chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus, y entomopoxvirinae), papovaviridae (p.ej., polyomavirus y papillomavirus), paramyxoviridae (p.ej., paramyxovirus, parainfluenza virus 1, morbillivirus (p.ej., virus del sarampión), rubulavirus (p.ej., virus de las paperas), pneumovirinae (p.ej., pneumovirus, virus sincitial respiratorio humano), y metapneumovirus (p.ej., pneumovirus aviar y metapneumovirus humano), picomaviridae (p.ej., enterovirus, rinovirus, hepatovirus (p.ej., virus de la hepatitis A humana), cardiovirus, y aphovirus, reoviridae (p.ej., orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cytovirus, fijivirus, phytoreovirus, y oryzavirus), retroviridae (p.ej., retrovirus de mamífero de tipo B, retrovirus de mamífero de tipo C, retrovirus aviar de tipo C, grupo de retrovirus de tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (p.ej. virus de la inmunodeficiencia humana 1 y virus de la inmunodeficiencia humana 2), spumavirus), flaviviridae (p.ej., virus de la hepatitis C), hepadnaviridae (p.ej., virus de la hepatitis B), togaviridae (p.ej., alphavirus, p.ej., virus sindbis) y rubivirus (p.ej., virus de la rubéola), rhabdoviridae (p.ej., vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus, y necleorhabdovirus), arenaviridae (p.ej., arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus lppy, y virus lassa), y coronaviridae (p.ej., coronavirus y torovirus).

Los inmunógenos usados en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser un agente de una

enfermedad infecciosa que incluyen, pero sin limitación, hemaglutinina del virus de la gripe (nº de acceso de Genbank JO2132; Air, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7639-7643; Newton *et al.*, 1983, *Virology* 128: 495-501), glicoproteína G del virus sincitial respiratorio humano (nº de acceso de Genbank Z33429; Garcia *et al.*, 1994, *J. Virol.*; Collins *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7683), proteína del núcleo, proteína de la matriz o cualquier otra proteína del virus del Dengue (nº de acceso de Genbank M19197; Hahn *et al.*, 1988, *Virology* 162: 167-180), hemaglutinina del virus del sarampión (nº de acceso de Genbank M81899; Rota *et al.*, 1992, *Virology* 188: 135-142), glicoproteína gB del virus herpes simplex de tipo 2 (nº de acceso de Genbank M14923; Bzik *et al.*, 1986, *Virology* 155:322-333), VP1 del poliovirus 1 (Emeni *et al.*, 1983, *Nature* 304:699), glicoproteínas de la cubierta del VIH 1 (Putney *et al.*, 1986, *Science* 234: 1392-1395), antígeno de superficie de la hepatitis B (Itoh *et al.*, 1986, *Nature* 308: 19; Neurath *et al.*, 1986, *Vaccine* 4: 34), toxina de la difteria (Audibert *et al.*, 1981, *Nature* 289: 543), epítipo 24M de streptococcus (Beachey, 1985, *Adv. Exp. Med. Biol.* 185:193), pilina gonocócica (Rothbard y Schoolnik, 1985, *Adv. Exp. Med. Biol.* 185:247), g50 del virus de la pseudorrabia (gpD), gII del virus de la pseudorrabia (gpB), gIII del virus de la pseudorrabia (gpC), glicoproteína H del virus de la pseudorrabia, glicoproteína E del virus de la pseudorrabia, glicoproteína 195 de la gastroenteritis transmisible, proteína de la matriz de la gastroenteritis transmisible, glicoproteína 38 del rotavirus porcino, proteína de la cápside del parvovirus porcino, antígeno protector de *Serpulina hydodysenteriae*, glicoproteína 55 de la diarrea viral bovina, hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, hemaglutinina de la gripe porcina, neuraminidasa de la gripe porcina, virus de la fiebre aftosa, virus del cólera porcino, virus de la gripe porcina, virus de la peste porcina africana, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa (p.ej., glicoproteína E o glicoproteína G del virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa) o virus de la laringotraqueítis infecciosa (p.ej., glicoproteína G o glicoproteína I del virus de la laringotraqueítis infecciosa), una glicoproteína del virus de La Crosse (Gonzales-Scarano *et al.*, 1982, *Virology* 120: 42), virus de la diarrea de terneros recién nacidos (Matsuno e Inouye, 1983, *Infection and Immunity* 39: 155), virus de la encefalomiélitis equina venezolana (Mathews y Roehrig, 1982, *J. Immunol.* 129: 2763), virus Punta Toro (Dalrymple *et al.*, 1981, en *Replication of Negative Strand Viruses*, Bishop y Compans (eds.), Elsevier, NY, pág. 167), virus de la leucemia murina (Steeves *et al.*, 1974, *J. Virol.* 14:187), virus de tumor mamario de ratón (Massey y Schochetman, 1981, *Virology* 115: 20), proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y/o antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado de los mismos (véase, p.ej., la publicación de patente del R.U. Nº GB 2034323A publicada el 4 de junio de 1980; Ganem y Varmus, 1987, *Ann. Rev. Biochem.* 56:651-693; Tiollais *et al.*, 1985, *Nature* 317:489-495), antígeno del virus de la gripe equina o herpesvirus equino (p.ej., neuraminidasa del virus de la gripe equina de tipo A/Alaska 91, neuraminidasa del virus de la gripe equina de tipo A/Miami 63, neuraminidasa del virus de la gripe equina de tipo A/Kentucky 81, glicoproteína B del herpesvirus equino de tipo 1, y glicoproteína D del herpesvirus equino de tipo 1, antígeno del virus sincitial respiratorio bovino o virus paragripal bovino (p.ej., proteína de unión del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV G), proteína de fusión del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV F), proteína de la nucleocápside del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV N), proteína de fusión del virus paragripal bovino de tipo 3 y hemaglutinina-neuraminidasa del virus paragripal bovino de tipo 3), glicoproteína 48 o glicoproteína 53 del virus de la diarrea viral bovina.

Los inmunógenos usados en los métodos descritos en la presente memoria también pueden ser un antígeno canceroso o un antígeno tumoral. Se puede usar cualquier antígeno canceroso o tumoral conocido para un experto en la técnica de acuerdo con las composiciones inmunógenas que incluyen, pero sin limitación, antígeno pan-carcinoma KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, *J. Immunol.* 142: 3662-3667; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7(4): 407-415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu *et al.*, 1991, *Cancer Res.* 51(2): 468-475), fosfato ácido prostático (Tailor *et al.*, 1990, *Nucl. Acids Res.* 18(16): 4928), antígeno prostático específico (Henttu y Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160(2): 903-910; Israeli *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53: 227-230), antígeno p97 asociado a melanoma (Estin *et al.*, 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6): 445-446), antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.* 171(4): 1375-1380), antígeno de melanoma de peso molecular elevado (HMW-MAA) (Natali *et al.*, 1987, *Cancer* 59: 55-63; Mittelman *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.* 86: 2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al.*, 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13: 294), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulos de grasa de la leche humana, antígenos asociados a tumores colorrectales, tales como: CEA, TAG-72 (Yokata *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52: 3402-3408), C017-1A (Ragnhammar *et al.*, 1993, *Int. J. Cancer* 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.*, 1982, *J. Clin. Immunol.* 2: 135), CTA-1 y LEA, antígeno 38.13 del linfoma de Burkitt (Ghetie *et al.*, 1994, *Blood* 83: 1329-1336), antígeno CD20 de linfoma B humano (Reff *et al.*, 1994, *Blood* 83: 435-445), CD33 (Sgouros *et al.*, 1993, *J. Nucl. Med.* 34: 422-430), antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2 (Saleh *et al.*, 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara *et al.*, 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36: 373-380), gangliósido GM2 (Livingston *et al.*, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12: 1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53: 5244-5250), antígeno de la superficie celular de tipo de trasplantes específicos de tumores (TSTA) tal como antígenos tumorales inducidos viralmente que incluyen el antígeno T de virus tumorales de ADN y antígenos de la cubierta de virus tumorales de ARN, alfa-fetoproteína antigénica oncofetal, tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom *et al.*, 1985, *Cancer Res.* 45: 2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno L6, L20 de carcinoma de pulmón humano (Hellstrom *et al.*, 1986, *Cancer Res.* 46: 3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno Gp37 de células T de la leucemia humana (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 1988, *J. of Immunospecificity.* 141: 1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno del cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens *et al.*, 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17: 359), antígeno linfocítico humano maligno APO-1 (Bernhard *et al.*, 1989, *Science* 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, *Nature* 314: 53-57) tal como antígeno I hallado en eritrocitos fetales,

endodermo primario, antígeno I hallado en eritrocitos adultos, embriones de preimplantación, I (Ma) hallado en adenocarcinomas gástricos, M18, M39 hallado en epitelio de mama, SSEA-1 hallado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D₁₅₆₋₂₂ hallado en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 hallado en adenocarcinoma de colon, F3 hallado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 hallado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y hallado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF hallado en células A431, serie E1 (grupo sanguíneo B) hallada en cáncer pancreático, FC10.2 hallado en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) hallado en adenocarcinoma, NS-10 hallado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49 hallado en el receptor de EGF de células A431, MH2 (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) hallado en adenocarcinoma de colon, 19.9 hallado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T_{5A7} hallado en células mieloides, R₂₄ hallado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2} y M1:22:25:8 hallados en células de carcinoma embrionario, y SSEA-3 y SSEA-4 hallados en embriones de fase celular 4 a 8. Como también se describe, el antígeno es un péptido derivado de un receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T (véase, Edelson, 1998, *The Cancer Journal* 4: 62).

Como también se describe, la composición inmunógena usada en los métodos descritos en la presente memoria es una vacuna contra el cáncer. Los ejemplos de vacunas contra el cáncer incluyen, pero sin limitación: vacunas de células dendríticas (CD) modificadas con antígenos tales como, pero sin limitación, Provenge, Neuvenge, Immunovex, vacuna de Telomerasa, Uvidem, Collidem, DCVax-próstata, y DCVax-cerebro; vacunas de péptidos tales como, pero sin limitación, Theratope, L-BLP25, Oncophage (HSPPC-96), GTOPO-99, IGN-101, Favld, Panvac-VF, Prosvac-VF, Avicine, EP-2101, MyVax, Biovaxid, Mitumomab (IMC-BEC2), IMG-GP75, HER-2 DNA/Protein AutoVac, Zyc 300, y HER-2 Protein AutoVac; vacunas contra células tumorales completas tales como, pero sin limitación, Canvaxin, Ony-P, Melacine, GVAX, GVAX y MDX-010, y Oncovax; y vacunas de vectores virales tales como, pero sin limitación, ALVAC-CEA/B&1, Allovectin-7, ALVAC, Lovaxin C, AdhTAP(OS-1), TroVax, y MVA-MUCI-IL2 (TG4010). Las características de estas vacunas se resumen en las Tablas 1-4.

Los inmunógenos pueden comprender un virus, contra el cual se desea una respuesta inmunitaria. En ciertos casos, la composición inmunógena comprende virus recombinantes o quiméricos. En otros casos, la composición inmunógena comprende un virus que está atenuado. La producción de virus recombinantes, quiméricos y atenuados se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos habituales conocidos para los expertos en la técnica. También se describe una vacuna viral recombinante atenuada o una vacuna viral recombinante inactivada. Se puede preferir una vacuna atenuada porque la multiplicación en el hospedador conduce a un estímulo prolongado de tipo y magnitud similar al que se da en las infecciones naturales, y, por lo tanto, confiere una inmunidad sustancial de larga duración. La producción de tales formulaciones de vacunas con virus vivos recombinantes se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos convencionales que implican la propagación del virus en cultivos celulares o en el alantoides de un embrión de pollo seguido de purificación.

Los virus recombinantes pueden no ser patógenos para el sujeto al que se administran. A este respecto, el uso de virus modificados genéticamente para fines de vacunas puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones adecuadas (p.ej., deleciones) en los moldes usados para la transfección puede proporcionar los virus nuevos con características de atenuación. Por ejemplo, las mutaciones específicas sin sentido que están asociadas a la sensibilidad a la temperatura o a la adaptación al frío se pueden transformar en mutaciones por deleción. Estas mutaciones deberían ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas a los mutantes sensibles al frío o a la temperatura, y las frecuencias de reversión deberían ser extremadamente bajas.

De manera alternativa, se pueden construir virus quiméricos con características "suicidas" para el uso en las composiciones inmunógenas. Tales virus pasarían solamente por una o algunas rondas de replicación en el hospedador. Cuando se usa como vacuna, el virus recombinante pasaría un/varios ciclo(s) de replicación limitado(s) e induciría un nivel suficiente de respuesta inmunitaria, pero no progresaría en el hospedador humano ni provocaría una enfermedad.

De manera alternativa, se pueden formular virus inactivados (muertos) de acuerdo con la invención. Las formulaciones de vacunas inactivadas se pueden preparar mediante el uso de técnicas convencionales para "destruir" los virus quiméricos. Las vacunas inactivadas están "muertas" en el sentido de que se ha destruido su infectividad. De manera ideal, la infectividad del virus se destruye sin afectar a su inmunogenicidad. Para preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico se puede cultivar en cultivo celular o en el alantoides de un embrión de pollo, purificarlo mediante ultracentrifugación zonal, inactivarlo con formaldehído o β-propiolactona, y mezclarlo.

También se pueden introducir en el virus epítomos completamente exógenos, que incluyen los antígenos derivados de otros patógenos virales o no virales, para el uso en las composiciones inmunógenas. Por ejemplo, se pueden introducir en la cepa atenuada antígenos de virus no relacionados tales como antígenos del VIH (gp160, gp120, gp41), de parásitos (p.ej., malaria), o antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos tumorales. En general, tales métodos incluyen inocular huevos embrionarios, recoger el líquido alantoideo, concentrar, purificar y separar el virus completo, mediante el uso, por ejemplo, de centrifugación zonal, ultracentrifugación, ultrafiltración y cromatografía en una diversidad de combinaciones.

Se puede construir prácticamente cualquier secuencia génica heteróloga en los virus quiméricos para el uso en las

composiciones inmunógenas. Preferiblemente, las secuencias génicas heterólogas son restos y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferiblemente, los epítomos que inducen una respuesta inmunitaria protectora hacia cualquiera de una diversidad de patógenos o antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes se pueden expresar mediante o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que se pueden construir en los virus quiméricos incluyen, pero sin limitación, hemaglutinina-neuraminidasa gripal y paragripal y glicoproteínas de fusión tales como los genes HN y F del PIV3 humano. Además, las secuencias génicas heterólogas que se pueden introducir en los virus quiméricos incluyen las que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras. Los ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen, pero sin limitación, citocinas, interferón de tipo 1, interferón gamma, factores estimuladores de colonias, interleucina -1, -2, -4, -5, -6, -12 y antagonistas de estos agentes.

Otras secuencias heterólogas pueden derivar de antígenos tumorales, y los virus quiméricos resultantes se pueden usar para generar una respuesta inmunitaria contra las células tumorales, lo que conduce a la remisión tumoral *in vivo*. Los virus recombinantes se pueden modificar para que expresen antígenos asociados a tumores (AAT), que incluyen, pero sin limitación, antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T (Robbins y Kawakami, 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8:628-636, incorporado en la presente memoria como referencia en su totalidad); proteínas de linaje melanocítico, que incluyen gp100, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75) y tirosinasa; antígenos ampliamente compartidos específicos de tumores, tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, N-acetilglucosaminiltransferasa-V y p15; antígenos mutados específicos de tumores, tales como β -catenina, MUM-1 y CDK4; antígenos que no son de melanoma para carcinoma mamario, ovárico, de cuello de útero y pancreático, HER-2/neu, papilomavirus humano -E6, -E7, MUC-1.

5.1.2 Vacunas y enfermedades seleccionadas como objetivo

Se puede usar una amplia diversidad de vacunas con respecto a los métodos descritos en la presente memoria. Se proporciona una lista no limitante de vacunas que se pueden usar en la FIG. 1. Las enfermedades seleccionadas como objetivo incluyen el cáncer, otras enfermedades infecciosas o inflamatorias.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para el tratamiento de cánceres, que incluyen, pero sin limitación, neoplasias, tumores, metástasis o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado. Los ejemplos específicos de cáncer incluyen, pero sin limitación: cánceres de la piel, tales como melanoma; nódulo linfático; mama; cuello del útero; útero; tracto gastrointestinal; pulmón; ovario; próstata; colon; recto; boca; cerebro; cabeza y cuello; garganta; testículos; riñón; páncreas; hueso; bazo; hígado; vejiga; laringe; fosas nasales; y cánceres relacionados con el SIDA. Los métodos descritos en la presente memoria son especialmente útiles para el tratamiento de cánceres de la sangre y de la médula ósea, tales como mieloma múltiple y leucemias agudas y crónicas, por ejemplo, leucemias linfoblásticas, mielógenas, linfocíticas, mielocíticas y síndromes mielodisplásicos que incluyen, pero sin limitación, el síndrome de la delección 5q, o síndromes mielodisplásicos asociados a otras anomalías citogénicas. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para el tratamiento, la prevención o el control de tumores primarios o metastásicos.

Otros cánceres específicos incluyen, pero sin limitación, neoplasias malignas avanzadas, amiloidosis, neuroblastoma, meningioma, hemangiopericitoma, metástasis cerebral múltiple, glioblastoma multiforme, glioblastoma, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral maligno de mal pronóstico, glioma maligno, glioma maligno recurrente, astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico, tumor neuroendocrino, adenocarcinoma rectal, cáncer colorrectal de Dukes C y D, carcinoma colorrectal no resecable, carcinoma hepatocelular metastásico, sarcoma de Kaposi, leucemia mieloblástica aguda por cariotipo, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de células T, linfoma cutáneo de células B, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular de grado bajo, melanoma metastásico (melanoma localizado, que incluye, pero sin limitación, melanoma ocular), mesotelioma maligno, síndrome de mesotelioma con derrame pleural maligno, carcinoma peritoneal, carcinoma seroso papilar, sarcoma ginecológico, sarcoma de tejidos blandos, escleroderma, vasculitis cutánea, histiocitosis de células de Langerhans, leiomiomas, fibrodisplasia osificante progresiva, cáncer de próstata resistente a hormonas, sarcoma de tejidos blandos de alto riesgo resecable, carcinoma hepatocelular no resecable, macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma quiescente, mieloma indolente, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de próstata independiente de andrógenos, cáncer de próstata no metastásico en estadio IV dependiente de andrógenos, cáncer de próstata insensible a hormonas, cáncer de próstata insensible a quimioterapia, carcinoma tiroideo papilar, carcinoma tiroideo folicular, carcinoma tiroideo medular y leiomioma. Como se describe en la presente memoria, el cáncer es metastásico. Como se describe en la presente memoria, el cáncer es resistente a la quimioterapia o la radiación.

Las enfermedades infecciosas están provocadas por agentes infecciosos tales como, pero sin limitación, virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos y parásitos.

Los ejemplos de virus que se han hallado en seres humanos incluyen, pero sin limitación, Retroviridae (p.ej., virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP); Picornaviridae (p.ej., virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humano, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (p.ej., cepas que provocan gastroenteritis); Togaviridae (p.ej., virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviviridae (p.ej., virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la

5 fiebre amarilla); Coronaviridae (p.ej., coronavirus); Rhabdoviridae (p.ej., virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (p.ej., virus del Ébola); Paramyxoviridae (p.ej., virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (p.ej., virus gripales); Bungaviridae (p.ej., virus Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); Arenaviridae (p.ej., virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (p.ej., reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus de papiloma, virus de polioma); Adenoviridae (la mayoría de adenovirus); Herpesviridae (virus herpes simplex (VHS) 1 y 2, virus varicela zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); Poxviridae (virus de la viruela, virus de vacuna, poxvirus); e Iridoviridae (p.ej., virus de la fiebre porcina africana); y virus sin clasificar (p.ej., los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1=transmitidos internamente; clase 2=transmitidos parenteralmente, p.ej., hepatitis C); virus Norwalk y virus relacionados, y astrovirus.

15 Los retrovirus que dan como resultado enfermedades infecciosas en animales y seres humanos incluyen retrovirus simples y retrovirus complejos. Los retrovirus simples incluyen los subgrupos de los retrovirus de tipo B, retrovirus de tipo C y retrovirus de tipo D. Un ejemplo de un retrovirus de tipo B es el virus del tumor mamario de ratón (MMTV). Los retrovirus de tipo C incluyen los subgrupos del grupo A tipo C (que incluyen el virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de la leucemia aviar (ALV) y virus de la mieloblastosis aviar (AMV)) y del grupo B tipo C (que incluyen el virus de la leucemia murina (MLV), virus de la leucemia felina (FeLV), virus del sarcoma murino (MSV), virus de la leucemia del mono gibón (GALV), virus la necrosis del bazo (SNV), virus de la reticuloendoteliosis (RV) y virus del sarcoma de simio (SSV)). Los retrovirus de tipo D incluyen virus del mono Mason-Pfizer (MPMV) y retrovirus de simio de tipo 1 (SRV-1). Los retrovirus complejos incluyen los subgrupos de lentivirus, virus de leucemia de células T y los virus espumosos. Los lentivirus incluyen el VIH-1, pero también incluyen el VIH-2, SIV, virus Visna, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Los virus de la leucemia de células T incluyen HTLV-1, HTLV-II, virus de la leucemia de células T de simio (STLV) y virus de la leucemia bovina (BLV). Los virus espumosos incluyen los virus espumosos humanos (HFV), virus espumosos de simio (SFV) y virus espumosos bovinos (BFV).

