

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 306**

51 Int. Cl.:

**C07H 15/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2005 E 05785550 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 1776375**

54 Título: **Determinados compuestos de fosfato de aminoalquil-glucosaminida y sus usos**

30 Prioridad:

**08.07.2004 US 888683**

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

**17.07.2015**

73 Titular/es:

**CORIXA CORPORATION (100.0%)  
1900 9TH AVENUE SUITE 1100  
SEATTLE, WA 98101, US**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, DAVID A. y  
PERSING, DAVID H.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 541 306 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

Determinados compuestos de fosfato de aminoalquil-glucosaminida y sus usos.

## 5 Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud es una continuación en parte de la solicitud 10/752,660, presentada el 6 de enero de 2004, que reivindica la prioridad de la solicitud provisional Estadounidense 60/438,585, presentada el 6 de enero de 2003.

## 10 Antecedentes de la Invención

Los receptores de tipo Toll (TLR's) se han vinculado con la potente respuesta inmune innata, y reconocen distintos componentes estructurales que son únicos para los patógenos; esta interacción conduce al sistema inmune a un estado activado con consecuencias a corto y largo plazo. Existe un interés significativo en desarrollar agonistas y antagonistas de los TLR, ya que la manipulación farmacológica de las respuestas inmunes innatas puede llevar a vacunas más eficaces y métodos terapéuticos novedosos para enfermedades autoinmunes, atópicas, malignas e infecciosas. El primer producto microbiano descubierto que es un agonista del receptor similar a Toll fue el LPS, un componente de membrana bacteriana, específico a bacterias gram negativas, que activa el receptor similar a Toll 4 (TLR-4). Aunque el LPS es un potente agente inmunomodulador, su uso medicinal se limita debido a su extrema toxicidad, que incluye la inducción del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. La unidad subestructural endotóxica biológicamente activa del LPS es el lípido A, un disacárido de glucosamina fosforilado, multiacilado con ácido graso, que sirve para anclar la estructura completa a la membrana externa de las bacterias gram negativas. Los efectos tóxicos del lípido A se pueden atenuar mediante modificación química selectiva del lípido A para producir compuestos de monofosforil-lípido A (inmunoestimulador MPL™, Corixa Corporation; Seattle, WA). Se han descrito métodos para elaborar y utilizar el inmunoestimulador MPL™ y compuestos estructuralmente similares, en adyuvantes de vacuna y en otras aplicaciones (véase por ejemplo Patentes Estadounidenses Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094; 4,987,237; Johnson et al., *J Med Chem* 42:4640-4649 (1999); Ulrich y Myers, en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*; Powell and Newman, eds.; Plenum: Nueva York, 495-524, 1995). En particular, estas y otras referencias demuestran que el inmunoestimulador MPL™ y compuestos relacionados tienen actividades de adyuvante significativas cuando se utilizan en formulaciones de vacuna con antígenos de proteína y carbohidrato, para potenciar la inmunidad humoral y/o celular a los antígenos, y e interactuar con los receptores similares a Toll. El documento WO 01/34617 describe compuestos de fosfato de aminoalquil glucosaminida y su uso como adyuvantes e inmunoefectores.

Con base en las experiencias con el inmunoestimulador MPL™ y otros componentes de pared celular bacteriana, se desarrolló una familia de compuestos sintéticos novedosos, los fosfatos de aminoalquilglucosaminida (AGPs). Los compuestos de AGP también interactúan con TLR-4 como agonistas y antagonistas. Los AGP incluyen compuestos tanto acíclicos como cíclicos (Patentes Estadounidenses Nos. 6,113,918, y 6,303,347, WO 98/50399, publicada el 12 de octubre de 1998, WO 01/34617, publicada el 17 de mayo de 2001, WO 01/90129, publicada el 29 de noviembre de 2001, y WO 02/12258, publicada el 14 de febrero de 2002). Como el inmunoestimulador MPL™, estos compuestos han demostrado que retienen características de adyuvante significativas cuando se formulan con antígenos en composiciones de vacuna, y además tienen perfiles de toxicidad similares o mejores en comparación con el inmunoestimulador MPL™. Los AGP también demostraron actividad adyuvante por vía mucosa y son eficaces en ausencia de antígeno, haciéndolos atractivos para uso profiláctico y/o terapéutico.