30 Los ejemplos de virus de ARN que son antigénicos o inmunógenos en animales vertebrados incluyen, pero sin limitación, los siguientes: miembros de la familia Reoviridae, que incluyen el género Orthoreovirus (serotipos múltiples de retrovirus de mamíferos y aves), el género Orbivirus (virus de la lengua azul, virus Eugenangee, virus Kemerovo, virus de la enfermedad equina africana y virus de la fiebre de la garrapata de Colorado), el género Rotavirus (rotavirus humano, virus de la diarrea de los terneros de Nebraska, rotavirus murino, rotavirus de simio, rotavirus bovino u ovino, rotavirus aviar); la familia Picornaviridae, que incluye el género Enterovirus (poliovirus, virus de Coxsackie A y B, virus entérico citopático humano huérfano (ECHO), virus de la hepatitis A, enterovirus de simio, virus de la encefalomielitis murina (ME), poliovirus murino, enterovirus bovinos, enterovirus porcinos), el género Cardiovirus (virus de la encefalomiocarditis (ECM), Mengovirus), el género Rhinovirus (rinovirus humanos que incluyen al menos 113 subtipos; otros rinovirus), el género Aphthovirus (fiebre aftosa (FMDV); la familia Calciviridae, que incluye el exantema vesicular del virus porcino, el virus del león marino de San Miguel, picornavirus felino y virus Norwalk; la familia Togaviridae, que incluye el género Alphavirus (virus de la encefalitis equina oriental, virus del bosque Semliki, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina de Venezuela, virus de la encefalitis equina occidental), el género Flavivirus (virus de la fiebre amarilla transmitida por mosquitos, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis de Murray Valley, virus del Nilo occidental, virus Kunjin, virus transmitido por la garrapata centroeuropea, virus transmitido por la garrapata oriental, virus del bosque de Kyasanur, virus de Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género Rubivirus (virus de la rubéola), el género Pestivirus (virus de la enfermedad de las mucosas, virus de la fiebre porcina, virus de la enfermedad de Border); la familia Bunyaviridae, que incluye el género Bunyavirus (virus Bunyamwera y relacionados, virus del grupo de la encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus de la fiebre siciliana de la mosca de la arena, virus de la fiebre del valle del Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad de la oveja de Nairobi) y el género Uukuvirus (virus Uukuniemi y relacionados); la familia Orthomyxoviridae, que incluye el género del virus de la gripe (virus de la gripe de tipo A (muchos subtipos humanos), virus de la gripe porcina y virus de la gripe aviar y equina, virus de la gripe de tipo B (muchos subtipos humanos) y virus de la gripe de tipo C (posibles géneros separados); la familia paramyxoviridae, que incluye el género Paramyxovirus (virus paragripal de tipo 1, virus Sendai, virus de la hemoadsorción, virus paragripales de tipos 2 a 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las paperas), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus de la panencefalitis esclerosante subaguda, virus del moquillo, virus Rinderpest), el género Pneumovirus (virus sincitial respiratorio (RSV), virus sincitial respiratorio bovino y virus de la neumonía de ratones); virus del bosque Semliki, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina de Venezuela, virus de la encefalitis equina occidental), el género Flavivirus (virus de la fiebre amarilla transmitida por mosquitos, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis de Murray Valley, virus del Nilo occidental, virus Kunjin, virus transmitido por la garrapata centroeuropea, virus transmitido por la garrapata oriental, virus del bosque de Kyasanur, virus de Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género Rubivirus (virus de la rubéola), el género Pestivirus (virus de la enfermedad de las mucosas, virus de la fiebre porcina, virus de la enfermedad de Border); la familia Bunyaviridae, que incluye el género Bunyavirus (virus Bunyamwera y relacionados, virus del grupo de la encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus de la fiebre siciliana de la mosca de la arena, virus de la fiebre del valle del Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre

hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad de la oveja de Nairobi) y el género Uukuvirus (virus Uukuniemi y relacionados); la familia Orthomyxoviridae, que incluye el género del virus de la gripe (virus de la gripe de tipo A (muchos subtipos humanos); virus de la gripe porcina y virus de la gripe aviar y equina; virus de la gripe de tipo B (muchos subtipos humanos) y virus de la gripe de tipo C (posibles géneros separados); la familia paramyxoviridae, que incluye el género Paramyxovirus (virus paragripal de tipo 1, virus Sendai, virus de la hemoadsorción, virus paragripal de tipos 2 a 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las paperas), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus de la panencefalitis esclerosante subaguda, virus del moquillo, virus Rinderpest), el género Pneumovirus (virus sincitial respiratorio (RSV), virus sincitial respiratorio bovino y virus de la neumonía de ratones); la familia Rhabdoviridae, que incluye el género Vesiculovirus (VSV), virus Chandipura, virus del Parque Flanders-Hart), el género Lyssavirus (virus de la rabia), Rhabdovirus del pez y dos Rhabdovirus probables (virus Marburg y virus del Ébola); la familia Arenaviridae, que incluye el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), virus Tacaribe complejo y virus Lassa; la familia Coronaviridae, que incluye el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la hepatitis de ratón, coronavirus entérico humano y la peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino).

Los virus de ADN ilustrativos que son antigénicos o inmunógenos en animales vertebrados incluyen, pero sin limitación: la familia Poxviridae, que incluye el género Orthopoxvirus (viruela principal, viruela menor, poxvacuna del mono, viruela de la vaca, viruela del búfalo, viruela del conejo, Ectromelia), el género Leporipoxvirus (Mixoma, Fibroma), el género Avipoxvirus (viruela aviar, otras viruelas aviares), el género Capripoxvirus (viruela de la oveja, viruela de la cabra), el género Suipoxvirus (viruela del cerdo), el género Parapoxvirus (virus de la dermatitis papular contagiosa, pseudoviruela de la vaca, virus de la estomatitis papular bovina); la familia Iridoviridae (virus de la fiebre porcina africana, virus 2 y 3 de la rana, virus de la linfocistis del pez); la familia Herpesviridae, que incluye los alfa-herpesvirus (herpes simplex de tipo 1 y 2, varicela-zóster, virus del aborto equino, herpes virus equino 2 y 3, virus de la pseudorrabia, virus de la queratoconjuntivitis bovina infecciosa, virus de rinotraqueitis bovina infecciosa, virus de la rinotraqueitis felina, virus de la laringotraqueitis infecciosa), los beta-herpesvirus (citomegalovirus humano y citomegalovirus del cerdo, monos y roedores), gamma-herpesvirus (virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la enfermedad de Marek, herpes saimiri, herpesvirus ateles, herpesvirus sylvilagus, herpes virus de la cobaya, virus del tumor de Lucke); la familia Adenoviridae, que incluye el género Mastadenovirus (subgrupos humanos A, B, C, D, E y sin agrupar; adenovirus de simios (al menos 23 serotipos), hepatitis canina infecciosa y adenovirus del ganado, cerdos, ovejas, ranas y muchas otras especies), el género Aviadenovirus (adenovirus aviar) y adenovirus no cultivables; la familia de Papoviridae, que incluye el género Papillomavirus (virus del papiloma humano, virus del papiloma bovino, virus del papiloma del conejo Shope y diversos virus de papiloma patógenos de otras especies), el género Polyomavirus (poliomavirus, agente vacuolizante del simio (SV-40), agente vacuolizante del conejo (RKV), virus K, virus BK, virus JC y otros virus de polioma de primates tales como el virus del papiloma linfotrófico); la familia Parvoviridae que incluye el género de virus adenoasociados, el género Parvovirus (virus de panleucopenia felina, parvovirus bovino, parvovirus canino, virus de la enfermedad del visón aleutiano, etc.). Finalmente, los virus de ADN pueden incluir virus que no encajan en las familias anteriores tales como el virus del Kuru y de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y agentes neuropáticos infecciosos crónicos.

Las infecciones o enfermedades bacterianas que se pueden tratar mediante los métodos descritos en la presente memoria están provocadas por bacterias que incluyen, pero sin limitación, las bacterias que tienen una fase intracelular en su ciclo vital, tales como micobacterias (p.ej., *Mycobacteria tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae*, o *M. africanum*), rickettsia, mycoplasma, chlamydia, y legionella. Otros ejemplos de infecciones bacterianas contempladas incluyen, pero sin limitación, las infecciones provocadas por bacilos gram-positivos (p.ej., *Listeria*, *Bacillus* tales como *Bacillus anthracis*, género *Erysipelothrix*), bacilos gram-negativos (p.ej., géneros *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Vibrio*, y *Yersinia*), bacterias espiroquetas (p.ej., género *Borrelia* que incluye *Borrelia burgdorferi* que provoca la enfermedad de Lyme), bacterias anaerobias (p.ej., géneros *Actinomyces* y *Clostridium*), cocos gram-positivos y negativos, género *Enterococcus*, género *Streptococcus*, género *Pneumococcus*, género *Staphylococcus*, género *Neisseria*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero sin limitación: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus de Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (Streptococcus de Grupo B), *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*.

Las enfermedades fúngicas que se pueden tratar mediante los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, aspergilosis, criptococosis, esporotricosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, blastomicosis, cigomicosis y candidiasis.

Las enfermedades parasitarias que se pueden tratar mediante los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, amebiasis, malaria, leishmaniasis, coccidiosis, giardiasis, criptosporidiosis, toxoplasmosis y tripanosomiasis. También se incluyen las infecciones por diversos gusanos tales como, pero sin

limitación, ascariasis, anquilostomiasis, tricuriasis, estrongiloidiasis, toxocariasis, triquinosis, oncocerciasis, filariasis y dirofilariasis. También se incluyen infecciones por diversos trematodos tales como, pero sin limitación, esquistosomiasis, paragonimiasis y clonorquiasis. Los parásitos que provocan estas enfermedades se pueden clasificar basándose en si son intracelulares o extracelulares. Un "parásito intracelular", tal como se usa en la presente memoria, es un parásito cuyo ciclo vital completo es intracelular. Los ejemplos de parásitos intracelulares en humanos incluyen *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia spp.* y *Trichinella spiralis*. Un "parásito extracelular", tal como se usa en la presente memoria, es un parásito cuyo ciclo vital completo es extracelular. Los parásitos extracelulares capaces de infectar seres humanos incluyen *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Naegleria* y *Acanthamoeba*, así como la mayoría de los helmintos. Otra clase de parásitos se define por ser principalmente extracelular pero con una existencia intracelular obligada en una fase crítica de su ciclo vital. Tales parásitos se denominan en la presente memoria "parásitos intracelulares obligados". Estos parásitos pueden existir la mayor parte de su vida o solamente una pequeña parte de su vida en un medio extracelular, pero todos tienen al menos una fase intracelular obligada en su ciclo vital. Esta última categoría de parásitos incluye *Trypanosoma rhodesiense* y *Trypanosoma gambiense*, *Isospora spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Eimeria spp.*, *Neospora spp.*, *Sarcocystis spp.*, y *Schistosoma spp.*

5.2 Alérgenos

También se describen en la presente memoria métodos para reducir o inhibir una reacción alérgica a un alérgeno en un sujeto que comprenden administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la exposición del sujeto a un alérgeno. Opcionalmente, además de la administración antes de la exposición a un alérgeno, se puede administrar un compuesto inmunomodulador durante y/o después de la exposición del sujeto a un alérgeno. Se considera que la descripción abarca cualquier tipo de exposición a alérgenos que incluye, pero sin limitación, la exposición del sujeto a alérgenos naturales, la exposición por la ingesta de alimentos y la exposición por medio de la administración de vacunas contra alergias.

Los ejemplos de alérgenos (p.ej., naturales o los contenidos en vacunas contra alergias), incluyen, pero sin limitación, alérgenos de:

ácaros tales como, pero sin limitación, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Chortoglyphus arcuatus*, *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, y *Glyphagus demesticus*;

venenos tales como, pero sin limitación, *Bombus spp.*, *Vespa crabro*, *Apis mellifera*, *Dolichovespula spp.*, *Polistes spp.*, *Vespula spp.*, *Dolichovespula maculata*, y *Dolichovespula arenaria*;

insectos tales como, pero sin limitación, *Camponotus pennsylvanicus*, *Solenopsis invicta*, *Solenopsis richteri*, *Periplaneta americana*, *Blattella germanica*, *Blatta orientalis*, *Tebanus spp.*, *Musca domestica*, *Ephemeroptera spp.*, *Culicidae sp.*, y *Heterocera spp.*;

epitelios, caspa, pelo y plumas tales como, pero sin limitación, *Serinus canaria*, *Felis catus (domesticus)*, *Bos taurus*, *Gallus gallus (domesticus)*, *Canis familiaris*, *Anas platyrhynchos*, *Meriones unguiculatus*, *Capra hircus*, *Anser domesticus*, *Cavia porcellus (cobaya)*, *Mesocricetus auratus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus*, *Mus musculus*, *Psittacidae*, *Columba fasciata*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus*, y *Ovis aries*;

hongos tales como, pero sin limitación, *Cephalosporium acremonium*, *Alternaria tenuis*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans (Pullularia pullulans)*, *Drechslera sorokiniana*, *Helminthosporium sativum*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium sphaerospermum (Homodendrum hordei)*, *Drechslera spicifera (Curvularia spicifera)*, *Epicoccum nigrum (Epicoccum purpurascens)*, *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Gliocladium viride*, *Helminthosporium solani*, *Microsporium canis*, *Mucor circinelloides f. circinelloides*, *Mucor circinelloides f. lusitanicus*, *Mucor plumbeus*, *Mycogone perniciosa*, *Neurospora intermedia*, *Nigrospora oryzae*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium brevi-compactum*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium roquefortii*, *Phoma betae*, *Phoma herbarum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Serpula lacrymans*, *Setosphaeria rostrata*, *Stemphylium botryosum*, *Stemphylium solani*, *Trichoderma harzianum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, y *Trichothecium roseum*;

tizones tales como, pero sin limitación, *Ustilago nuda*, *Ustilago cynodontis*, *Ustilago maydis*, *Sporisorium cruentum*, *Ustilago avenae*, y *Ustilago tritici*;

hierbas tales como, pero sin limitación, *Paspalum notatum*, *Cynodon dactylon*, *Poa compressa*, *Bromus inermis*, *Phalaris arundinacea*, *Zea mays*, *Elytrigia repens (Agropyron repens)*, *Sorghum haelpense*, *Poa pratensis*, *Festuca pratensis (elatior)*, *Avena sativa*, *Dactylis glomerata*, *Agrostis gigantea (alba)*, *Secale cereale*, *Leymus (Elymus) condensatus*, *Lolium perenne ssp. multiflorum*, *Lolium perenne*, *Anthoxanthum odoratum*, *Phleum pratense*, *Holcus lanatus*, *Triticum aestivum*, y *Elymus (Agropyron) smithii*;

- malezas tales como, pero sin limitación, *Atriplex polycarpa*, *Baccharis halimifolia*, *Baccharis sarothroides*, *Hymenoclea salsola*, *Amaranthus hybridus*, *Xanthium strumarium* (*commune*), *Rumex crispus*, *Eupathium capillifolium*, *Solidago* spp., *Amaranthus tuberculatus* (*Acnida tamariscina*), *Allenrolfea occidentalis*, *Chenopodium botrys*, *Kochia scoparia*, *Chenopodium album*, *Iva xanthifolia*, *Iva angustifolia*, *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia vulgaris*, *Artemisia ludoviciana*, *Urtica dioica*, *Amaranthus spinosus*, *Plantago lanceolata*, *Iva axillaris*, *Atriplex lentiformis*, *Ambrosia dumosa*, *Ambrosia acanthicarpa*, *Ambrosia trifida*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia confertiflora*, *Ambrosia bidentata*, *Ambrosia psilostachya*, *Salsola kali* (*pestifer*), *Artemisia californica*, *Artemisia frigida*, *Artemisia tridentata*, *Atriplex wrightii*, *Atriplex confertifolia*, y *Artemisia annua*;
- árboles tales como, pero sin limitación, *Acacia* spp., *Alnus glutinosa*, *Alnus rubra*, *Alnus incana* ssp. *rugosa*, *Alnus rhombifolia*, *Fraxinus velutina*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Fraxinus latifolia*, *Fraxinus americana*, *Populus tremuloides*, *Myrica cerifera*, *Fagus grandifolia* (*americana*), *Casuarina equisetifolia*, *Betula lenta*, *Betula pendula*, *Betula nigra*, *Betula occidentalis* (*fontinalis*), *Betula populifolia*, *Acer negundo*, *Cryptomeria japonica*, *Juniperus ashei* (*sabinoides*), *Juniperus virginiana*, *Tamarix gallica*, *Populus balsamifera* ssp. *trichocarpa*, *Populus deltoides*, *Populus fremontii*, *Populus wislizeni*, *Populus monilifera* (*sargentii*), *Cupressus arizonica*, *Taxodium distichum*, *Cupressus sempervirens*, *Ulmus americana*, *Ulmus crassifolia*, *Ulmus pumila*, *Eucalyptus globulus*, *Celtis occidentalis*, *Corylus americana*, *Corylus avellana*, *Carya ovata*, *Carya laciniata*, *Carya alba*, *Juniperus monosperma*, *Juniperus princhotii*, *Juniperus scopulorum*, *Juniperus occidentalis*, *Robinia pseudoacacia*, *Mangifera indica*, *Acer macrophyllum*, *Acer rubrum*, *Acer saccharum*, *Melaleuca quinquenervia* (*leucadendron*), *Prosopis glandulosa* (*juliflora*), *Broussonetia papyrifera*, *Morus rubra*, *Morus alba*, *Quercus gambelii*, *Quercus velutina*, *Quercus macrocarpa*, *Quercus kelloggii*, *Quercus agrifolia*, *Quercus lobata*, *Quercus ilex*, *Quercus stellata*, *Quercus rubra*, *Quercus dumosa*, *Quercus virginiana*, *Quercus nigra*, *Quercus garryana*, *Quercus alba*, *Olea europaea*, *Elaeagnus angustifolia*, *Citrus sinensis*, *Arecastrum romanzoffianum* (*Cocos plumosa*), *Carya illinoensis*, *Schinus molle*, *Schinus terebinthifolius*, *Pinus taeda*, *Pinus strobus*, *Pinus palustris*, *Pinus ponderosa*, *Pinus elliotii*, *Pinus virginiana*, *Pinus monticola*, *Pinus echinata*, *Populus nigra*, *Populus alba*, *Ligustrum vulgare*, *Liquidambar styraciflua*, *Platanus occidentalis*, *Platanus orientalis*, *Platanus racemosa*, *Platanus acerifolia*, *Juglans nigra*, *Juglans californica*, *Juglans regia*, *Salix lasiolepis*, *Salix nigra*, y *Salix discolor*;
- flores tales como, pero sin limitación, *Chrysanthemum leucanthemum*, *Taraxacum officinale*, y *Helianthus annuus*;
- plantas agrícolas tales como, pero sin limitación, *Medicago sativa*, *Ricinus communis*, *Trifolium pratense*, *Brassica* spp., y *Beta vulgaris*;
- alimentos de origen vegetal tales como, pero sin limitación, *Prunus dulcis*, *Malus pumila*, *Prunus armeniaca*, *Musa paradisiaca* (*sapientum*), *Hordeum vulgare*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus* sp., *Phaseolus vulgaris*, *Rubus allegheniensis*, *Vaccinium* sp., *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Fagopyrum esculentum*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Theobroma cacao*, *Cucumis melo*, *Daucus carota*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Apium graveolens* var. *dulce*, *Prunus* sp., *Cinnamomum verum*, *Coffea arabica*, *Zea mays*, *Vaccinium macrocarpon*, *Cucumis sativus*, *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Vitis* sp., *Citrus paradisi*, *Humulus lupulus*, *Citrus limon*, *Lactuca sativa*, *Agaricus campestris*, *Brassica* sp., *Myristica fragrans*, *Avena sativa*, *Olea europaea*, *Allium cepa* var. *cepa*, *Citrus sinensis*, *Vigna unguiculata*, *Pisum sativum*, *Prunus persica*, *Pyrus communis*, *Piper nigrum*, *Capsicum annuum* var. *annuum*, *Ananas comosus*, *Ipomoea batatas*, *Solanum tuberosum*, *Rubus idaeus* var. *idaeus*, *Oryza sativa*, *Secale cereale*, *Sesamum orientale* (*indicum*), *Glycine max*, *Spinacia oleracea*, *Cucurbita pepo* var. *melopepo*, *Fragaria chiloensis*, *Lycopersicon esculentum* (*lycopersicum*), *Brassica rapa* var. *rapa*, *Vanilla planifolia*, *Citrullus lanatus* var. *lanatus*, y *Triticum aestivum*;
- peces y crustáceos tales como, pero sin limitación, *Micropterus* sp., *Ictalurus punctatus*, *Mercenaria mercenaria*, *Gadus morhua*, *Callinectes sapidus*, *Platichthys* sp., *Hippoglossus* sp., *Homarus americanus*, *Scomber scombrus*, *Crassostrea virginica*, *Sebastes marinus*, *Salmo salar*, *Clupeiformes*, *Pecten magellanicus*, *Penaeus* sp., *Salvelinus* sp., y *Thunnus* sp.;
- alimentos procedentes de animales tales como, pero sin limitación, *Bos taurus*, *Ovis aries*, y *Sus scrofa*; productos procedentes de aves de corral tales como, pero sin limitación, productos del pollo (*Gallus gallus*) y productos del pavo (*Meleagris gallopavo*);
- productos lácteos tales como, pero sin limitación, caseína bovina y leche de vaca;
- frutos secos tales como, pero sin limitación, *Bertholletia excelsa*, *Anacardium occidentale*, *Cocos nucifera*, *Corylus americana*, *Arachis hypogaea*, *Carya illinoensis*, *Juglans nigra*, y *Juglans regia*;
- alérgenos diversos tales como, pero sin limitación, los de *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Acaia senegal*, *Sterculia urens*, *Astragalus gummifer*, *Ceiba pentandra*, *Iris germanica* var. *florentina*, *Chrysanthemum cinerariifolium*, *Bombyx mori*, y *Nicotiana tabacum*;
- polvos tales como, pero sin limitación, polvo del grano de cebada, polvo del grano de maíz, polvo doméstico, polvo de colchones, polvo del grano de avena, polvo del grano de trigo y polvo de tapicería.

5.3 Compuestos inmunomoduladores

Tal como se usa en la presente memoria y a menos que se indique de otra manera, las expresiones "compuestos inmunomoduladores" e "IMiDs[®]" (Celgene Corporation) abarcan ciertas moléculas orgánicas pequeñas que inhiben la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6, MIP-1 α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, y COX-2 en monocitos inducida por LPS. Los compuestos inmunomoduladores específicos se discuten más adelante.