Otra ventaja significativa ofrecida por los AGP sobre el inmunoestimulador MPL™ y similares es que los AGP se pueden producir fácilmente a escala comercial por medios sintéticos. Puesto que se producen sintéticamente, los AGP carecen de rastros de contaminantes biológicos encontrados en el MPL. Como tal, los AGP tendrían una ventaja sobre el MPL como adyuvantes de vacunas en determinadas situaciones, tales como en los protocolos de inmunización pediátrica en donde se debe minimizar la pirogenicidad del adyuvante. Sin embargo, debido a que los AGP se sintetizan químicamente, menos estabilidad de compuesto óptima puede llevar a acumulación de productos de degradación que pueden resultar en actividad y estabilidad biológica variable de lote a lote. Desde el punto de vista del desarrollo de procesos GMP para fabricación de materiales para pruebas clínicas humanas, la estabilidad de lote y la variabilidad de lote a lote son problemas mayores. Por lo tanto, son deseables compuestos que tengan mayor actividad biológica en comparación con el inmunoestimulador MPL™ y similares, que interactúen con los receptores de tipo Toll y/o sean óptimos para su síntesis GPL a gran escala. La presente invención aborda estas necesidades y otras al proporcionar compuestos modificados para mejorar la actividad biológica, estabilidad al aumentar la resistencia a la degradación enzimática y química, y/o mejorar los perfiles de seguridad.

## Resumen de la invención

60 En un aspecto, esta invención comprende determinados compuestos novedosos de fosfato de aminoalquil-glucosaminida, como se definen aquí, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. La invención comprende adicionalmente

composiciones que contienen compuestos y/o sus sales, y usos de los compuestos como adyuvantes y como compuestos farmacéuticamente efectivos por sí mismo.

Descripción detallada de la invención

5

Los compuestos de la presente invención son miembros de la familia de 4-fosfato de aminoalquil-glucosaminida (AGP). Como se describe, adelante, los compuestos de la invención poseen diversas modificaciones en las longitudes de las seis cadenas de acilo, (primarias y secundarias), modificaciones estructurales del brazo de alquilo para incluir una unidad estructural de fosfato, modificación estructural para incluir un éter-lípido primario en la posición C3 del azúcar así como también tres lípidos de éter secundarios, y/o un grupo bloqueador de 6-hidroxilo.

10

15

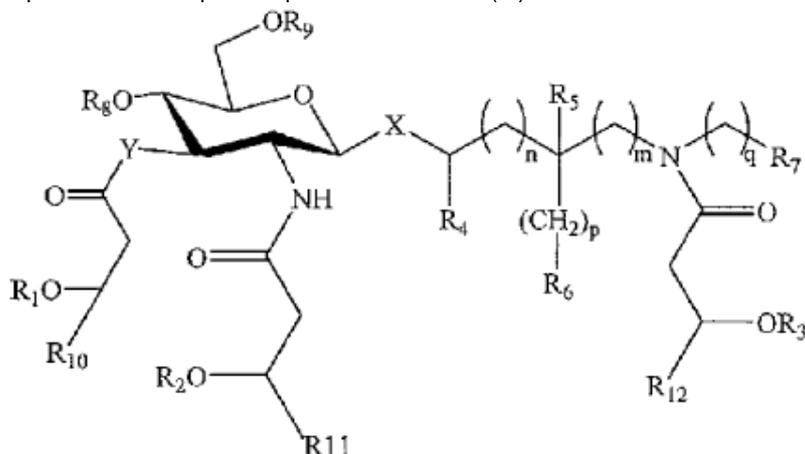
Conocidos químicamente como  $\omega$ -aminoalquil-2-amino-2-desoxi- 4-fosfono- $\beta$ -D-glucopiranosidos, los AGP son una clase de miméticos sintéticos del lípido A que están relacionados estructuralmente con el componente biológicamente activo principal del componente del monofosforil-lípido A. En los AGP, el azúcar reductor se ha reemplazado con una unidad de aglicón N[(R)-3-n-alcanoiloxitetradecanoil]aminoalquilo. Como otros derivados disacáridos del lípido A, los AGP comprenden seis ácidos grasos para máxima actividad biológica, pero a diferencia de los derivados disacáridos, los AGP contienen una unidad de aglicón  $\beta$ -enlazada conformacionalmente flexible, que permite el empaquetamiento compacto energéticamente favorecido de las seis cadenas de acilo graso. Se considera que el empaquetamiento compacto de seis ácidos grasos en una matriz hexagonal desempeña una función esencial en la bioactividad de las moléculas similares al lípido A (Seydel et al., *Immunobiol*; 187(3-5): 191-211, 1993).

20

Los compuestos de la presente invención se consideran miembros de la familia AGP. Estos compuestos incluyen modificaciones a las longitudes de las seis cadenas de acilo (primarias y secundarias).