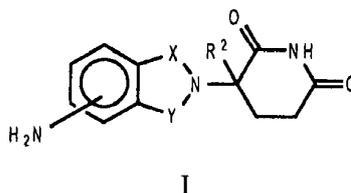
TNF- α es una citocina inflamatoria producida por los macrófagos y monocitos durante la inflamación aguda. TNF- α es responsable de una serie diversa de sucesos de señalización en las células. Sin limitarse a ninguna teoría particular, uno de los efectos biológicos ejercidos por los compuestos inmunomoduladores es la reducción de la producción de TNF- α en las células mieloides. Los compuestos inmunomoduladores pueden aumentar la degradación del mRNA de TNF- α .

Además, sin limitarse a ninguna teoría, los compuestos inmunomoduladores también pueden ser co-estimuladores potentes de las células T e incrementar drásticamente la proliferación celular de una manera dependiente de la dosis. Los compuestos inmunomoduladores también pueden tener un mayor efecto co-estimulador en el subgrupo de células T CD8+ que en el subgrupo de células T CD4+. Además, los compuestos tienen preferiblemente propiedades anti-inflamatorias contra las respuestas celulares mieloides, aunque co-estimulan de manera eficaz a las células T para que produzcan cantidades mayores de IL-2, IFN- γ , y para aumentar la proliferación de las células T y la actividad citotóxica de las células T CD8+. Además, sin limitarse a ninguna teoría particular, los compuestos inmunomoduladores pueden ser capaces de actuar tanto indirectamente por medio de la activación de citocinas como directamente en las células citolíticas naturales ("NK") y células T citolíticas naturales ("NKT"), e incrementar la capacidad de las células NK de producir citocinas beneficiosas tales como, pero sin limitación, IFN- γ , y de aumentar la actividad citotóxica de las células NK y NKT.

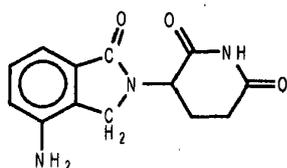
Los ejemplos específicos de compuestos inmunomoduladores incluyen los derivados ciano y carboxi de estirenos sustituidos tales como los descritos en la patente de EE.UU. n° 5.929.117; 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas tales como las descritas en las patentes de EE.UU. n°s 5.874.448 y 5.955.476; las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolinas tetra-sustituidas descritas en la patente de EE.UU. n° 5.798.368; 1-oxo y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindolinas (p.ej., derivados 4-metilo de talidomida), 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) ftalimidias sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindoles sustituidos que incluyen, pero sin limitación, los descritos en las patentes de EE.UU. n°s 5.635.517, 6.281.230, 6.316.471, 6.403.613, 6.476.052 y 6.555.554; 1-oxo y 1,3-dioxoisoindolinas sustituidas en la posición 4 ó 5 del anillo indolina (p.ej., ácido 4-(4-amino-1,3-dioxoisoindolin-2-il)-4-carbamoilbutanoico) descritas en la patente de EE.UU. n° 6.380.239; isoindolin-1-ona e isoindolin-1,3-diona sustituidas en la posición 2 con 2,6-dioxo-3-hidroxipiperidin-5-ilo (p.ej., 2-(2,6-dioxo-3-hidroxi-5-fluoropiperidin-5-il)-4-aminoisoindolin-1-ona) descritas en la patente de EE.UU. n° 6.458.810; una clase de amidas cíclicas no polipeptídicas descritas en las patentes de EE.UU. n°s 5.698.579 y 5.877.200; y compuestos isoindol-imida tales como los descritos en la publicación de patente de EE.UU. n° 2003/0045552 publicada el 6 de marzo de 2003, publicación de patente de EE.UU. n° 2003/0096841 publicada el 22 de mayo de 2003, y la solicitud internacional N° PCT/US01/50401 (publicación internacional N° WO 02/059106). Los compuestos inmunomoduladores no incluyen talidomida.

Diversos compuestos inmunomoduladores contienen uno o más centros quirales, y pueden existir en forma de mezclas racémicas de enantiómeros o mezclas de diastereómeros. Esto abarca las formas estereoméricamente puras de tales compuestos, así como el uso de las mezclas de esas formas. Por ejemplo, se pueden usar mezclas que comprenden cantidades iguales o desiguales de los enantiómeros de un compuesto inmunomodulador particular en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Estos isómeros se pueden sintetizar de manera asimétrica o resolverlos mediante el uso de técnicas habituales, tales como con columnas quirales o agentes de resolución quiral. Véase, p.ej., Jacques, J., *et al.*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, Nueva York, 1981); Wilen, S. H., *et al.*, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* pág. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

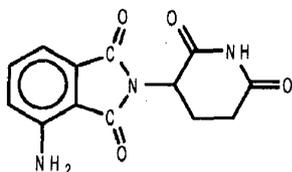
Los compuestos inmunomoduladores preferidos incluyen, pero sin limitación, 1-oxo-y 1,3 dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindolinas sustituidas con amino en el anillo bencénico como se describió en la patente de EE.UU. n° 5.635.517. Estos compuestos tienen la estructura I:



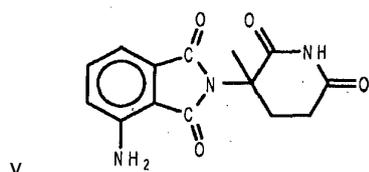
en la que uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O o CH₂, y R² es hidrógeno o alquilo inferior, en particular metilo. Los compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero sin limitación:



1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina;



1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina;

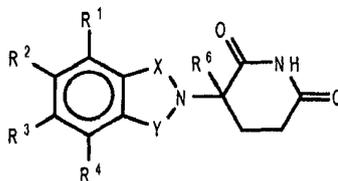


y 1,3-dioxo-2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindol, y los isómeros ópticamente puros de los mismos. Los compuestos se pueden obtener por medio de métodos sintéticos habituales (véase, p.ej., la patente de Estados Unidos nº 5.635.517, incorporada en la presente memoria como referencia). Los compuestos también están disponibles de Celgene Corporation, Warren, NJ.

5

Tal como se usa en la presente memoria, y a menos que se indique de otra manera, la expresión "ópticamente puro" significa una composición que comprende un isómero óptico de un compuesto y que está sustancialmente exenta de otros isómeros de ese compuesto. Por ejemplo, una composición ópticamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral estará sustancialmente exenta del enantiómero opuesto del compuesto. Una composición ópticamente pura de un compuesto que tiene dos centros quirales estará sustancialmente exenta de otros diastereómeros del compuesto. Un compuesto ópticamente puro típico comprende más de alrededor del 80% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de alrededor del 20% en peso de otros enantiómeros del compuesto, más preferiblemente más de alrededor del 90% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de alrededor del 10% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, aún más preferiblemente más de alrededor del 95% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de alrededor del 5% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, más preferiblemente más de alrededor del 97% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de alrededor del 3% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, y lo más preferiblemente más de alrededor del 99% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de alrededor del 1% en peso de los otros enantiómeros del compuesto.

10
15
20 Otros compuestos inmunomoduladores específicos descritos en la presente memoria pertenecen a una clase de 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) ftalimidias sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindoles sustituidos, tales como los descritos en las patentes de EE.UU. nºs 6.281.230; 6.316.471; 6.335.349; y 6.476.052, y la solicitud de patente internacional Nº PCT/US97/13375 (publicación internacional Nº WO 98/03502). Los compuestos representativos son de fórmula:



25 en la que:

uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

(i) cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, y R⁴ es -NHR⁵ y los restantes de R¹, R², R³, y R⁴ son hidrógeno;

30

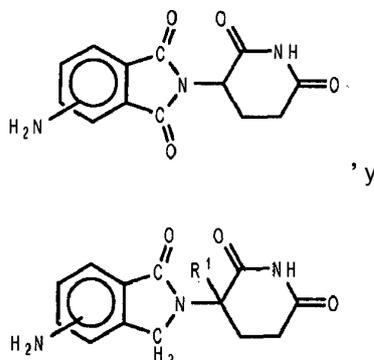
R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, bencilo, o halógeno;

con tal de que R⁶ sea distinto de hidrógeno si X e Y son C=O y (i) cada uno de R¹, R², R³, y R⁴ es fluoro o (ii) uno de

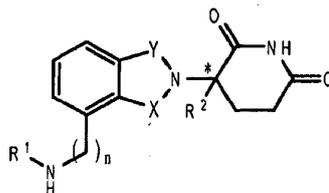
R¹, R², R³, o R⁴ es amino.

Los compuestos representativos de esta clase son de las fórmulas:



- 5 en las que R¹ es hidrógeno o metilo. También se describe en la presente memoria el uso de formas enantioméricamente puras (p.ej., enantiómeros (R) o (S) ópticamente puros) de estos compuestos.

Aún otros compuestos inmunomoduladores específicos pertenecen a una clase de isoindol-imidas descritas en las publicaciones de solicitudes de patentes de EE.UU. n°s US 2003/0096841 y US 2003/0045552, y la solicitud internacional n° PCT/US01/50401 (publicación internacional n° WO 02/059106). Los compuestos representativos son de fórmula II:



II

y las sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos farmacéuticamente aceptables y las mezclas de estereoisómeros de los mismos, en los que:

uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

- 15 R¹ es H, alquilo(C₁-C₈), cicloalquilo(C₃-C₇), alquenilo(C₂-C₈), alquinilo(C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, alquil(C₁-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R³, C(S)NR³R³ o alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵;

R² es H, F, bencilo, alquilo(C₁-C₈), alquenilo(C₂-C₈), o alquinilo(C₂-C₈);

- 20 R³ y R³ son independientemente alquilo(C₁-C₈), cicloalquilo(C₃-C₇), alquenilo(C₂-C₈), alquinilo(C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquil(C₀-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵;

R⁴ es alquilo(C₁-C₈), alquenilo(C₂-C₈), alquinilo(C₂-C₈), alquil(C₁-C₄)-OR⁵, bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), o alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅);

R⁵ es alquilo(C₁-C₈), alquenilo(C₂-C₈), alquinilo(C₂-C₈), bencilo, arilo, o heteroarilo(C₂-C₅);

- 25 cada aparición de R⁶ es independientemente H, alquilo(C₁-C₈), alquenilo(C₂-C₈), alquinilo(C₂-C₈), bencilo, arilo, heteroarilo(C₂-C₅), o alquil(C₀-C₈)-C(O)O-R⁵, o los grupos R⁶ se pueden unir para formar un grupo heterocicloalquilo;

n es 0 ó 1; y

* representa un centro de carbono quiral.

- 30 En los compuestos específicos de fórmula II, cuando n es 0 R¹ es cicloalquilo(C₃-C₇), alquenilo(C₂-C₈), alquinilo(C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), C(O)R³, C(O)OR⁴, alquil(C₁-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(S)NHR³, o alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵;

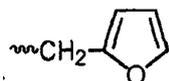
R² es H o alquilo(C₁-C₈); y

R³ es alquilo(C₁-C₈), cicloalquilo(C₃-C₇), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquil(C₅-C₈)-N(R⁶)₂; alquil(C₀-C₈)-NH-C(O)O-R⁵; alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵; y las otras variables tienen las mismas definiciones.

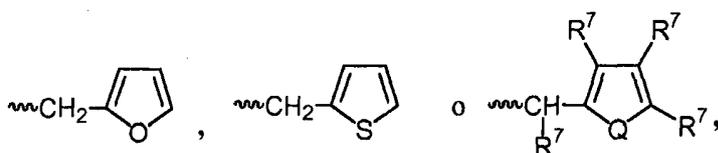
5 En otros compuestos específicos de fórmula II, R² es H o alquilo(C₁-C₄).

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es alquilo(C₁-C₈) o bencilo.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es H, alquilo(C₁-C₈), bencilo, CH₂OCH₃, CH₂CH₂OCH₃, o



En otra descripción de los compuestos de fórmula II, R¹ es



10 en la que Q es O o S, y cada aparición de R⁷ es independientemente H, alquilo(C₁-C₈), cicloalquilo(C₃-C₇), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, halógeno, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquil(C₀-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵, o las apariciones adyacentes de R⁷ se pueden considerar en conjunto para formar un alquilo bicíclico o anillo arilo.

15 En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es C(O)R³.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R³ es alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquilo(C₁-C₈), arilo, o alquil(C₀-C₄)-OR⁵.

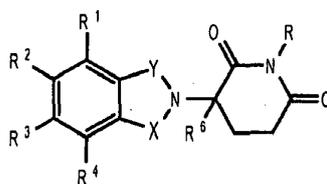
En otros compuestos específicos de fórmula II, heteroarilo es piridilo, furilo, o tienilo.

20 En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es C(O)OR⁴.

En otros compuestos específicos de fórmula II, el H de C(O)NHC(O) puede estar sustituido con alquilo(C₁-C₄), arilo, o bencilo.

25 Los ejemplos adicionales de los compuestos de esta clase incluyen, pero sin limitación: [2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil]-amida; éster *tert*-butílico de ácido (2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-carbámico; 4-(aminometil)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona; *N*-(2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-acetamida; *N*-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}ciclopropil-carboxamida; 2-cloro-*N*-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}acetamida; *N*-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)-3-piridilcarboxamida; 3-{1-oxo-4-(bencilamino)isoindolin-2-il}piperidin-2,6-diona; 2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-4-(bencilamino)isoindolin-1,3-diona; *N*-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}propanamida; *N*-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}-3-piridilcarboxamida; *N*-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}heptanamida; *N*-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}-2-furilcarboxamida; acetato de {*N*-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)carbamoil}metilo; *N*-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)pentanamida; *N*-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)-2-tienilcarboxamida; *N*-{[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil}(butilamino)carboxamida; *N*-{[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil}(octilamino)carboxamida; y *N*-{[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil}(bencilamino)carboxamida.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos pertenecen a una clase de isoindol-imidas descritas en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° US 2002/0045643, la publicación internacional n° WO 98/54170, y la patente de Estados Unidos n° 6.395.754. Los compuestos representativos son de fórmula III:



III

y las sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos farmacéuticamente aceptables y las mezclas de estereoisómeros de los mismos, en los que:

uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

5 R es H o CH₂OCOR';

(i) cada uno de R¹, R², R³, o R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, o R⁴ es nitro o -NHR⁵ y los restantes de R¹, R², R³, o R⁴ son hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 carbonos

10 R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro;

R' es R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹);

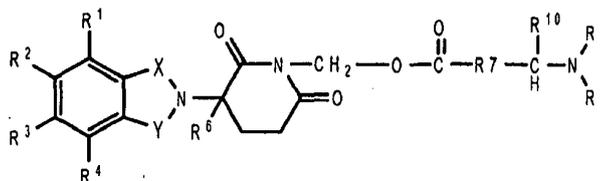
R⁷ es m-fenileno o p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en la que n tiene un valor de 0 a 4;

cada uno de R⁸ y R⁹ independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ juntos son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- en la que X¹ es -O-, -S-, o -NH-;

15 R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o fenilo; y

* representa un centro de carbono quiral.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



en la que:

20 uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

(i) cada uno de R¹, R², R³, o R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, y R⁴ es -NHR⁵ y los restantes de R¹, R², R³, y R⁴ son hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

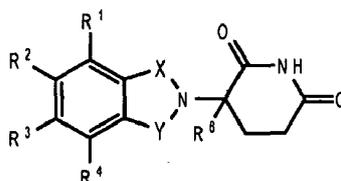
25 R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro;

R⁷ es m-fenileno o p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en la que n tiene un valor de 0 a 4;

cada uno de R⁸ y R⁹ independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ juntos son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- en la que X¹ es -O-, -S-, o -NH-; y

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o fenilo.

30 Otros compuestos representativos son de fórmula:



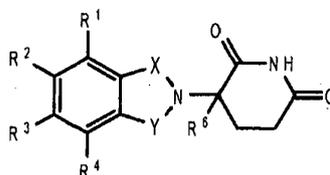
en la que

uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

- 5 cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, y R⁴ es nitro o amino protegido y los restantes de R¹, R², R³, y R⁴ son hidrógeno; y

R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



- 10 en la que:

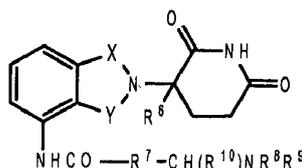
uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

(i) cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, y R⁴ es -NHR⁵ y los restantes de R¹, R², R³, y R⁴ son hidrógeno;

- 15 R⁵ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o CO-R⁷-CH(R¹⁰)NR⁸R⁹ en la que cada R⁷, R⁸, R⁹, y R¹⁰ es como se definió en la presente memoria; y

R⁶ es alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro.

Los ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



- 20 en la que:

uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

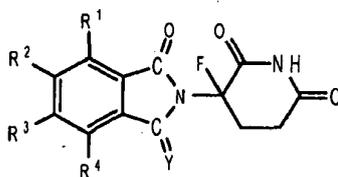
R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, bencilo, cloro, o fluoro;

R⁷ es m-fenileno, p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en la que n tiene un valor de 0 a 4;

- 25 cada uno de R⁸ y R⁹ independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ juntos son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- en la que X¹ es -O-, -S-, o -NH-; y

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o fenilo.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero sin limitación, 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas tales como las descritas en las patentes de EE.UU. n^os 5.874.448 y 5.955.476. Los compuestos representativos son de fórmula:

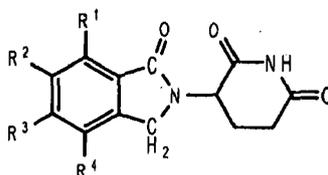


en la que:

Y es oxígeno o H₂

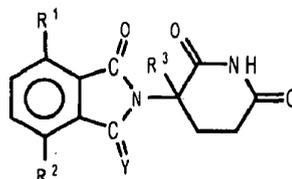
- 5 cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, o amino.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero sin limitación, las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolinas tetra-sustituidas descritas en la patente de EE.UU. nº 5.798.368. Los compuestos representativos son de fórmula:



- 10 en la que cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero sin limitación, las 1-oxo y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindolinas descritas en la patente de EE.UU. nº 6.403.613. Los compuestos representativos son de fórmula:



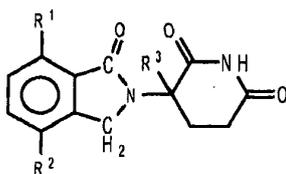
- 15 en la que

Y es oxígeno o H₂,

- 20 un primero de R¹ y R² es halógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano, o carbamoilo, el segundo de R¹ y R², independientemente del primero, es hidrógeno, halógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano, o carbamoilo, y

R³ es hidrógeno, alquilo, o bencilo.

Los ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



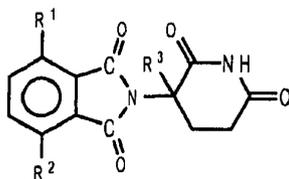
en la que

- 25 un primero de R¹ y R² es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo;

el segundo de R^1 y R^2 , independientemente del primero, es hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino en el que el alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo; y

- 5 R^3 es hidrógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o bencilo. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-metilisoindolina.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



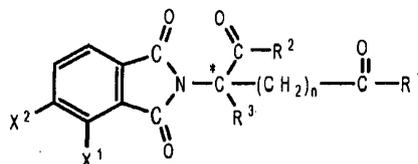
en la que:

- 10 un primero de R^1 y R^2 es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo;

el segundo de R^1 y R^2 , independientemente del primero, es hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino en el que el alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo; y

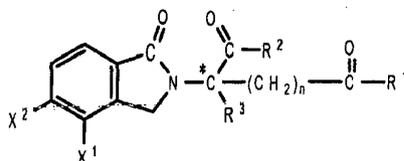
R^3 es hidrógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o bencilo.

- 15 Otros compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero sin limitación, las 1-oxo y 1,3-dioxoisindolinas sustituidas en la posición 4 o 5 del anillo de indolina descritas en la patente de EE.UU. nº 6.380.239 y la solicitud de EE.UU. pendiente junto con la presente nº 10/900.270, presentada el 28 de julio de 2004. Los compuestos representativos son de fórmula:



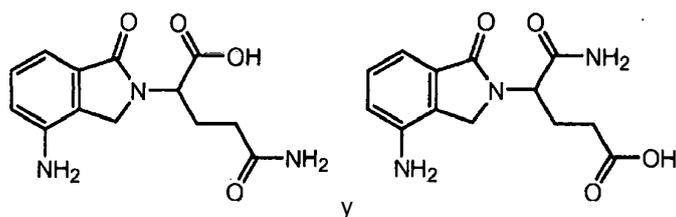
- 20 en la que el átomo de carbono denominado C^* constituye un centro de quiralidad (cuando n no es cero y R^1 no es igual que R^2); uno de X^1 y X^2 es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos, o $NH-Z$, y el otro de X^1 o X^2 es hidrógeno; cada uno de R^1 y R^2 , independientemente del otro, es hidroxilo o $NH-Z$; R^3 es hidrógeno, alquilo de uno a seis carbonos, halógeno, o haloalquilo; Z es hidrógeno, arilo, alquilo de uno a seis carbonos, formilo, o acilo de uno a seis carbonos; y n tiene un valor de 0, 1, o 2; con tal de que si X^1 es amino, y n es 1 ó 2, R^1 y R^2 no son ambos hidroxilo; y las sales de los mismos.
- 25

Los compuestos representativos adicionales son de fórmula:

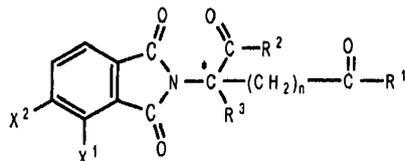


- 30 en la que el átomo de carbono denominado C^* constituye un centro de quiralidad cuando n no es cero y R^1 no es R^2 ; uno de X^1 y X^2 es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos, o $NH-Z$, y el otro de X^1 o X^2 es hidrógeno; cada uno de R^1 y R^2 , independientemente del otro, es hidroxilo o $NH-Z$; R^3 es alquilo de uno a seis carbonos, halógeno, o hidrógeno; Z es hidrógeno, arilo o un alquilo o acilo de uno a seis carbonos; y n tiene un valor de 0, 1, o 2.

- 35 Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, ácido 2-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-4-carbamoil-butírico y ácido 4-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-4-carbamoil-butírico, que tienen las estructuras siguientes, respectivamente, y las sales, solvatos, profármacos, y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos:

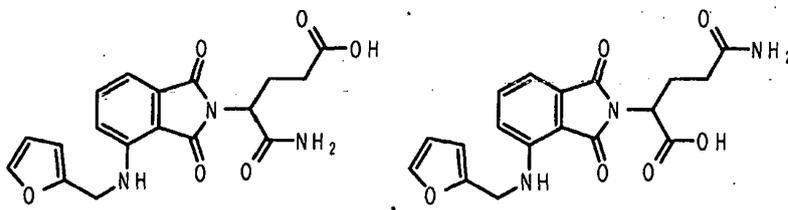


Otros compuestos representativos son de fórmula:

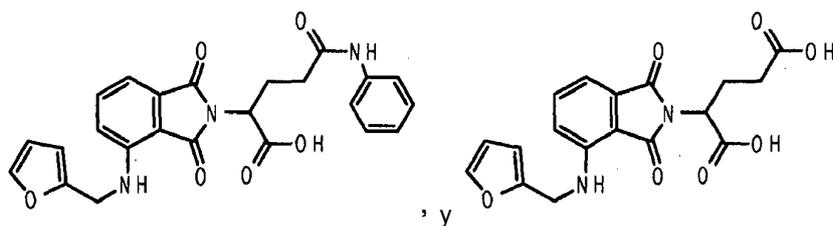


- 5 en la que el átomo de carbono denominado C* constituye un centro de quiralidad cuando n no es cero y R¹ no es R²; uno de X¹ y X² es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R², independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es alquilo de uno a seis carbonos, halógeno, o hidrógeno; Z es hidrógeno, arilo, o un alquilo o acilo de uno a seis carbonos; y n tiene un valor de 0, 1, o 2; y las sales de los mismos.

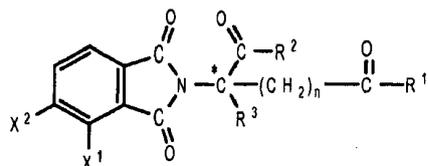
- 10 Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, ácido 4-carbamoil-4-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 4-carbamoil-2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-4-fenilcarbamoil-butírico, y ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-pentanodioico, que tienen las estructuras siguientes, respectivamente, y las sales, solvatos, profármacos, y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos:



15



Otros ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



en la que:

- 20 uno de X¹ y X² es nitro, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno;
cada uno de R¹ y R², independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z;

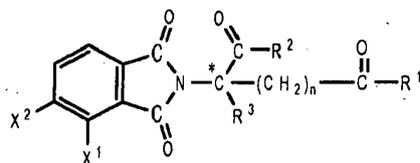
R³ es alquilo de uno a seis carbonos, halógeno, o hidrógeno;

Z es hidrógeno, fenilo, un acilo de uno a seis carbonos, o un alquilo de uno a seis carbonos; y

n tiene un valor de 0, 1, o 2; y

si -COR² y -(CH₂)_nCOR¹ son diferentes, el átomo de carbono denominado C* constituye un centro de quiralidad.

5 Otros compuestos representativos son de fórmula:



en la que:

uno de X¹ y X² es alquilo de uno a seis carbonos;

cada uno de R¹ y R², independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z;

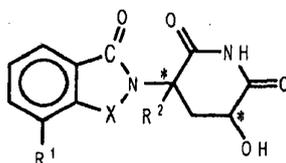
10 R³ es alquilo de uno a seis carbonos, halógeno, o hidrógeno;

Z es hidrógeno, fenilo, un acilo de uno a seis carbonos, o un alquilo de uno a seis carbonos; y

n tiene un valor de 0, 1, o 2; y

si -COR² y -(CH₂)_nCOR¹ son diferentes, el átomo de carbono denominado C* constituye un centro de quiralidad.

15 Otros compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero sin limitación, isoindolin-1-ona e isoindolin-1,3-diona sustituidas en la posición 2 con 2,6-dioxo-3-hidroxipiperidin-5-ilo descritas en la patente de EE.UU. nº 6.458.810. Los compuestos representativos son de fórmula:



en la que:

los átomos de carbono denominados * constituyen centros de quiralidad;

20 X es -C(O)- o -CH₂-;

R¹ es alquilo de 1 a 8 átomos de carbono o -NHR³;

R² es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o halógeno; y

R³ es hidrógeno,

25 alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, sin sustituir o sustituido con alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono,

fenilo, sin sustituir o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

30 bencilo, sin sustituir o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, o -COR⁴ en el que

R⁴ es hidrógeno,

alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, sin sustituir o sustituido con alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono,

fenilo, sin sustituir o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, o

5 bencilo, sin sustituir o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono.

Todos los compuestos descritos se pueden adquirir comercialmente o se pueden preparar según los métodos descritos en las patentes o publicaciones de patentes reveladas en la presente memoria. Además, los compuestos óptimamente puros se pueden sintetizar o resolver de manera asimétrica mediante el uso de agentes de resolución conocidos o columnas quirales, así como otras técnicas habituales de química orgánica sintética.

10 Los compuestos descritos en la presente memoria pueden ser moléculas orgánicas pequeñas que tienen un peso molecular menor de alrededor de 1.000 g/mol, y que no son proteínas, péptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos u otras macromoléculas.

15 Se debería indicar que si hay una discrepancia entre una estructura representada y un nombre asignado a esa estructura, se debe conceder preferencia a la estructura representada. Además, si no se indica la estereoquímica de una estructura o una porción de una estructura, por ejemplo, con líneas en negrita o discontinuas, se debe interpretar que la estructura o porción de la estructura abarca todos sus estereoisómeros.

5.4 Métodos de tratamiento y prevención

20 En la presente memoria se describen métodos para el tratamiento y/o la prevención (p.ej., un tratamiento profiláctico, tal como la vacunación) de diversos trastornos mediante el uso de un régimen de dosificación que implica un compuesto inmunomodulador como se describe en la presente memoria.

25 En particular, se describe el tratamiento o la prevención del cáncer. Los ejemplos de cáncer que se pueden tratar o prevenir mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria incluyen los descritos en la Sección 5.1.2, anteriormente. Como se describe en la presente memoria, se describen los cánceres a tratar o prevenir mediante el uso de los métodos. En otra realización, los cánceres específicos que se pueden tratar o prevenir mediante el uso de los métodos de la invención son sarcoma, carcinoma, melanoma, linfoma y leucemia.

30 En la presente memoria se describen métodos para la vacunación contra el cáncer reduciendo la inhibición de la respuesta inmunitaria antitumoral en un sujeto (p.ej., un ser humano) que comprenden administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la administración de una vacuna contra el cáncer. En la presente memoria se describen métodos para aumentar una respuesta inmunitaria a una vacuna contra el cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la administración de una vacuna contra el cáncer. Los ejemplos de vacunas contra el cáncer que se pueden usar con respecto a los métodos descritos incluyen los enumerados en las Tablas 1-4. En particular, los cánceres contra los que se lleva a cabo la vacunación son sarcoma, carcinoma, melanoma, linfoma y leucemia. Tal como se describe en la presente memoria, la vacuna contra el cáncer es una vacuna de células dendríticas modificadas con antígenos, una vacuna de péptidos, una
35 vacuna de células tumorales completas, o una vacuna de vectores virales.

40 En la presente memoria también se describe el tratamiento o la prevención de una enfermedad infecciosa. Los ejemplos de enfermedades infecciosas que se pueden tratar o prevenir mediante el uso de los métodos descritos se describen en la Sección 5.1.2, anteriormente. Como se describe en la presente memoria, las enfermedades infecciosas que se pueden tratar o prevenir mediante el uso de los métodos descritos incluyen las provocadas por virus, bacterias, hongos, y parásitos.

45 En la presente memoria también se describen métodos de vacunación contra una enfermedad infecciosa reduciendo la inhibición de una respuesta inmunitaria en un sujeto (p.ej., un ser humano) que comprenden administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la administración de una vacuna contra una enfermedad infecciosa. En la presente memoria también se describen métodos para aumentar una respuesta inmunitaria a una vacuna contra una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprenden administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la administración de la vacuna. Los ejemplos de enfermedades infecciosas contra las que se puede vacunar a un sujeto se describen en la Sección 5.1.1, anteriormente. Las enfermedades infecciosas son las provocadas por virus, bacterias, hongos, y parásitos. Como se describe en la presente memoria, la vacuna contra una enfermedad infecciosa es una vacuna contra la hepatitis B.

50 5.5 Métodos de administración

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar uno o más compuestos inmunomoduladores, o una sal, solvato, estereoisómero o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos, a un sujeto (p.ej., un ser humano) antes de la exposición o la administración de un inmunógeno o un alérgeno.

Se puede usar cualquier vía de administración. Por ejemplo, se puede administrar un compuesto inmunomodulador

de manera oral, parenteral, transdérmica, rectal, sublingual, mucosa o nasal. Además, los compuestos inmunomoduladores se pueden administrar en forma de composición farmacéutica y/o forma farmacéutica unitaria. Las formas farmacéuticas adecuadas incluyen, pero sin limitación, las cápsulas, comprimidos (que incluyen los comprimidos de disolución rápida y de liberación retardada), polvos, jarabes, suspensiones y soluciones orales para la administración parenteral. Las composiciones farmacéuticas pueden contener uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Véase, p.ej., Rowe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4ª Ed. (2003). Además, un compuesto inmunomodulador se puede incluir en un equipo, que puede comprender un inmunógeno o un alérgeno, uno o más ingredientes activos, y dispositivos e instrucciones para la administración. Se pueden incluir otros ingredientes (p.ej., inmunógenos, alérgenos, y otros ingredientes activos) en la misma formulación con el compuesto inmunomodulador, o en formulaciones distintas.

La cantidad específica del agente dependerá del agente específico usado, el tipo de enfermedad o trastorno a tratar o controlar, y la(s) cantidad(es) de un compuesto inmunomodulador y cualquier agente adicional opcional administrados simultáneamente al paciente. Las formas farmacéuticas típicas comprenden un compuesto inmunomodulador o una sal, solvato, estereoisómero, o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo en una cantidad de alrededor de 0,001 a alrededor de 150 mg. En particular, las formas farmacéuticas comprenden un compuesto inmunomodulador o una sal, solvato, estereoisómero, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de alrededor de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 50, 100, 150 ó 200 mg. En una realización particular, una forma farmacéutica comprende 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona en una cantidad de alrededor de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 5, 10, 25 ó 50 mg.

También se describe la administración de una mezcla racémica, isómero (R) ópticamente puro, o isómero (S) ópticamente puro de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona. Como se describe en la presente memoria, la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona racémica se administra en una cantidad de 1, 2, 5, 10, o 25 mg por día. Como se ha informado de que el isómero (S) de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona tiene más potencia que la mezcla racémica, se puede administrar una dosis inferior cuando se usa el isómero (S). Por ejemplo, se puede administrar (S)-4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona en una cantidad de 0,01, 0,1, 1,0, 2,5, 5, o 10 mg por día. El isómero (R) de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona se puede administrar en una cantidad comparable a la mezcla racémica.

Como se describe en la presente memoria, una forma farmacéutica comprende 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona en una cantidad de alrededor de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25 ó 50 mg. Las formas farmacéuticas típicas comprenden el segundo ingrediente activo en una cantidad de 1 µg a alrededor de 1000 mg, de alrededor de 0,01 a alrededor de 500 mg, de alrededor de 0,1 a alrededor de 350 mg, o de alrededor de 1 a alrededor de 200 mg. También se describe el uso de la mezcla racémica, isómero (S), e isómero (R) de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona. En general, la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona racémica se puede administrar en una cantidad de 1, 5, 10, 15, 25, o 50 mg por día. Los isómeros ópticos también se pueden administrar en una cantidad comparable a la mezcla racémica. Las dosis se pueden ajustar dependiendo del tipo de enfermedad o trastorno a tratar, prevenir o controlar, y la(s) cantidad(es) de un compuesto inmunomodulador y los agentes adicionales opcionales administrados simultáneamente al paciente, todo lo cual se halla dentro de la experiencia en la técnica.

6. Ejemplos

6.1 Efecto de los IMiDs sobre las células T reguladoras (Referencia)

Se llevó cabo un ensayo en el que se determinó la capacidad de las células T_{reg} aisladas de inhibir las células CD4⁺CD25⁻ activadas con el mAb anti-CD3. Los resultados demostraron que la pre-incubación de las células T_{reg} con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona (Actimid™) y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona (lenalidomida), pero no talidomida, inhibe la función supresora de estas células. Se demostró que la inhibición de la función y producción de las células T reguladoras mediante estos compuestos no fue debida a ningún efecto citotóxico o apoptótico de los IMiDs sobre las células, sino que la inhibición de la función estuvo asociada a una disminución de la expresión de FOXP3 en las células CTLA4⁺CD25^{high}CD4⁺.

6.1.1 Efecto sobre la función de las células T_{reg} (Referencia)

Las células T reguladoras se aislaron mediante el equipo Dynal de aislamiento de células T reguladoras, y se trataron durante 24 horas con concentraciones variables de un compuesto inmunomodulador (Actimid™ o lenalidomida) o DMSO. Las células se lavaron y se incubaron en una proporción 1:2 con células CD25⁺CD4⁺, que también se aislaron mediante el equipo Dynal de aislamiento de células T reguladoras. Los resultados se expresaron como el % de cambio medio de la proliferación en comparación con las cpms obtenidas de células CD25⁺ tratadas con DMSO incubadas con células CD25⁺. Tal como se muestra en la FIG. 2, el pre-tratamiento de las células CD25⁺CD4⁺ con los IMiDs ensayados incrementó significativamente la proliferación de las células CD25⁺ en presencia de células CD25⁺CD4⁺ en comparación con las células CD4⁺CD25⁺ tratadas con DMSO. La talidomida mostró poco efecto en estas condiciones de ensayo. Los resultados sugieren que los IMiDs ensayados reducen o inhiben la actividad supresora de las células T reguladoras.

6.1.2 Efecto sobre la expresión de Foxp3 (Referencia)

Se incubaron células CD4⁺CD25⁺ durante 24 horas con concentraciones variables de DMSO, Actimid™, lenalidomida o talidomida, y después se lavaron dos veces con medio RPMI. Las células se tiñeron con CD152-PE, CD4-PERCP, y CD25-APC. La tinción intracelular de Foxp3 y de CD152 se llevó a cabo después de permeabilizar las células CD4⁺CD25⁺. Los resultados se expresaron como porcentaje de la expresión de Foxp3 en la población CD4⁺CD25⁺ o la población CD4⁺CD25⁻. Tal como se muestra en la FIG. 3, las células pre-tratadas con los IMiDs mostraron la inhibición de la expresión de Foxp3, mientras DMSO y talidomida mostraron poco efecto. Los resultados demuestran que la inhibición de las células T_{reg} mediante los IMiDs ensayados puede estar asociada a la capacidad de los compuestos de inhibir la expresión de Foxp3.

6.1.3 Efecto sobre el nivel de células T_{reg} (Referencia)

Se trataron PBMCs con 150 U/ml de IL-2. Algunos de los cultivos se trataron también con Actimid™ o lenalidomida. Las células se tiñeron con CD25-FITC/CD152-PE/CD4-PerCP/NKG2D-APC y se analizaron mediante el uso de un aparato FACSCalibur. Tal como se muestra en la FIG. 4, los niveles de las células que expresan CD4, CD25^{high}, CD152^{high} se reducen en los grupos pre-tratados con un IMiD en comparación con el grupo sin tratar. Los resultados sugieren que los IMiDs descritos en la presente memoria también disminuyen los niveles de las células T reguladoras o inhiben la proliferación de tales células.

6.2 Efecto sobre la resistencia adquirida a anticuerpos

Se generaron líneas celulares resistentes a rituximab (RRCL) mediante exposición crónica de células Raji a dosis crecientes de rituximab solo (2R) o junto con complemento humano (4RH). Se llevaron a cabo ensayos funcionales que incluyeron citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad mediada por el complemento (CMC) para demostrar la resistencia a rituximab. Para estudiar el efecto de la sensibilización con lenalidomida de las PBMCs hacia RRCL, se cultivaron células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos con DMSO o lenalidomida (a concentraciones finales de 10 ó 20 µg/ml), con o sin IL-2 (20 UI/ml), durante un periodo de 5 días a 37 °C, CO₂ al 5%. Se marcaron células Raji originales y RRCL (2R y 4RH) con ⁵¹Cr y se expusieron a rituximab o trastuzumab (control de isotipo a 20 µg/ml) en presencia de un IMiD o PBMCs estimuladas con control (proporción Efecto:Objetivo de 40:1). Se midió la liberación de ⁵¹Cr y se calculó el porcentaje de lisis. Se analizaron las diferencias estadísticas mediante la prueba χ^2 .

La exposición *in vitro* de PBMC a IMiD+/-IL-2 mejoró la ADCC asociada a rituximab en RRCL. La exposición de PBMC a IMiD+/-IL-2 durante 5 días condujo a un aumento estadísticamente significativo de la ADCC mediada por rituximab en células 2R [% medio de lisis con IMiD 26,9+/-1,18%] [% medio de lisis con IMiD+IL-2 38,4+/-4,14%] en comparación con las PBMCs estimuladas con control [% medio de lisis 17,6+/-5,6%]. Se observaron efectos similares en las células 4RH. Se descubrió que el % medio de lisis por ADCC para las PBMCs expuestas a la combinación IMiD/IL-2 sobre células 4RH fue mayor a 38,4+/-4,1%, en comparación con IMiD (% medio de lisis 26,5+/-1,83%) o las PBMCs expuestas a vehículo (% medio de lisis 17,6+/-5,69%) (P = 0,01). Estos resultados sugieren que la modulación (p.ej., la sensibilización de PBMC) del sistema inmunitario mediante el IMiD de la invención (+/-IL-2) mejora la actividad antitumoral de rituximab y puede superar parcialmente la resistencia a rituximab en RRCL por medio del aumento de ADCC.

6.3 Efecto sobre la interrupción del crecimiento y la apoptosis (Referencia)

Se ensayó el efecto directo de los IMiDs en células tumorales de LNH tratando células Raji con los IMiDs solos o en combinación con anticuerpos B1 anti-CD20 o rituxan. Los IMiDs solos produjeron hasta un 40% de inhibición de la proliferación a 10 µM en las células Raji, lo que correspondió a la interrupción de G1. En combinación con B1, Actimid™ mostró un pequeño efecto aditivo a 10 µM, mientras el efecto de lenalidomida fue mínimo hasta 10 µM. En combinación con rituxan, Actimid™ mostró un ligero efecto aditivo a 10 µM, y lenalidomida mostró el mismo a 50 µM.

Se desarrolló un ensayo de co-cultivo de PBMC y células tumorales de LNH como modelo *in vitro* de interacción tumor-sistema inmunitario del hospedador, para explorar adicionalmente el potencial antitumoral de los IMiDs en las células LNH. Este ensayo no es radioactivo, y se basa en la citometría de flujo. Mediante el uso de células Raji y PBMC, se demostró que el pre-tratamiento de PBMC con un IMiD puede aumentar la actividad de las PBMC en la inducción de la apoptosis de las células Raji de una manera dependiente de la dosis. Además, se demostró que el pre-tratamiento de las células Raji con un IMiD puede aumentar adicionalmente la apoptosis inducida por PBMC pre-tratadas con un IMiD. Estos resultados sugieren que los IMiDs inducen directamente la interrupción del crecimiento de las células tumorales de LNH y aumentan de manera eficaz la apoptosis de las células tumorales inducida por PBMC.

6.4 Efecto sobre la expansión de HSC (Referencia)

Se ensayó la capacidad de los IMiDs de aumentar la expansión de las células madre hematopoyéticas (HSC) *ex vivo* en combinación con factores de crecimiento. Se demostró que los IMiDs aumentan drásticamente la expansión de las células CD34⁺ en un sistema sin suero, consiguiendo una expansión de hasta 100 veces tras 14 días en cultivo. Además, los IMiDs de la invención permitieron una expansión preferente de células CD34⁺CD38⁻, un fenotipo más

inmaduro.

Los IMiDs mostraron actividades similares en las HSC de todas las fuentes ensayadas: médula ósea, sangre de cordón umbilical y sangre periférica (en estado estable o movilizado con G-CSF). También se demostró que los IMiDs pueden expandir eficazmente las células CD34+ aisladas de unidades de sangre de cordón umbilical congeladas.

El análisis de la expresión génica global (Affymetrix) de las células CD34+ expandidas con IMiDs reveló que los IMiDs de la invención modulan diversos genes implicados en la diferenciación celular, la adhesión celular y la auto-renovación celular. Los IMiDs de la invención también estimularon muchos genes implicados en las respuestas inmunitarias y la presentación de antígenos.

6.5 Efecto sobre la diferenciación de las células T (Referencia)

Se investigó el efecto de los IMiDs sobre la diferenciación de células T mediante el uso de diversos métodos. Se demostró que, en combinación con la estimulación anti-CD3, el IMiD incrementa directamente la expresión del factor de transcripción de Th1 T-bet mediante la transcripción aumentada del ARN de T-bet a las 4 horas tras la estimulación. También se observó una disminución simultánea de la expresión del factor de transcripción de Th2 GATA-3. La regulación de dos factores de transcripción claves por el IMiD favorece la diferenciación Th1 de las células T CD4⁺ humanas sin exposición previa. El aumento de T-bet por el IMiD da como resultado una fosforilación de tirosinas incrementada de T-bet, una expresión incrementada de IL-12Rβ2, y una producción incrementada de IFN-γ, en comparación con el tratamiento con anti-CD3 solo.

También se observó un efecto similar del IMiD sobre T-bet y GATA-3 en células Th2 humanas diferenciadas *in vitro* en condiciones de polarización a Th2. La tinción de citocinas intracelulares de IL-4 e IFN-γ en las células Th2 re-estimuladas demostró que el IMiD redujo el número de células productoras de IL-4 e incrementó el número de células productoras de IFN-γ en presencia de anticuerpo anti-CD3 unido a placas. El efecto del IMiD sobre las células Th2 polarizadas incluye la inversión de la diferenciación de las células Th2 y la imposición de la expresión de IFN-γ en las células positivas para IL4, lo que se aumenta enormemente mediante la adición de IL-12 exógena. Estos resultados sugieren que los IMiDs no solamente inducen preferentemente la respuesta inmunitaria Th1, aumentando T-bet, sino que también inhiben la participación del linaje Th2 reduciendo la expresión de GATA-3.

6.6 Efecto sobre la activación de las células T (Referencia)

Las proteínas Gab, que incluyen Gab1, Gab2 y Gab3, comprenden una familia creciente de moléculas estructurales reguladas por fosfotirosina implicadas en la transducción de señales de RTK. La fosforilación de Gab1 en las células B está asociada a la actividad PI3-quinasa y a la proliferación celular. Mientras Gab1 se expresa en las células B, solamente Gab2 se expresa en las células T. Aunque Gab2 se fosforila en tirosina tras la activación del TCR mediante ZAP-70, funciona como un regulador negativo de la señalización del TCR por medio de un mecanismo dependiente de Shp-2. La sobreexpresión de Gab2 en las células T da como resultado la inhibición de la producción de IL-2 (Yamasaki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001). Se examinó el efecto de la lenalidomida sobre la fosforilación de Gab2 y la activación en células T Jurkat estimuladas con anti-CD3/CD28. La lenalidomida inhibió la fosforilación de Gab2 de una forma dependiente de la dosis (con una inhibición de aproximadamente el 50% a alrededor de 1 μM) de una manera que se correlacionó con la coestimulación de células T y el aumento de la producción de IL-2. Los resultados demuestran que el mecanismo de acción de lenalidomida es coherente, por tanto, con la inhibición de la fosforilación de Gab2 en células T estimuladas con anti-CD3/CD28.

6.7 Efecto sobre las células T γδ (Referencia)

6.7.1 Materiales y métodos

Fenotipado de preparaciones de PBMC estimuladas con IL-2 e IPP ± IMiDs: Se obtuvieron preparaciones de PBMC y se trataron semanalmente con IL-2 e IPP (150 unidades/ml y 10 μM, respectivamente). Se midió la expresión del TCR δγ y NKG2D mediante FACS durante un periodo de tres semanas.

Generación de células T γδ: Las preparaciones de PBMC se trataron con IL-2 (150 unidades/ml) e IPP (25 μM) semanalmente. Los cultivos se dividieron y se repusieron semanalmente con IL-2 e IPP recién preparados y se determinó el % de células γδ TCR+ve mediante FACS. Después de 3-4 semanas, las células T γδ se purificaron mediante separación magnética negativa mediante el uso de Dynalbeads para CD4+ y CD8+ y se mantuvieron en IL-2.

Medida de la producción de citocinas en células T γδ purificadas y células γδ recién preparadas en preparaciones de PBMC: Se estimularon células T γδ purificadas con IPP ± IMiDs (10 μg/ml) o con la línea celular de MM RPMI-8226 (± IMiDs (10 μg/ml)) en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 8-72 horas. Se recogieron los sobrenadantes exentos de células y se almacenaron a -70 °C hasta que se ensayaron mediante ELISA. Se midió IFN-γ, TNF-α e IL-2 mediante ELISA (BD Pharmingen). Para las preparaciones de γδ recientes, las PBMCs se estimularon con anti-CD3 unido a placas (1,25 μg/ml) durante 48 horas, y se midió la expresión de TNF-α, IFN-γ, IL-2 e IL-4 mediante FACS intracelular en células teñidas para el γδ TCR.

Medida de la apoptosis en células $\gamma\delta$: Las células T gamma delta se trataron con una única dosis de IPP 25 μM y semanalmente con 150 U/ml de IL-2 durante 4 semanas y 3 días. Después, las células se dejaron sin tratamiento o se trataron con Actimid™, IPP o Actimid™ e IPP. Se determinó la apoptosis tiñendo las células con anexina V PE y 7-AAD en diversos momentos y analizando mediante el uso de un aparato FACSCalibur.

- 5 Ensayos de citotoxicidad: Las células T gamma delta se trataron con una única dosis de IPP 25 μM y semanalmente con 150 U/ml de IL-2 durante 3 semanas y 1 día. Se incubaron células objetivo RPMI-8226 durante la noche con pamidronato 50 μM y después se trataron con 3 MBq de ^{51}Cr . Se incubaron células objetivo y efectoras a diferentes proporciones, y después de 4 horas se ensayó la liberación de cromo. Para determinar el efecto de Actimid™, el compuesto se incluyó en la preincubación de 22 días antes del ensayo y en la etapa de liberación de cromo, o se incluyó durante el ensayo de liberación de cromo.

6.7.2 Efecto sobre la expresión de las células T $\gamma\delta$ y NKG2D (Referencia)

- 15 Las PBMCs se trataron con una única dosis de IPP 25 μM y después semanalmente con 150 U/ml de IL-2. Además, algunos cultivos se trataron con lenolidomida o Actimid™ 10 μM . Las células tratadas con IL-2 se tiñeron con CD25 FITC/CD4 PE/CD3 PerCP/NKG2D APC, y las células tratadas con IL-2 más IPP se tiñeron con $\delta\gamma$ TCR FITC/alfa beta TCR PE/CD3 PerCP/NKG2D APC y se analizaron mediante el uso de un aparato FACSCalibur.

Tal como se muestra en la FIG. 5, las células tratadas con un compuesto inmunomodulador exhibieron mayor expresión de células T $\gamma\delta$ y NKG2D. Los resultados demuestran que los compuestos inmunomoduladores aumentan la expresión de células T $\gamma\delta$ y NKG2D en las PBMCs activadas con IL-2 e IPP.

6.7.3 Efecto de la apoptosis de células T $\gamma\delta$ (Referencia)

- 20 Las células T gamma delta se trataron con una única dosis de IPP 25 μM y semanalmente con 150 U/ml de IL-2 durante 31 días. Después las células se dejaron sin tratar o se trataron con Actimid™, IPP, o Actimid™ e IPP en combinación. Se determinó la apoptosis tiñendo las células con anexina V PE y 7-AAD en los momentos indicados y analizando mediante el uso de un aparato FACSCalibur. Las células negativas a anexina V PE/negativas a 7-AAD se denominan vivas, las positivas a anexina V PE/negativas a 7-AAD apoptóticas tempranas, las positivas a anexina V PE/positivas a 7-AAD apoptóticas tardías y las negativas a anexina V PE/positivas a 7-AAD muertas.

Tal como se muestra en la FIG. 6, Actimid™ ofreció protección contra la apoptosis en las células T $\gamma\delta$ con o sin IPP. Los resultados sugieren que los compuestos inmunomoduladores protegen contra la apoptosis de las células T $\gamma\delta$.

6.7.4 Efecto sobre la producción de citocinas por las células T $\gamma\delta$ (Referencia)

- 30 Se examinó el efecto de Actimid™ sobre IFN- γ , TNF- α e IL-4 en células T $\gamma\delta$ recién preparadas y líneas de células T $\gamma\delta$ estimuladas con IPP. Tal como se muestra en la FIG. 7A, Actimid™ aumentó la producción tanto de IFN- γ como de TNF- α en células TCR $\gamma\delta$ dentro de una población de PBMCs recién preparadas. Además, tal como se muestra en la FIG. 7B, Actimid™ aumentó la producción de IFN- γ , pero no de IL-4, en células T $\gamma\delta$ estimuladas con IPP. Los resultados demuestran que los compuestos inmunomoduladores estimulan la producción de IFN- γ y TNF- α , pero no de IL-4.

- 35 6.7.5 Efecto sobre la producción de IFN- γ en respuesta a proporciones variables tumor/células T $\gamma\delta$ (Referencia)

- 40 Se incubaron células tumorales pre-incubadas con (FIG. 8B) o sin (FIG. 8A) pamidronato con células T $\delta\gamma$ a diferentes proporciones de células tumorales (MM RPMI-8226) respecto de las células T $\gamma\delta$ como se indica en la FIG. 8. Algunas de las células se trataron adicionalmente con Actimid™. Se midió la producción de IFN-gamma intracelular mediante citometría de flujo.

Tal como se muestra en las FIGs. 8A y 8B, Actimid™ aumentó la producción de IFN- γ por las células T $\gamma\delta$. La producción de IFN- γ se incrementó con el incremento de la proporción de tumor respecto de células T $\gamma\delta$. Los resultados demuestran que los compuestos inmunomoduladores aumentan la producción de IFN- γ por las células T $\gamma\delta$, y el efecto se incrementa en respuesta al incremento de la proporción de tumor respecto de células T $\gamma\delta$.

- 45 6.7.6 Efecto sobre la citotoxicidad de las células T $\gamma\delta$ (Referencia)

- 50 Las células gamma delta se trataron con una única dosis de IPP 25 μM y semanalmente con 150 U/ml de IL-2 durante 22 días. Se incubaron células objetivo RPMI-8226 durante la noche con pamidronato 50 μM , y después se trataron con 3 MBq de ^{51}Cr . Las células objetivo y efectoras se incubaron en diversas proporciones con Actimid™ recién preparado y se ensayó la liberación de cromo después de 4 horas. También se añadió Actimid™ a algunos pocillos durante el pretratamiento de 22 días con IL-2 e IPP (FIG. 9A) o solamente durante el ensayo de liberación de cromo de 4 h (FIG. 9B).

Tal como se muestra en la FIG. 9, la adición de Actimid™ durante el pretratamiento o el ensayo de liberación de cromo aumentó la citotoxicidad de las células T $\gamma\delta$ hacia las líneas celulares de MM RPMI-8226, aunque se observó un mejor efecto con la adición de Actimid™ durante el pretratamiento. Los resultados sugieren que los

compuestos inmunomoduladores de la invención aumentan la citotoxicidad de las células T $\gamma\delta$ hacia las células tumorales, y el efecto se puede mejorar pretratando las células tumorales con los compuestos.

6.8 Efecto sobre las células NKT invariantes (Referencia)

5 Se ha ensayado el establecimiento de líneas de células NKT invariantes (iNKT) primarias sumamente purificadas de donantes sanos y de pacientes de mieloma múltiple (MM), y se exploró adicionalmente el efecto de IMiD 2 sobre las células iNKT. Las células iNKT derivadas de células mononucleares de sangre periférica o de médula ósea se enriquecieron con el mAb anti-TCRV α 24 o el mAb anti-6B11 y se expandieron adicionalmente mediante diversas rondas de estimulación con células dendríticas cargadas con α -GalCer. El análisis del fenotipo confirmó una pureza del 95% en las líneas de células iNKT expandidas. No se observó ninguna diferencia fenotípica significativa en las células iNKT entre los donantes sanos y los pacientes de MM.

La mayoría de las células iNKT expresaron CD161 y CD28, mientras la expresión de CD56 fue a un nivel muy bajo. Después de la estimulación con las células dendríticas cargadas con α -GalCer o anti-CD3, las células iNKT mostraron una actividad proliferativa intensa tal como se mide mediante un ensayo de incorporación de ^3H -TdR y la producción de IFN- γ medida mediante ELISA.

15 A continuación, se estudió el efecto de IMiD 2, que se sabe que aumenta la coestimulación de las células T y la actividad de las células NK, sobre las células iNKT. A partir de los ensayos, se observó que IMiD 2 aumenta la proliferación mediada por anti-CD3 de las células iNKT expandidas 1,4 veces, y que aumenta la expresión y la intensidad de fluorescencia de CD25 (MFI de 68,6 frente a 28,5) en las células iNKT tratadas con IMiD 2 en comparación con las células iNKT sin tratar. Además, en comparación con el grupo de control estimulado con células dendríticas cargadas con α -GalCer solamente, las CD cargadas con α -GalCer más IMiD 2 también aumentaron la producción de IL-2. Estos resultados proporcionan la fiabilidad preclínica y el fundamento para determinar clínicamente la eficacia de la transferencia adoptiva de las células iNKT en MM. Además, los resultados demuestran la capacidad de los IMiDs de aumentar la inmunorreactividad de las células iNKT, lo que sugiere su uso para potenciar la inmunoterapia mediada por células iNKT en el mieloma.

25 6.9 Uso con la vacuna de la hepatitis B (Referencia)

Se diseña un ensayo de dos centros, aleatorizado, con enmascaramiento doble, controlado con placebo. Se administra una única dosis de vacuna de hepatitis B a los sujetos. Se administra un IMiD o placebo a 64 pacientes durante 7 días antes y 7 días después de la vacuna. La recogida de las muestras de sangre para el análisis inmunitario se lleva a cabo antes del inicio de la administración del IMiD, en el momento de la vacunación, y 7, 14 y 28 días después de la vacunación. Se llevan a cabo evaluaciones de seguridad en el día 14, el último día de fármaco de estudio.

Los sujetos pueden optar por 2^a y 3^a dosis de vacuna para completar el ciclo habitual de vacunación contra la hepatitis B. El optar por recibir vacunaciones adicionales no es un requisito de este estudio. A los pacientes que optan por recibir la segunda (día 28) y 3^a (6 meses) vacunación se les pueden extraer las muestras de sangre antes de la 2^a y 3^a y 1 mes después de la 3^a vacunación. La extracción de sangre del día 28 sirve como la extracción de sangre antes de la 2^a dosis de vacuna. Las extracciones de sangre un mes después de la 2^a y 3^a dosis no son necesarias para los sujetos que desean recibir la 2^a y 3^a dosis de vacuna.

El efecto del IMiD sobre la respuesta a la vacuna de la hepatitis B en sujetos con discrasias de células plasmáticas, tal como se mide mediante el cambio en el título de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (HbSAg), se puede determinar siguiendo los procedimientos anteriores. Además, el suero y las células sanguíneas se pueden recoger para: a) determinar el desarrollo de respuestas de células T contra el HbSAg después de la vacunación; b) identificar cambios fenotípicos en las células sanguíneas periféricas después de la administración de IMiD, especialmente con respecto a las células T CD3, CD4, CD8, y las células NK y TNK; y c) determinar los cambios en el perfil de expresión génica de las células inmunitarias antes y después del tratamiento con el IMiD mediante el uso de protocolos con micromatrices.

6.10 Fenotipado de células T_{reg} y análisis funcionales de pacientes sometidos a tratamiento con lenalidomida (Referencia)

Se propone participar en este estudio a pacientes con cualquier neoplasia maligna que se seleccionan para el tratamiento con lenalidomida. El ciclo de dosificación para los pacientes seleccionados para el tratamiento con lenalidomida es de 3 semanas de dosificación con 25 mg de lenalidomida al día, seguido de 1 semana sin dosificación, seguido de tres semanas más de dosificación, en ciclos repetidos. Se extrajeron muestras de cuarenta ml de sangre en tubos heparinizados y 5 ml en tubos de suero en momentos puntuales desde 1 hora a 24 horas antes de la primera administración de lenalidomida (25 mg/dosis) y a los 21 días y 49 días después de la dosificación.

55 La sangre de los tubos de heparina se coloca en Histopaque y se centrifuga durante 25 minutos a 600 g para separar la capa leucocitaria. Se aisló la capa leucocitaria que contenía las células mononucleares de sangre periférica y las células hematológicas malignas. Las células aisladas se someten a los siguientes procedimientos:

6.10.1 Análisis del fenotipo mediante el uso de un aparato FACSCalibur

Se analizan los fenotipos dominantes de las PBMCs recién aisladas de cada paciente, y se mide el porcentaje de células en los pacientes que son de fenotipo de células T reguladoras (células positivas para CD4⁺CD25⁺, tinción positiva también para FOXP3 y CTLA-4).

5 6.10.2 Aislamiento de células CD4⁺CD25⁺ a partir de las PBMCs de los pacientes

Se aislaron células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ de las PBMCs de los pacientes mediante el uso de equipos de esferas magnéticas habituales (Invitrogen). Se estudia la capacidad *in vitro* de las células CD4⁺CD25⁺ de inhibir la proliferación de las células CD4⁺CD25⁻, tras la estimulación con anti-CD3.

6.10.3 Análisis del suero

10 Se analizaron los sueros para determinar las concentraciones de TGF-beta, IL-10, IL-4, IL-6, IFN-γ y TNF-α mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria, así como los conocidos en la técnica.

7. Items

La descripción describe además los ítems siguientes.

- 15 1. Un método para reducir o inhibir la actividad inmunosupresora de una célula T reguladora que comprende poner en contacto la célula T reguladora con un compuesto inmunomodulador durante un tiempo suficiente para la reducción o la inhibición de tal actividad supresora.
- 20 2. Un método para generar una respuesta inmunitaria aumentada a partir de un inmunógeno en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la introducción del inmunógeno en el sujeto.
- 25 3. El método del ítem 2, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 10 días a alrededor de 12 horas antes de la introducción de un inmunógeno.
4. El método del ítem 2, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 7 días a alrededor de 12 horas antes de la introducción de un inmunógeno.
5. El método del ítem 2, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 5 días a alrededor de 1 día antes de la introducción de un inmunógeno.
6. El método del ítem 2, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 3 días a alrededor de 1 día antes de la introducción de un inmunógeno.
7. El método del ítem 2, que comprende además una segunda administración de un compuesto inmunomodulador después de la introducción de un inmunógeno.
- 30 8. El método del ítem 7, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 12 horas a alrededor de 10 días después de la introducción de un inmunógeno.
9. El método del ítem 7, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 12 horas a alrededor de 7 días después de la introducción de un inmunógeno.
- 35 10. El método del ítem 7, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 1 día a alrededor de 5 días después de la introducción de un inmunógeno.
11. El método del ítem 7, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 1 día a alrededor de 3 días después de la introducción de un inmunógeno.
12. El método del ítem 2, en el que el inmunógeno se introduce en forma de una vacuna.
13. El método del ítem 12, en el que la vacuna es una vacuna contra el cáncer.
- 40 14. Un método para aumentar una respuesta inmunitaria a una vacuna contra el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la administración de la vacuna al sujeto.
15. El método del ítem 14, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 10 días a alrededor de 12 horas antes de la administración de la vacuna.
- 45 16. El método del ítem 14, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 7 días a alrededor de 12 horas antes de la administración de la vacuna.
17. El método del ítem 14, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 5 días a

alrededor de 1 día antes de la administración de la vacuna.

18. El método del ítem 14, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 3 días a alrededor de 1 día antes de la administración de la vacuna.

5 19. El método del ítem 14, que comprende además una segunda administración de un compuesto inmunomodulador después de la administración de la vacuna.

20. El método del ítem 19, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 12 horas a alrededor de 10 días después de la administración de la vacuna.

21. El método del ítem 19, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 12 horas a alrededor de 7 días después de la administración de la vacuna.

10 22. El método del ítem 19, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 1 día a alrededor de 5 días después de la administración de la vacuna.

23. El método del ítem 19, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 1 día a alrededor de 3 días después de la administración de la vacuna.

15 24. El método del ítem 14 ó 19, en el que la vacuna es una vacuna contra un sarcoma, carcinoma, melanoma, linfoma y leucemia.

25. El método del ítem 14 ó 19, en el que la vacuna es una vacuna de células dendríticas modificadas con antígenos, una vacuna de péptidos, una vacuna de células tumorales completas, o una vacuna de vectores virales.

20 26. Un método para aumentar una respuesta inmunitaria a una vacuna contra una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto inmunomodulador antes de la administración de la vacuna al sujeto.

27. El método del ítem 26, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 10 días a alrededor de 12 horas antes de la administración de la vacuna.

28. El método del ítem 26, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 7 días a alrededor de 12 horas antes de la administración de la vacuna.

25 29. El método del ítem 26, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 5 días a alrededor de 1 día antes de la administración de la vacuna.

30. El método del ítem 26, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 3 días a alrededor de 1 día antes de la administración de la vacuna.

30 31. El método del ítem 26, que comprende además una segunda administración de un compuesto inmunomodulador después de la administración de la vacuna.

32. El método del ítem 31, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 12 horas a alrededor de 10 días después de la administración de la vacuna.

33. El método del ítem 31, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 12 horas a alrededor de 7 días después de la administración de la vacuna.

35 34. El método del ítem 31, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 1 día a alrededor de 5 días después de la administración de la vacuna.

35. El método del ítem 31, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 1 día a alrededor de 3 días después de la administración de la vacuna.

40 36. El método del ítem 26 ó 31, en el que la enfermedad infecciosa es una enfermedad provocada por un virus, una bacteria, un hongo, y un parásito.

37. El método del ítem 36, en el que la enfermedad infecciosa es hepatitis B.

38. Un método para generar una respuesta alérgica reducida a partir de un alérgeno en un sujeto que comprende administrar al paciente un compuesto inmunomodulador antes de la exposición del sujeto a un alérgeno.

45 39. El método del ítem 38, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 10 días a alrededor de 12 horas antes de la exposición del sujeto a un alérgeno.

40. El método del ítem 38, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 7 días a alrededor de 12 horas antes de la exposición del sujeto a un alérgeno.

41. El método del ítem 38, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 5 días a alrededor de 1 día antes de la exposición del sujeto a un alérgeno.
42. El método del ítem 38, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 3 días a alrededor de 1 día antes de la exposición del sujeto a un alérgeno.
- 5 43. El método del ítem 38, que comprende además una segunda administración de un compuesto inmunomodulador después de la exposición del sujeto a un alérgeno.
44. El método del ítem 43, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 12 horas a alrededor de 10 días después de la exposición del sujeto a un alérgeno.
- 10 45. El método del ítem 43, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 12 horas a alrededor de 7 días después de la exposición del sujeto a un alérgeno.
46. El método del ítem 43, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 1 día a alrededor de 5 días después de la exposición del sujeto a un alérgeno.
47. El método del ítem 43, en el que el compuesto inmunomodulador se administra de alrededor de 1 día a alrededor de 3 días después de la exposición del sujeto a un alérgeno.
- 15 48. El método de cualquiera de los ítems 1, 2, 14, 26, y 38, en el que el compuesto inmunomodulador es 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona.
49. El método del ítem 48, en el que el compuesto inmunomodulador es enantioméricamente puro.
50. El método de cualquiera de los ítems 1, 2, 14, 26, y 38, en el que el compuesto inmunomodulador es 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona.
- 20 51. El método del ítem 50, en el que el compuesto inmunomodulador es enantioméricamente puro.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, que es 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona, para el uso en un método para reducir la resistencia adquirida a rituximab en un paciente de cáncer, en el que el compuesto se administra antes de la administración de rituximab.
- 5 2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra en combinación con IL-2.
3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto se administra durante cinco días antes de la administración de rituximab.

ES 2 485 316 T3

Lista de vacunas

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
A.D.T	Difteria, tétanos (adsorbidos)	Commonwealth (Australia)
A.K.D.S.	Difteria, tétanos, tos ferina	
AC Vax	Meningococcus (polisacárido)	GSK (R.U.)
Acel-Imune ^x	Difteria, tétanos, tos ferina (acelular)	WYE (EE.UU.)
ACTAcel	Difteria, tétanos, tos ferina, Hib	AVP (Argentina)
ActHIB	Haemophilus influenzae tipo b (PRP-T)	AVP (EE.UU.)
Aimmugen	Hepatitis A (inactivado)	Chemo-Sero-Therapeutic Resh Inst (Japón)
Aldiana	Difteria (absorbido)	Sevac (Checoslovaquia)
Alditeana	Difteria, tétanos (absorbidos)	Sevac (Checoslovaquia)
Alditerpera	Difteria, tétanos (adsorbidos), tos ferina	Sevac (Checoslovaquia)
Amaril	Fiebre amarilla	AVP (Francia)
AMC	<i>Haemophilus influenzae</i> , tipo b	
Anadifterall	Difteria (adsorbido)	CHIR (Italia)
Anatetall	Tétanos (adsorbido)	CHIR (Italia)
Arlvax	Fiebre amarilla	MEDI (R.U.)
Attenuvax ^x	Sarampión (vivo, atenuado adicionalmente)	MRK (EE.UU.)
AVAC-1, AVA	Carbunco	
AVAXIM	Hepatitis A	
B-CAPSA ^x	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (polisacárido, 1987 a 1989)	Mead Johnson (EE.UU.)
BayGam	Inmunoglobulina humana	Bayer Corporation (EE.UU.)
BayHepB	Inmunoglobulina (humana) de la hepatitis B	Bayer Corporation (EE.UU.)
BayRab	Inmunoglobulina de la rabia	Bayer Corporation (EE.UU.)
BayTet	Inmunoglobulina (humana) del tétanos	Bayer Corporation (EE.UU.)
BCG	Tuberculosis	Múltiples fabricantes y países
Begrivac	Gripe (virus fragmentado)	CHIR (Alemania)
Biavax II ^x	Rubéola, paperas (vivo)	MRK (EE.UU.)
Biavax ^x	Rubéola, paperas (vivo)	MRK (EE.UU.)
BIG	Inmunoglobulina del botulismo (no es una vacuna)	
Biken-HB	Hepatitis B (recombinante)	BIK (Japón)
Bimmugen	Hepatitis B (recombinante, adsorbida, derivada de levadura)	Chemo-Sero-Therapeutic Resh Inst (Japón)

FIG. 1

ES 2 485 316 T3

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
BioThrax	Carbunco (adsorbido)	BPT (EE.UU.)
Biviraten Berna	Sarampión, paperas (vivo)	BER (Suiza)
BVAC	Antitoxina botulínica	(para uso militar en EE.UU.)
C.D.T.	Difteria, tétanos (pediátrico, adsorbido)	Commonwealth (Australia)
Celluvax	Tos ferina (acelular)	CHIR (Italia)
Cendevax ^x	Rubéola (vivo) 3/70 a 1976	RIT/SmithKline & French (EE.UU.)
Certiva ^x	Difteria, tétanos, tos ferina (acelular)	Baxter Hyland (EE.UU.)
Cocquelucheau	Tos ferina (adsorbido)	AVP (Francia)
Comvax	Hepatitis B, <i>Haemophilus influenzae</i> de tipo b	MRK (EE.UU.)
Daptacel	Difteria, tétanos, tos ferina (acelular)	AVP (EE.UU.)
D.S.D.P.T.	Difteria, tétanos, tos ferina (adsorbido)	Dong Shin Pharm (Corea)
D.T. Bis Rudivax	Difteria, tétanos, rubéola	AVP (Francia)
Di Te Per Pol Impfstoff	Difteria, tétanos, tos ferina, polio	BER (Suiza)
Di-Te-Pol	Difteria, tétanos, polio	Statens Seruminstitut (Dinamarca)
Dif-Tet-All	Difteria, tétanos	CHIR (Italia)
DIFTAVAX	Difteria, tétanos, polio	
DiTe Anatoxal	Difteria, tétanos (adsorbidos)	BER (Suiza)
Ditoxim	Difteria, tétanos (adsorbidos)	Dong Shin Pharm (Corea)
Double Anigen B.I.	Difteria, tétanos	Bengal Immunity Co (India)
Dryvax	Viruela	WYE (EE.UU.)
DT	Difteria, tétanos (para uso pediátrico)	AVP (EE.UU.)
DT ^x	Difteria, tétanos (para uso pediátrico)	WYE (EE.UU.)
DT TAB	Difteria, tétanos, <i>Salmonella typhi</i> , <i>Paratyphi</i> A y B	AVP (Francia)
DTaP (genérico)	Difteria, tétanos, tos ferina (acelular)	AVP, WYE, GSK (EE.UU.)
DTwP (genérico) ^x	Difteria, tétanos, tos ferina (células completas)	AVP, WYE, GSK (EE.UU.)
Dual Antigen SII	Difteria, tétanos (adsorbidos)	Serum Institute of India (India)
Ecolarix ^x	Sarampión, rubéola (vivo)	RIT/SmithKline (EE.UU.)
eIPV	Polio (inactivado, potencia incrementada)	AVP (EE.UU.)
Engerix-B	Hepatitis B	GSK (R.U., EE.UU.)
Epaxal Berna	Hepatitis A - vacuna virosomal	BER (Suiza)
Ervevax RA 27/3	Rubéola (vivo)	GSK (Bélgica)
Flu Shield ^x	Gripe	WYE (EE.UU.)

FIG. 1 (Cont.)

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
Fluad, Agrippal-S I	Gripe	CHIR (Italia)
FluMist	Gripe (vivo, atenuado, intranasal)	MEDI (EE.UU.)
Fluogenx	Gripe	PD (EE.UU.)
Fluvirin	Gripe	EVN (EE.UU.)
Fluzone	Gripe	AVP (EE.UU.)
Funed-CEME	Difteria, tétanos, tos ferina	Belo Horizonte (Brasil)
GenHevac-B Pasteur	Hepatitis B	
Gunevax	Rubéola	CHIR (Italia)
Havrix	Hepatitis A	GSK (R.U., EE.UU.)
H-BIG	Inmunoglobulina de la hepatitis B	NABI, Bayer Corporation (EE.UU.)
HbOC	Abreviatura química de HibTITER	WYE (EE.UU.)
HBV	Hepatitis B (recombinante)	KGC (Japón)
Heprecomb	Hepatitis B (derivado de levadura)	BER (Suiza)
HeptavaxB ^x	Hepatitis B (derivado de plasma) 1982 a	MRK (EE.UU.)
Hevac B	Hepatitis B (derivado de plasma)	AVP (Francia)
Hexavac	Difteria, tétanos, tos ferina, polio, hepatitis B, Hib	AVP (Europa)
HibTITER	<i>Haemophilus influenzae</i> de tipo b (HbOC)	WYE (EE.UU.)
Hinkuys karokoe	Tos ferina (adsorbido)	Natl. Public Health Institute (Finlandia)
HPV-77; DK-5	Rubéola (vivo) 1969-1979	MRK (EE.UU.)
HPV-77; DK-12	Rubéola (vivo) 1970-1973	MRK (EE.UU.)
HRIG	Inmunoglobulina de la rabia	AVP; Bayer Corporation (EE.UU.)
Humotet-anti Tetanus	Tétanos	Wellcome (R.U.)
Hyper-Tet (denominada actualmente "BayTet")	Inmunoglobulina del tétanos	Bayer Corporation (EE.UU.)
IBV	Polio (inactivado)	Statens Seruminstitut (Dinamarca)
Inmunoglobulina Intramuscular (Humana)	Inmunoglobulinas de amplio espectro	MA, BPT, New York Blood Ctr, Bayer Corporation, CEN (EE.UU.)
Imogam Rabies -HT	Inmunoglobulina de la rabia	AVP (EE.UU.)
Imovax	Rabia	AVP (EE.UU.)
Imovax Parotiditis	Paperas	AVP (Francia)
Imovax Polio	Polio	AVP (Francia)
Imovax Sarampion	Sarampión	AVP (Francia)
Imovax D.T.	Difteria, tétanos	

FIG. 1 (Cont.)

ES 2 485 316 T3

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
Imovax Gripe	Gripe	
Imovax R.O.R.	Sarampión, rubéola, paperas (vivo)	AVP (Francia)
Imovax Rubeola	Sarampión	AVP (Internacional)
Imovax Mumps	Paperas	
Imovax Oreillons	Paperas	AVP (Francia)
Imovax Rabies I.D.	Vacuna de la rabia (HDCV)	AVP (EE.UU.)
Imovax Rabies I.M.	Vacuna de la rabia (HDCV)	AVP (EE.UU.)
Infanrix	Difteria, tétanos, tos ferina (acelular)	GSK (Bélgica, EE.UU.)
Ipad TP	Tétanos, polio	AVP (Francia)
IPOL	Polio (potencia incrementada, inactivado)	AVP (EE.UU.)
IPV	Polio (inactivado)	Término general para la vacuna de la polio inactivada
Istivac	Gripe	
JE-VAX	Encefalitis japonesa	AVP (EE.UU.)
Kaksoisrokote Dubbelvaccin	Difteria, tétanos (adsorbidos)	Natl. Instituto de Salud Pública (Finlandia)
Kikhoste-Vaksine	Tos ferina	Statens Institutt for Folkehelse (Noruega)
Lancy Vaxina ^x	Viruela	Swiss Serum and Vaccine Institute (Suiza)
Lavantuu tirokote	Fiebre tifoidea	Central Pub Health Lab (Finlandia)
Liovax ^x	Viruela	CHIR (Italia)
Lirubel ^x	Sarampión, rubéola (vivo) 4/74 a 6/78	Dow/PitneyMoore (EE.UU.)
Lirugen	Sarampión	AVP (Internacional)
Lirugen ^x	Sarampión (vivo) 2/65 a 6/78	Dow (EE.UU.)
LM -3 RIT	Sarampión, paperas, rubéola (vivo)	Dong Shin Pharm (Corea)
LM -2 RIT	Sarampión, paperas (vivo)	Dong Shin Pharm (Corea)
LTEANAS Imuna	Tétanos (adsorbido)	Imuna sp. (Eslovaquia)
LYMERix ^x	Enfermedad de Lyme	GSK (EE.UU.)
Lyovac Attenuvax ^x	Sarampión (vivo, atenuado)	MRK (EE.UU.)
Lyovac Meruvax ^x	Rubéola (vivo)	MRK (EE.UU.)
M-R Vax II ^x	Sarampión, rubéola (vivo)	MRK (EE.UU.)
M-Vax ^x	Sarampión (vivo) 5/63 a 1979	WYE (EE.UU.)
Masern-Impfstoff SSW	Sarampión (vivo)	
Measles Vaccine DK3 ^x	Sarampión (vivo) 1964 a 1972	Philips Roxane, Inc. (EE.UU.)

FIG. 1 (Cont.)

ES 2 485 316 T3

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
Measles ^x	Sarampión (inactivado) 1963 a 1966 Sarampión (vivo) 12/64 a 1974	Eli Lilly (EE.UU.)
Mencevax A	Meningococcus (polisacárido) (Grupo A)	SmithKline/RIT (Bélgica)
Meningitec	Meningococcus (conjugado) (Grupo C)	WYE (R.U., Australia)
Menomune-A/C/Y/W-135	Meningococcus (polisacárido) (Grupos A, C, Y, W435)	AVP (EE.UU.)
Menpovax 4	Meningococcus (polisacárido) (Grupos A y C)	CHIR (Italia)
Menpovax A+C	Meningococcus (Grupos A & C)	CHIR (Italia)
Meruvax ^x	Rubéola (vivo) 6/69 a	MRK (EE.UU.)
Meruvax II	Rubéola (vivo)	MRK (EE.UU.)
Mevilin-L ^x	Sarampión (vivo)	Glaxo Operations
MMR ^x	Sarampión, paperas, rubéola (viva) 6/71 a	(EE.UU.)
MMR (genérico) ^x	Sarampión, paperas, rubéola (vivo) 4/74 a 6/78	Dow Chemical (EE.UU.)
M-M-R II	Sarampión, paperas, rubéola (vivo)	MRK (EE.UU.)
Moniarix	Pneumococo (polisacárido)	SmithKline/RIT (Bélgica)
Mopavac Sevac	Sarampión, paperas, atenuado (vivo)	Institute of Sera and vaccines Checoslovaquia
MOPV ^x	Polio (vivo, de Sabin, tipos monovalentes I, II, III)	WYE (EE.UU.)
Morbilvax	Sarampión (vivo, atenuado)	CHIR (Italia)
Morubel	Sarampión, rubéola (vivo, atenuado)	CHIR (Italia)
Moruman Berna	Inmunoglobulina del sarampión	BER (Suiza)
Morupar	Sarampión, paperas, rubéola (vivo, atenuado)	CHIR (Italia)
Movivac	Sarampión (vivo, atenuado)	
M-R VAX ^x	Sarampión, rubéola (vivo) 7/71 a	MRK (EE.UU.)
Mumaten Berna	Paperas (vivo)	BER (Suiza)
Mumps (genérico) ^x	Paperas (vivo) 4/74 a 6/78	Dow Chemical (EE.UU.)
Mumps (genérico) ^x	Paperas (inactivado) 1950 a 1978	WYE (EE.UU.)
Mumps (genérico) ^x	Paperas (inactivado) 1950 a 1977	Eli Lilly (EE.UU.)
Mumpsvax ^x	Paperas (vivo)	MRK (EE.UU.)
Mutagrip	Gripe	
Nabi-HB	Inmunoglobulina de la hepatitis B	NABI (EE.UU.)
Nothav	Hepatitis A	CHI (Italy)
OmniHIB ^x	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (PRP-T)	GSK, AVP (EE.UU.)
OPV	Término general para la vacuna de la polio oral	

FIG. 1 (Cont.)

ES 2 485 316 T3

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
Orimune ^x	Vacuna de la polio (oral, trivalente)	WYE (EE.UU.)
Pariorix	Paperas (vivo)	SmithKline/RIT (Bélgica)
Pavivac-Sevac	Paperas (vivo)	Institute of Immunology (Croacia)
PCV, PCV7	Término general para conjugado de pneumococo (7-valente)	
Pediarix	Difteria, tétanos, (acelular) tos ferina, hepatitis B, IPV	GSK (EE.UU.)
PedvaxHIB	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (PRP-OMP)	MRK (EE.UU.)
Penta	Difteria, tétanos, (acelular) tos ferina, Hib, IPV	AVP (Canadá)
Pentacel	Difteria, tétanos, tos ferina, polio, Hib	AVP (Canadá)
Pentacoq	Difteria, tétanos, tos ferina, polio, Hib	
PENTAct-HIB	Difteria, tétanos, tos ferina, polio, Hib	
Pentavac	Difteria, tétanos, tos ferina, polio, Hib	
Pentavalente	Difteria, tétanos, tos ferina, hepatitis B, Hib	
Pfizer Vax-Measles K ^x	Sarampión (inactivado) 3/63 a 1970	Pfizer (EE.UU.)
Pfizer Vax-Measles L ^x	Sarampión (vivo) 2/65 a 1970	Pfizer (EE.UU.)
Pluserix	Sarampión, paperas, rubéola	
Pneumovax 23	Pneumococo (polisacárido)	MRK (EE.UU.)
PNU-IMUNE 23 ^x	Pneumococo (polisacárido)	WYE (EE.UU.)
POLIAce 1	Difteria, tétanos, tos ferina, polio, HIB	AVP (Argentina)
PPV, PPV23	Término general para polisacárido de pneumococo (23-valente)	
Prevnar	Pneumococo (7-valente, conjugado)	WYE (EE.UU.)
Priorix	Sarampión, paperas, rubéola (vivo)	GSK (R.U.)
ProHIBIT ^x	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (PRP-D)	AVP (EE.UU.)
PRP-OMP	Abreviatura química de PedvaxHIB	
PRP-T	Abreviatura química de ActHIB	
Purivax ^x	Polio (inactivado) 1956 a 1965	MRK (EE.UU.)
QUADRAcel	Difteria, tétanos, tos ferina, polio	AVP (Argentina)
QUADRAcel / Hibest	Difteria, tétanos, tos ferina, polio, Hib	AVP (Argentina)
Quadrigen ^x	DTP + polio (1959-1968)	PD (EE.UU.)
Quatro-Virelon	Difteria, tétanos, polio	CHI (Alemania)
Quintuple	Difteria, tétanos, tos ferina, Hib, polio	GSK (México)
R-HB Vaccine	Hepatitis B (recombinante)	Mitsubishi Chem Corp (Japón)

FIG. 1 (Cont.)

ES 2 485 316 T3

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
R-VAC	Rubéola (vivo)	Serum Institute (India)
RA27/3	Rubéola (vivo)	MRK (EE.UU.)
RabAvert	Rabia (PCEC)	CHI (EE.UU.)
Recombivax HB	Hepatitis B (recombinante)	MRK (EE.UU.)
Respigam, RSV-IVIG	Inmunoglobulina de virus sincitial respiratorio (no es una vacuna)	MEDI (EE.UU.)
RIG (genérico)	Inmunoglobulina de la rabia	Bayer Corporation, AVP (EE.UU.)
Rimevax	Sarampión (vivo)	SmithKline/RIT (Bélgica)
Rimparix	Sarampión (vivo)	SmithKline/RIT
RIT - LM-2	Sarampión, paperas (vivo)	Dong Shin Pharm (Corea)
MT - LM-3	Sarampión, paperas, rubéola (vivo)	Dong Shin Pharm (Corea)
RotaShield, RRV-TV ^x	Rotavirus 8/98 a 7/99	WYE (EE.UU.)
Rouvax	Sarampión (vivo, atenuado)	AVP (Francia)
Rubeaten Berna	Rubéola (vivo)	BER (Suiza)
Rubella (genérico) ^x	Rubéola (vivo) 12/69 a 1972	Philips Roxane (EE.UU.)
Rubellovac	Rubéola	CHIR (Alemania)
Rubelogen ^x	Rubéola (vivo) 12/69 a 1972	PD (EE.UU.)
Rubeovax ^x	Sarampión (vivo) 2/63 a 1971	MRK (EE.UU.)
Rudi-Rouvax	Sarampión, rubéola (vivo)	AVP (Francia)
Rudivax	Rubéola (vivo, atenuado)	AVP (Francia)
RVA (genérico)	Vacuna antirrábica, adsorbido	BP (EE.UU.)
Sabin	Término general para vacuna de la polio oral (vivo)	
Sahia	Polio (vivo, oral)	Múltiples fabricantes
Salk	Término general para la vacuna de la polio inyectable (inactivado)	
Sandovac	Gripe	
Serobacterin ^x	Tos ferina - 1945 a 1954	MRK (EE.UU.)
Sii Triple Antigen	Difteria, tétanos, tos ferina	Serum Institute (India)
Stamaril	Fiebre amarilla (vivo, atenuado)	AVP (Francia)
Synagis (palizivumab)	Inmunoglobulina de virus sincitial respiratorio (no es una vacuna)	MEDI (EE.UU.)
T. Polio	Toxoide tetánico, polio	AVP (Canadá)
T.A.B.	Fiebre tifoidea, paratifoidea (A y B)	- Institute Pasteur (Túnez) - Pharmaceutical Industries Corp. (Birmania)

FIG. 1 (Cont.)

ES 2 485 316 T3

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
T-Immun	Tétanos (adsorbido)	
Td (genérico)	Tétanos, difteria (formulación para adultos)	AVP, BP (EE.UU.)
Te/Vac/Ptap	Tétanos	
Te Anatoxal	Tétanos	BER (Europa)
Telvacptap	Tétanos	
Tetagrip	Tétanos, gripe	AVP (Francia)
Tetamun SSW	Tétanos no adsorbido (líquido)	Veb Sachsisches Serumwerk (Alemania)
Tetamyn	Tétanos	Bioclon, S.A. De C.V. (México)
Tetanol	Tétanos (adsorbido)	CHIR (Alemania)
Tetasorbat SSW	Tétanos (adsorbido)	Veb Sachsisches Serumwerk (Alemania)
Tetavax	Tétanos (adsorbido)	AVP (Francia)
Tetracoq 05	Difteria, tétanos, tos ferina, polio	AVP (Francia)
TetrAct-HIB	Difteria, tétanos, tos ferina, Hib	
Tetramune ^x	Difteria, tétanos, tos ferina, Hib	WYE (EE.UU.)
Tetravax ^x	Difteria, tétanos, tos ferina, polio - 1959 a 1965	MRK (EE.UU.)
Tice BCG	Vacuna contra el bacilo de Calmette-Gudrin (para TB)	OTC (EE.UU.)
TIG	Inmunoglobulina (genérica) del tétanos	Bayer Corporation (EE.UU.)
TOPV	Vacuna de la polio oral trivalente	Múltiples fabricantes y países
Titifica	Fiebre tifoidea y paratifoidea	
Tresivac Lyophilized	Sarampión, paperas, rubéola	Serum Institute (India)
Triacel	Difteria, tétanos, tos ferina (acelular)	
Triacelluvax	Difteria, tétanos, tos ferina (acelular)	CHIR (Europa)
TriHIBit	Difteria, tétanos, (acelular) tos ferina, Hib	AVP (EE.UU.)
Tri-Immunol ^x	Difteria, tétanos, tos ferina	WYE (EE.UU.)
Trimovax	Sarampión, paperas, rubéola (vivo)	AVP (Francia)
Trinivac ^x	Difteria, tétanos, tos ferina - 1952 a 1964	MRK (EE.UU.)
Tripacel	Difteria, tétanos, tos ferina (acelular)	
Tripedia	Difteria, tétanos, tos ferina (acelular)	AVP (EE.UU.)
Triple antigen	Difteria, tétanos, tos ferina	- Chowgule & Co. (India) - CSL Limited (Australia)
Triple Sabin	Polio (vivo, oral)	
Triple	Difteria, tétanos, tos ferina	

FIG. 1 (Cont.)

ES 2 485 316 T3

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
Triple Viral	Sarampión, paperas, rubéola	
Trivacuna Leti	Difteria, tétanos (adsorbidos), tos ferina	Laboratory Leti (España)
Trivax	Difteria, tétanos (simple), tos ferina	Wellcome (R.U.)
Trivax-ad	Difteria, tétanos (adsorbidos), tos ferina	
Trivax-Hib	Difteria, tétanos, tos ferina, Hib	GSK (R.U.)
Trivb	Difteria, tétanos, tos ferina	
Triviraten	Sarampión, paperas, rubéola (vivo, atenuado)	BER (Suiza)
Trivivac ^x	Difteria, tétanos, tos ferina	MRK (EE.UU.)
Trivivac Sevac	Sarampión, paperas, rubéola (vivo, atenuado)	Institute of Sera & Vaccines (Checoslovaquia)
TT	Toxoide tetánico (genérico)	AVP (EE.UU.)
TT vaccine	Toxoide tetánico (adsorbido)	
Tussitrupin Forte	Tos ferina	Staatliches Institut (Alemania)
Twinrix	Hepatitis A y B (formulación para adultos)	GSK (R.U., EE.UU.)
Twinrix Junior	Hepatitis A y B (formulación pediátrica)	GSK (EE.UU.)
Ty2la (Vivotif Berna)	Fiebre tifoidea (vivo, oral, liofilizado)	BER (Suiza)
Tyne	Tuberculosis (BCG)	Suecia
Typherix	Fiebre tifoidea	GSK (R.U.)
Typhim Vi (ViCPs)	Fiebre tifoidea (parenteral, inyectable)	AVP (EE.UU., Francia)
Typhoid Vaccine ^x	Fiebre tifoidea (inactivada, parenteral)	WYE (EE.UU.)
Typhopara-typhoidique	Fiebre tifoidea y paratifoidea	
VA-Mengoc-BC	Meningococo (Grupos B y C)	Finlay Vacunas y Sueros Centro de Investigación (Cuba)
Vaccin Difteric Adsorbit	Toxoide diftérico (adsorbido)	Cantacuzino Institute (Rumanía)
Vaccin Combinat Diftero-Tetanic	Difteria, tétanos (adsorbidos)	Cantacuzino Institute (Rumanía)
Vaccinum Morbillorum Vivum	Sarampión (vivo)	Moscow Research Institute (Rusia)
Vacina Triplíce Viral	Sarampión, paperas, rubéola	
Vacina Triplíce	Difteria, tétanos, tos ferina	Instituto Butantan (Brasil)
Vacina Dupla	Difteria, tétanos	Instituto Butantan (Brasil)
Vaksin Cacar	Viruela	
Vaksin Serap	Difteria, tétanos, tos ferina	Perum Bio Farma (Indonesia)
Vaksin Campak Kerig	Sarampión (vivo, atenuado)	Pasteur Institute (Indonesia)
Vaksin Kotipa	Cólera, fiebre tifoidea y paratifoidea A, B y C	Perum Bio Farma (Indonesia)

FIG. 1 (Cont.)

ES 2 485 316 T3

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
Vamoavax	Sarampión, paperas (vivo)	Institute of Immunology (Croacia)
Vaqta	Hepatitis A (inactivado)	MRK (EE.UU.)
Varicellon	Inmunoglobulina de varicela zóster	Behringwerke Aktiengesellschaft (Alemania)
Varie	Viruela (liofilizado)	Institute of Sera and Vaccine (Checoslovaquia)
Varilrix	Varicela (viva, cepa Oka)	GSK (Australia, Bélgica)
Varivax	Varicela (viva)	MRK (EE.UU.)
Vaxem-Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	CHIR (Italia)
Vaxicoq	Tos ferina (adsorbido)	AVP (Francia)
Vaxigrip	Gripe	
Vaxipar	Paperas (vivo)	CHIR (Italia)
VCDT	Difteria, tétanos	Cantacuzino Institute (Rumanía)
VDA Vaccin Difteric Adsorbit	Difteria	Cantacuzino Institute (Rumanía)
ViCPs (Typhim Vi)	Fiebre tifoidea (inactivado, inyectable)	AVP (EE.UU.)
VIG	Inmunoglobulina de la viruela (no es una vacuna)	Distribuido por CDC
Virelon T 20	Polio (vivo, oral, trivalente)	Behringwerke Aktiengesellschaft (Alemania)
Virovac Massling, Perotid, Rubella	Sarampión, paperas, rubéola	
Vivotif Berna (Ty21a)	Fiebre tifoidea (oral, vivo)	BER (Suiza)
VT (Vacina Triplíce)	Difteria, tétanos, tos ferina	Instituto Butantan (Brasil)
VTV (Vacina Triplíce Viral)	Sarampión, paperas, rubéola	
WR	Sarampión (vivo, atenuado)	Cantacuzino Institute (Rumanía)
VZIG	Inmunoglobulina de la varicela zóster (genérica)	MA (EE.UU.)
Welltrivax trivalente	Difteria, tétanos, tos ferina	
YF-VAX	Fiebre amarilla	AVP (EE.UU.)
Zaantide	Anti-toxina de la difteria	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zaantite	Anti-toxina del tétanos	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zaditeadvax	Difteria, tétanos	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zaditevax	Difteria, tétanos	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zamevax A+C	Meningococcus (polisacárido, Grupos A y C)	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zamovax	Sarampión (vivo)	Inst. de Inmunología (Croacia)

FIG. 1 (Cont.)

Producto o nombre comercial	Antígeno(s)	Fabricante (país)
Zamruvax	Sarampión, rubéola (vivo)	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zaruvax	Rubéola (vivo)	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zatetravax	Difteria, tétanos, tos ferina, paratosferina	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zatevax	Tétanos	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zatribavax	Difteria, tétanos, tos ferina	Inst. de Inmunología (Croacia)
Zatrivax	Sarampión, rubéola, paperas (vivo)	Inst. de Inmunología (Croacia)

FIG. 1 (Cont.)

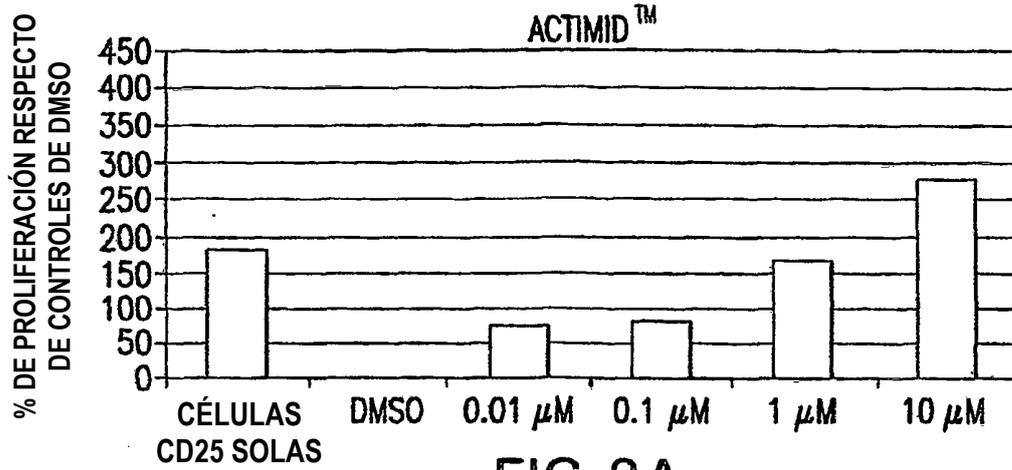


FIG.2A

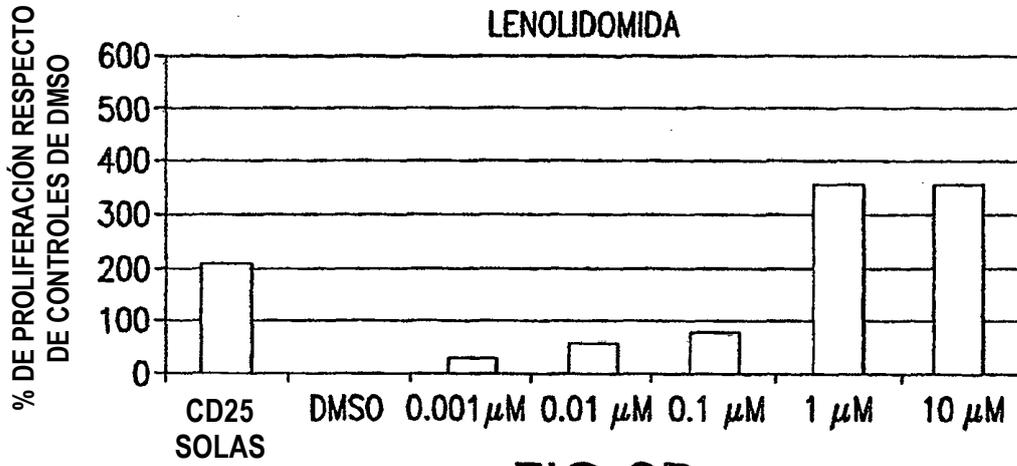


FIG.2B

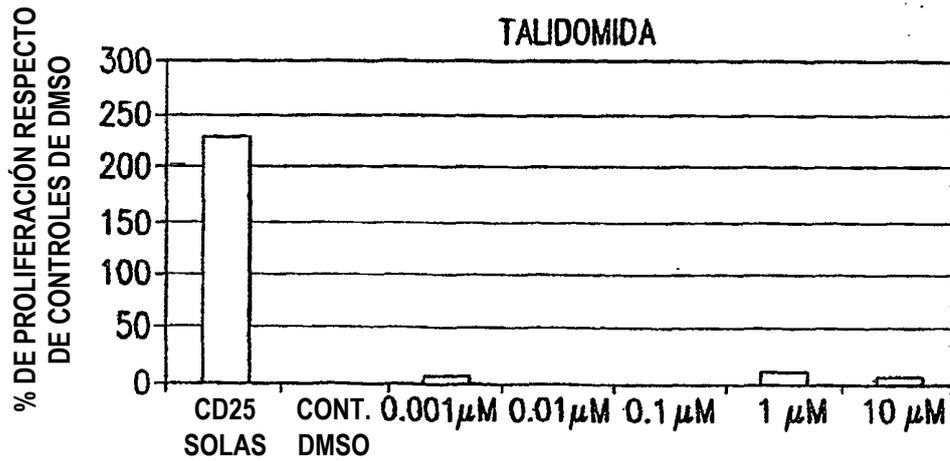


FIG.2C

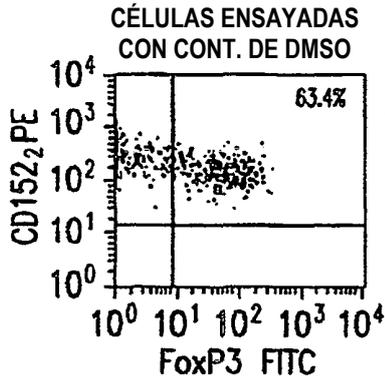


FIG. 3A

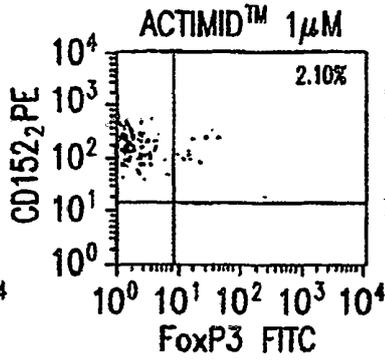


FIG. 3B

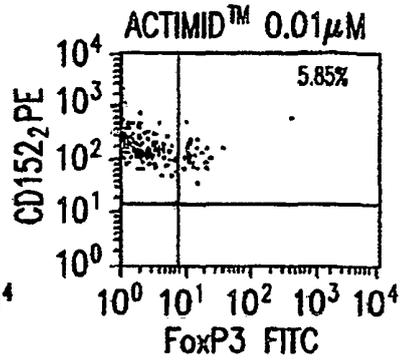


FIG. 3C

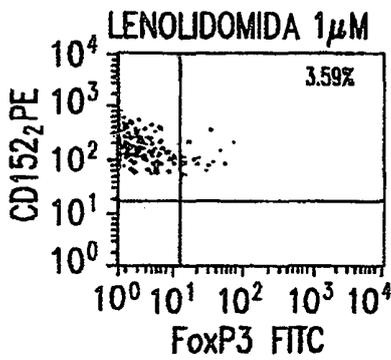


FIG. 3D

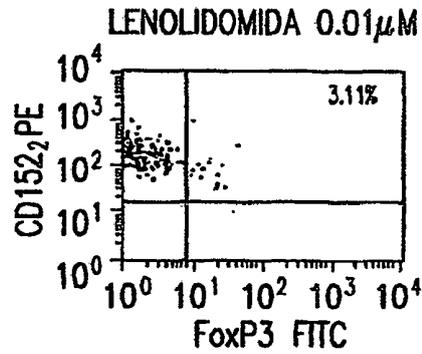


FIG. 3E

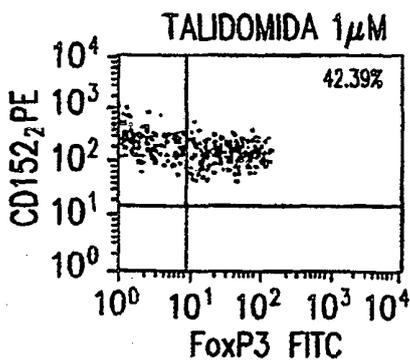


FIG. 3F

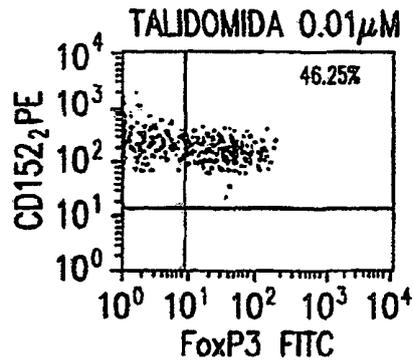


FIG. 3G

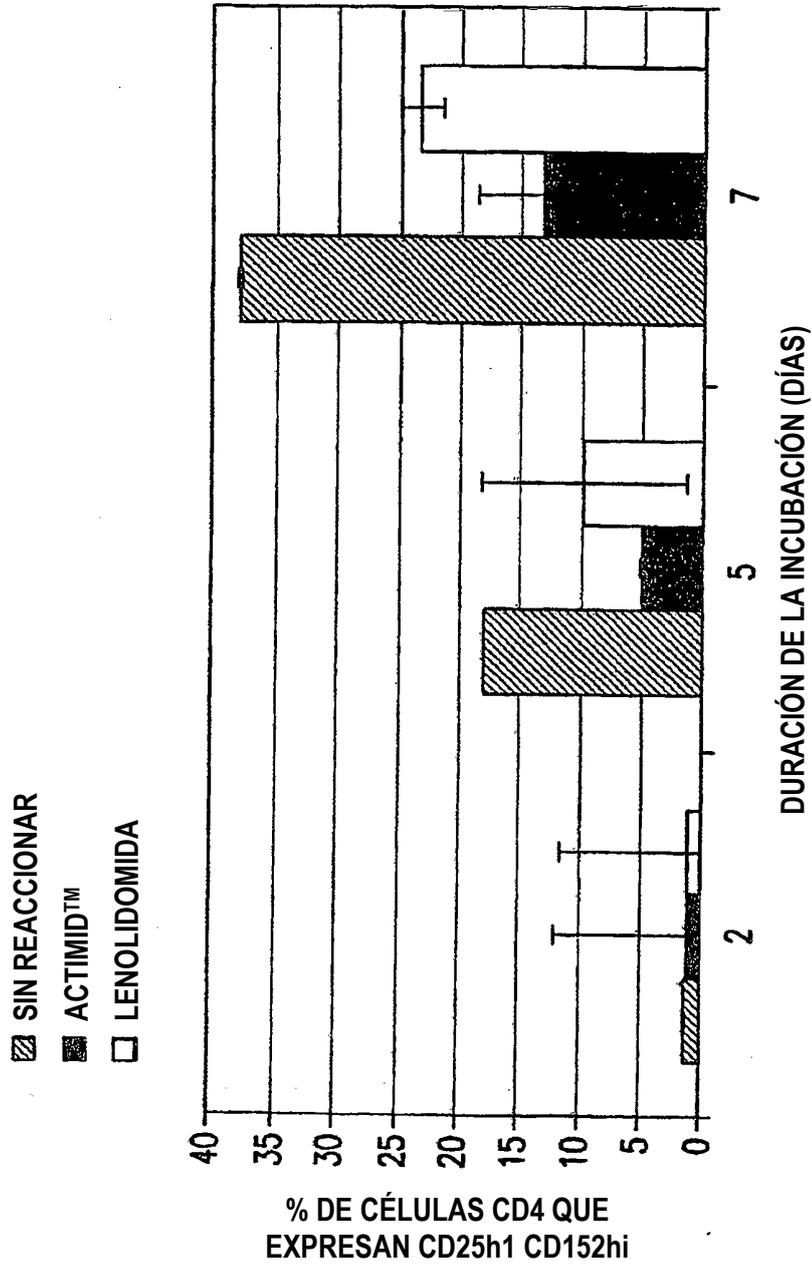


FIG.4

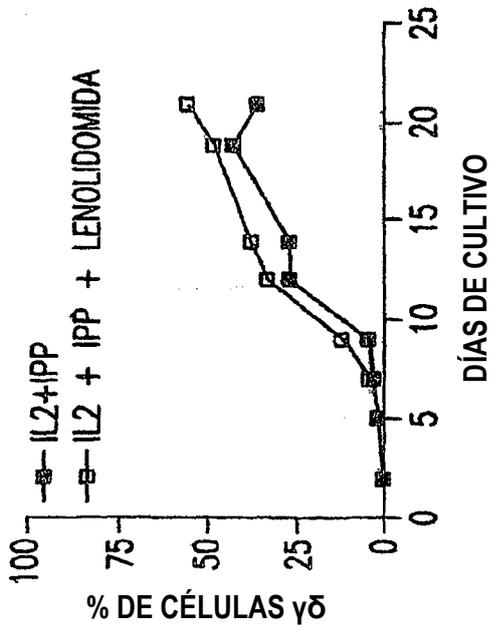


FIG. 5A

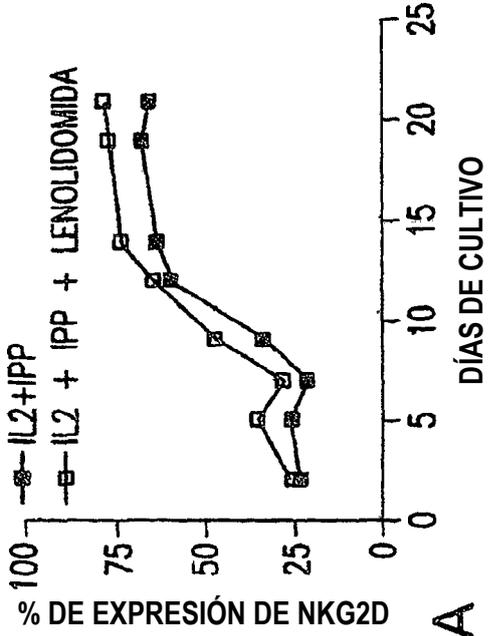


FIG. 5C

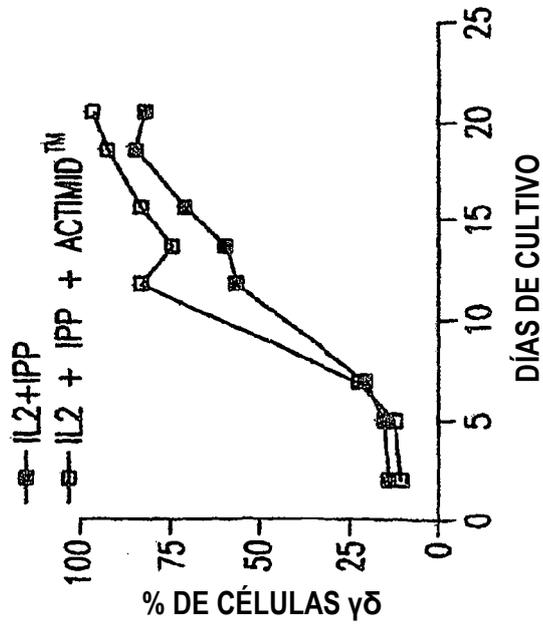


FIG. 5B

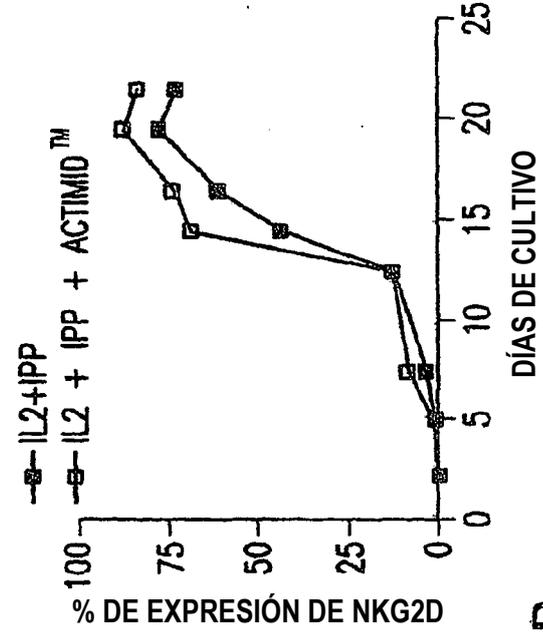


FIG. 5D

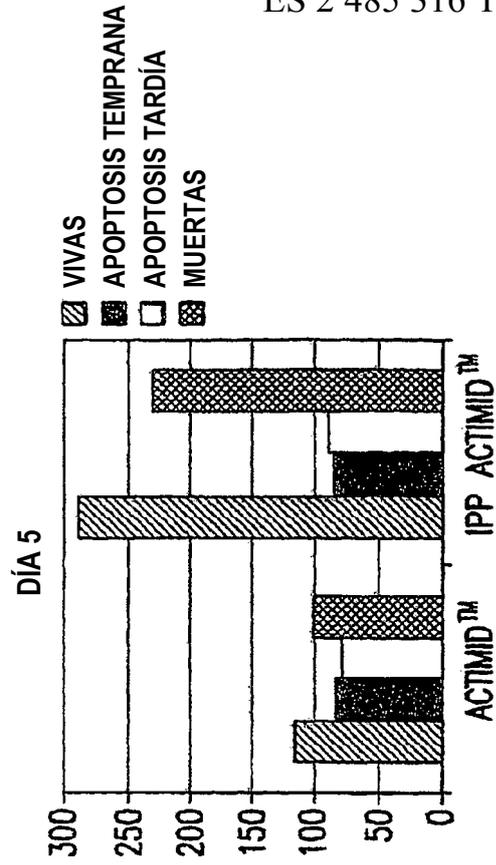


FIG.6B

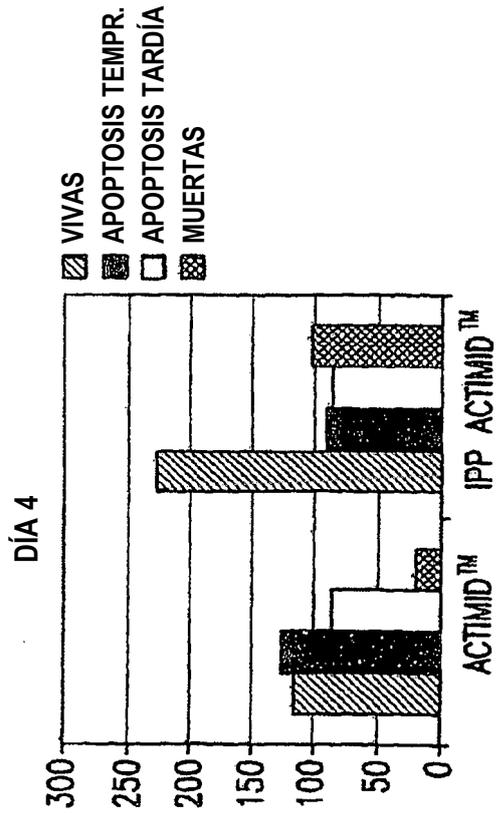


FIG.6A

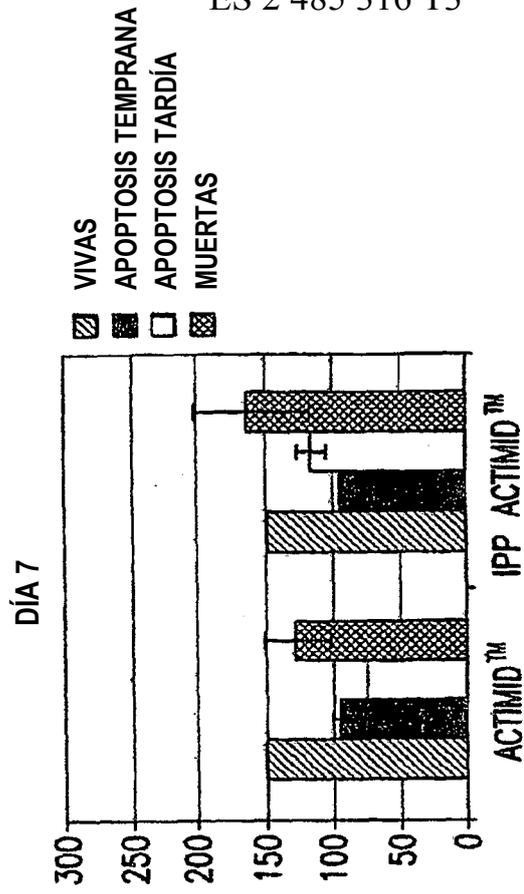


FIG.6D

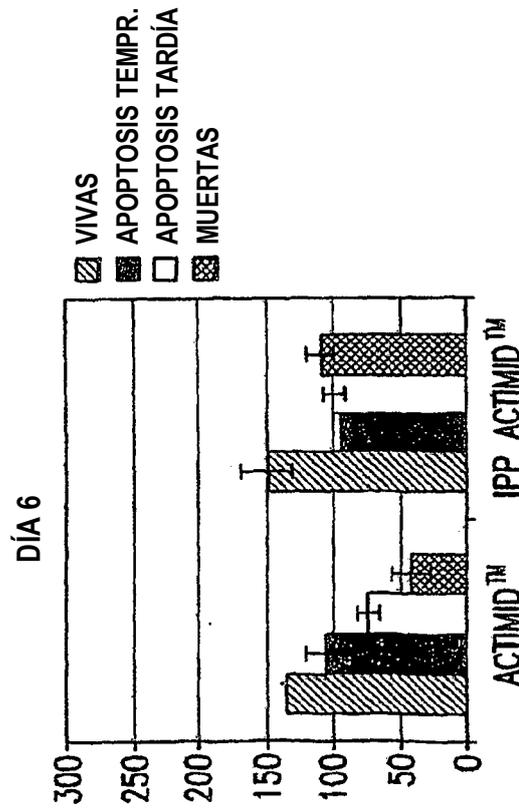


FIG.6C

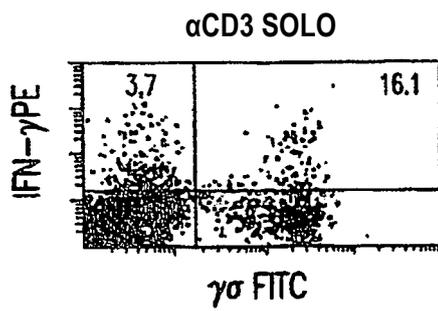


FIG. 7A

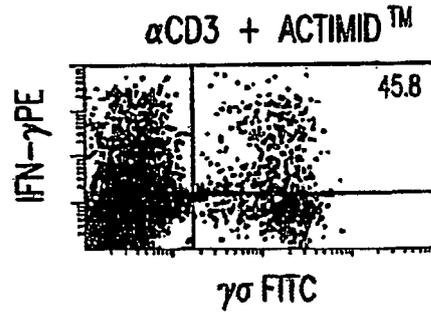


FIG. 7B

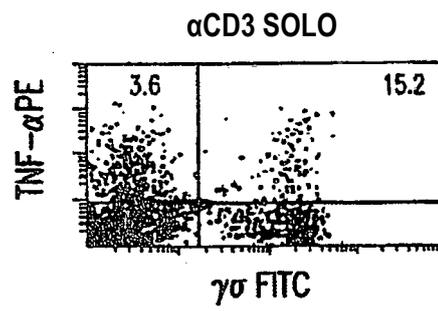


FIG. 7C

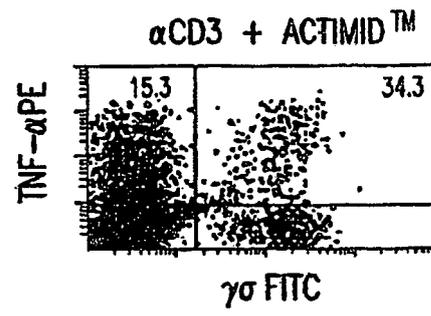


FIG. 7D

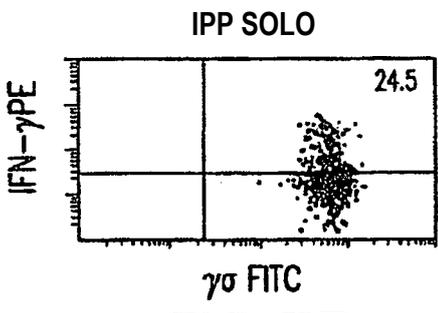


FIG. 7E

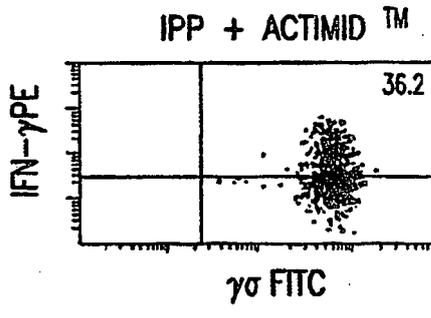


FIG. 7F

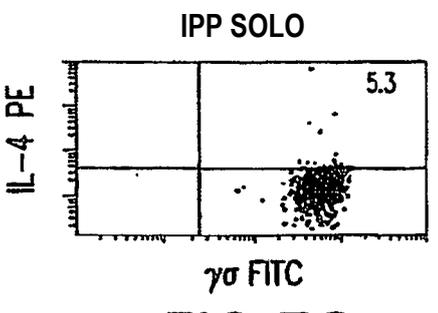


FIG. 7G

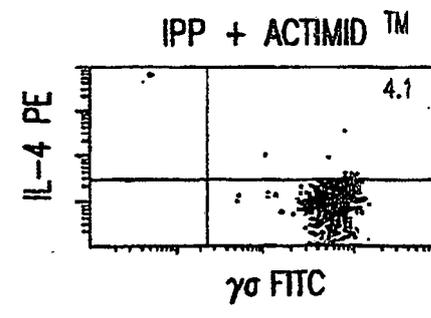
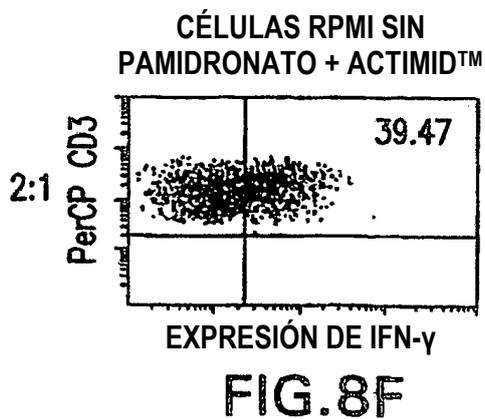
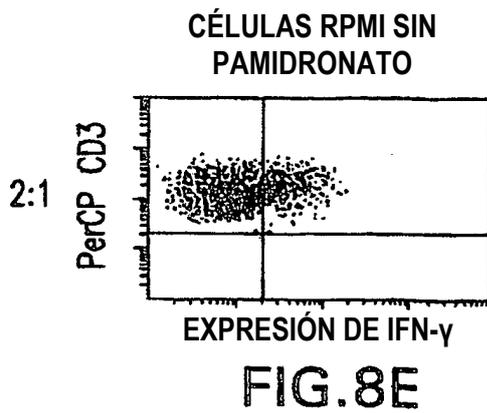
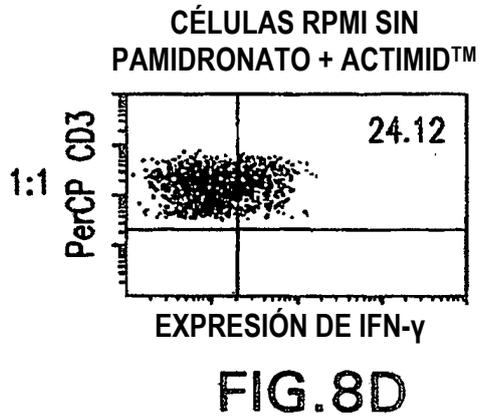
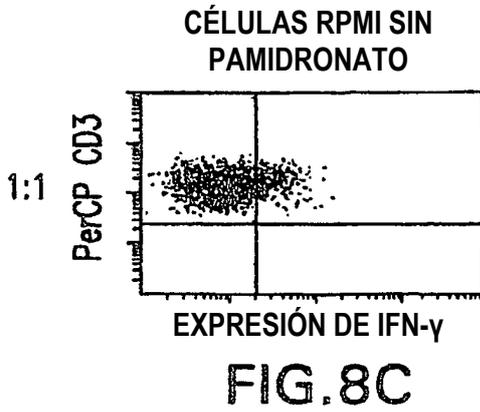
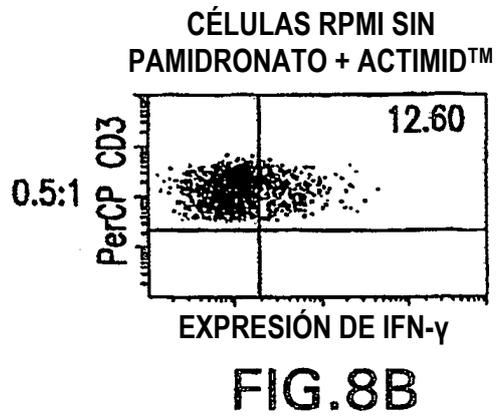
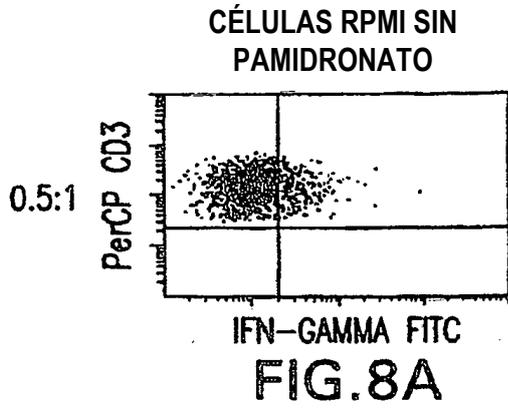
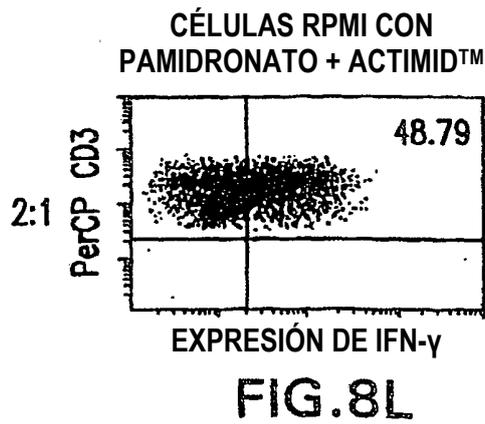
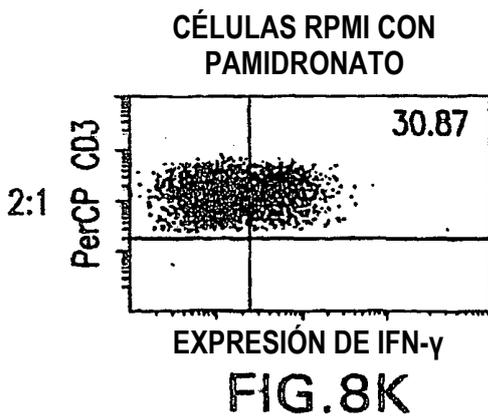
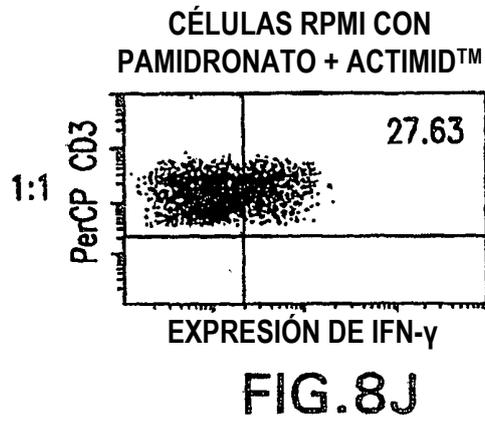
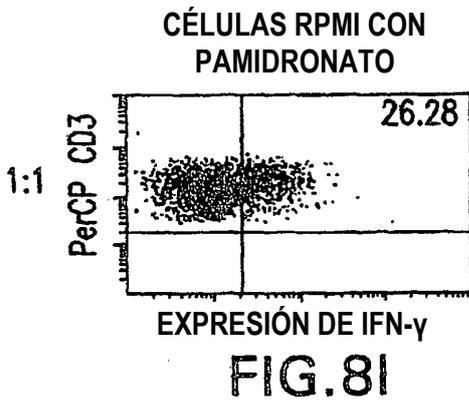
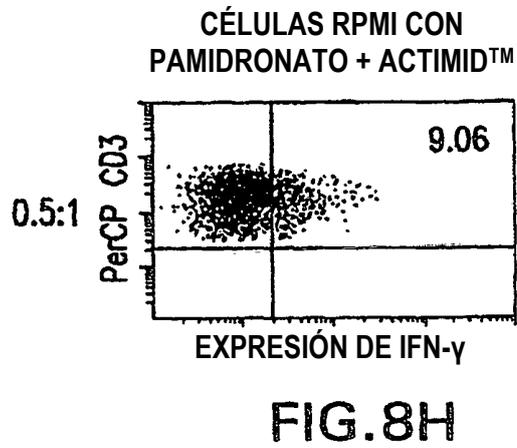
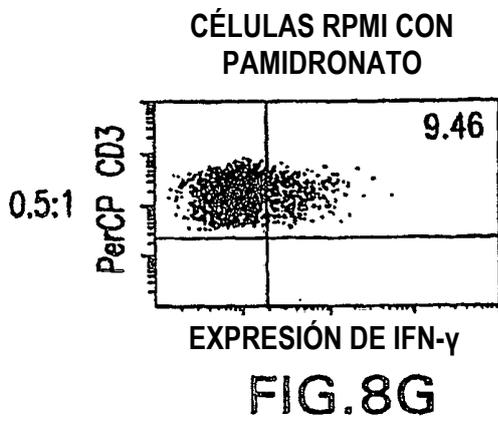


FIG. 7H





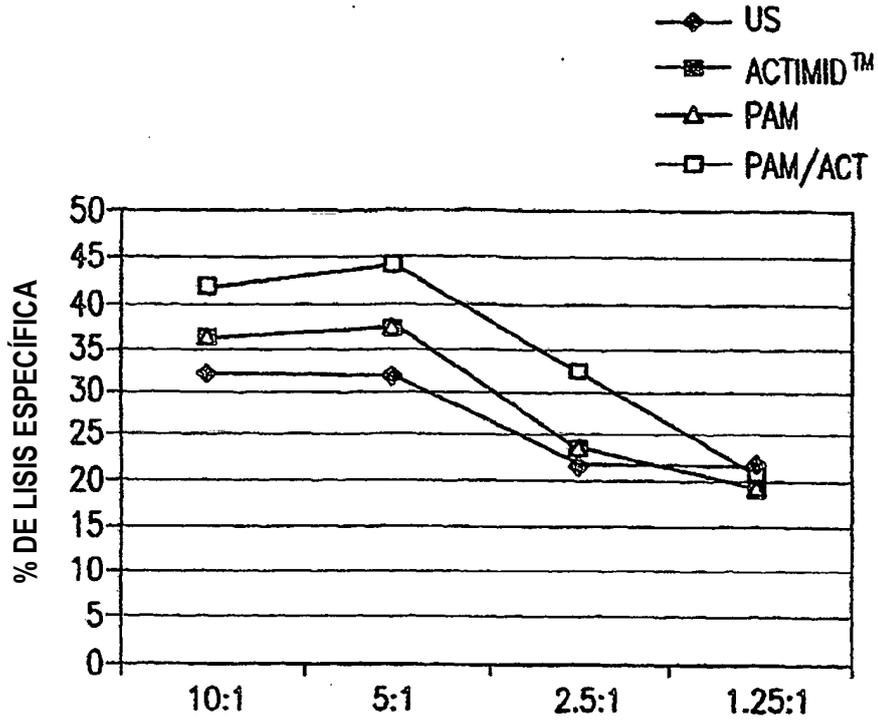


FIG. 9A

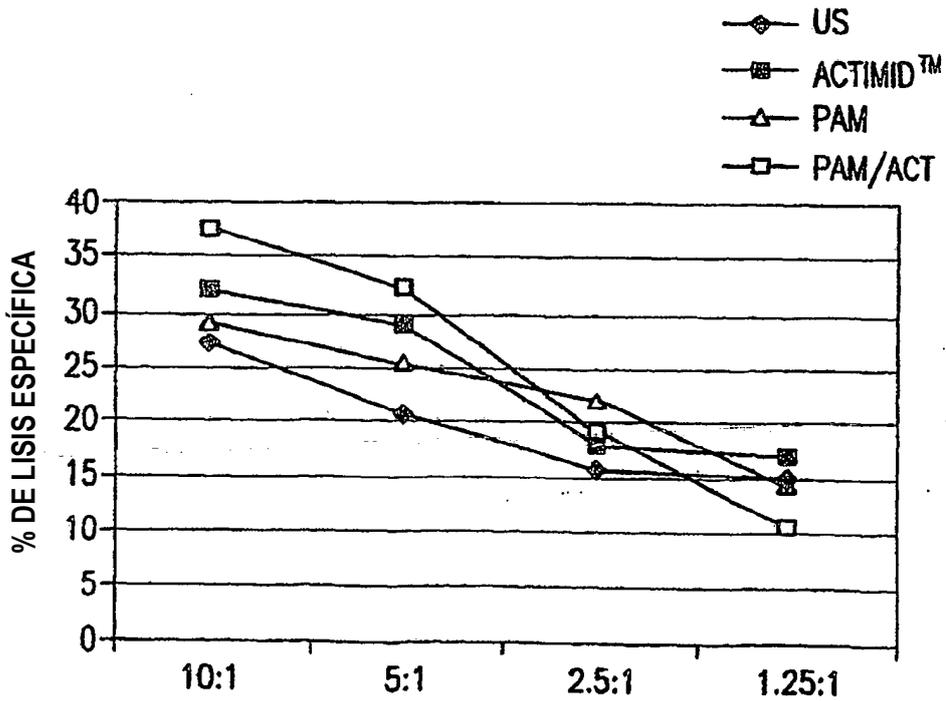


FIG. 9B