25

La presente invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula (III):



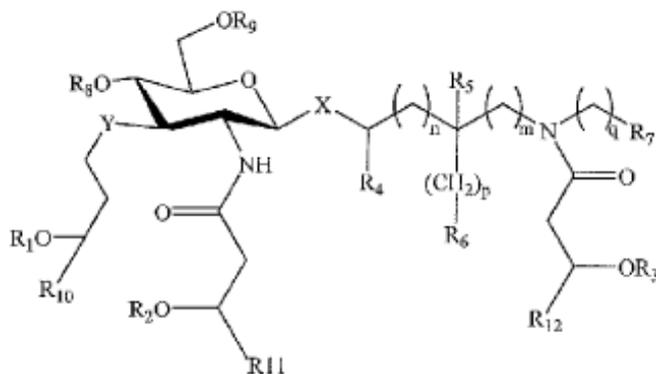
(III)

30

en donde X se selecciona del grupo que consiste en O y S, en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona del grupo que consiste de O y NH; n, m, p y q son enteros de 0 a 6; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y son grupos alquilo de cadena recta no sustituidos que tienen de 6 a 14 átomos de carbono, y en donde uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> es opcionalmente hidrógeno; R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H y metilo; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H, hidroxilo, alcoxi, fosfona, fosfonoxi, sulfo, sulfoxi, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxi, y ésteres y amidas de los mismos; R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en fosfona y H, y por lo menos uno de R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> es fosfona; R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos, de cadena recta, que tienen de 1 a 11 átomos de carbono; dado que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> son grupos alquilo de cadena recta C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> no sustituidos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

35

La presente invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula (IV):



(IV)

en donde X se selecciona del grupo que consiste en O y S, en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona del grupo que consiste de O y NH; n, m, p y q son enteros de 0 a 6; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y son grupos alquilo de cadena recta no sustituidos que tienen de 6 a 14 átomos de carbono, y en donde uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> es opcionalmente hidrógeno; R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H y metilo; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H, hidroxilo, alcoxi, fosfona, fosfonoxi, sulfona, sulfoxi, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxi, y ésteres y amidas de los mismos; R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en fosfona y H, y por lo menos uno de R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> es fosfona; R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos, de cadena recta, que tienen de 1 a 11 átomos de carbono; dado que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> son grupos alquilo de cadena recta C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> no sustituidos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Estos compuestos tienen atributos que les dan resistencia al metabolismo desfavorable y/o hidrólisis acuosa. Se ha postulado que la eliminación selectiva de los ácidos grasos normales de moléculas del lípido A estructuralmente diversas, mediante la aciloxiacil hidralasa humana (AOAH) para producir el antagonista lípido IVa, ha evolucionado como un mecanismo de defensa para reducir la toxicidad del lípido A (Erwin y Munford., *J Biol. Chem* 265(27):16444-16449, 1990). Sin embargo, la mayor toxicidad del 3-D-MPL derivado naturalmente con respecto al componente hexaacilo principal, probablemente se debe a la presencia de menos componentes altamente acilados con estructuras distintas del lípido IVa (Ulrich and Myers, "Monophosphoryl lipid A as an Adjuvant. Past experiences and new directions", en: "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach", ed. Powell M. F., Newman M. J. Plenum Press, Nueva York, 1995; p. 495-524, Johnson et al., *J Med Chem*; 42:4640-4649, 1999). La variabilidad estructural en 3-D-MPL y en otras preparaciones del lípido A surge inherentemente del LPS cognado, y de la división del éster durante los procedimientos semisintéticos y de aislamiento. De hecho, se ha reportado que una división hidrolítica fácil de los grupos acilo ligados a éster durante síntesis química de un lípido A de *R. capsulatus putativo*, un antagonista potente de la producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS, produce cantidades menores de subproductos agonistas indeseables (Christ et al., *Science*; 268:80-83, 1995). De esta manera, la inestabilidad química y/o enzimática puede ser el talón de Aquiles de un posible fármaco con base en el lípido A que contiene enlaces de éster lábiles. La inestabilidad química y metabólica de los ácidos grasos ligados a éster, presentes en moléculas de agonistas y antagonistas del lípido A, ha sido superada con análogos hidrolíticamente estables que llevan otros enlaces en lugar de los ácidos grasos primarios o secundarios ligados a éster (Christ et al., *supra*, Lien et al., *J Biol Chem*; 276(3):1873-1880, 2001).

Como se discute aquí, el término "alifático", por sí solo o como parte de otro sustituyente, a menos que se indique de lo contrario, significa un radical de hidrocarburo de cadena recta o ramificada o cíclico, o combinaciones de los mismos, que puede ser completamente saturado, mono- o poliinsaturado, y puede incluir radicales di- y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designados (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> significa de uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales de hidrocarburo saturados incluyen grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alifático insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Ejemplos de grupos alifáticos insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y homólogos superiores e isómeros. Normalmente, un grupo alifático tendrá de 1 a 24 átomos de carbono. Un grupo "alifático inferior" es un grupo alifático de cadena corta, que tiene generalmente ocho o menos átomos de carbono.

El término "acilo" se refiere a un grupo derivado de un ácido orgánico mediante eliminación del grupo hidroxilo. Ejemplos de grupos acilo incluyen acetilo, propionilo, dodecanoilo, tetradecanoilo, isobutirilo y similares. De acuerdo con lo anterior, el

término "acilo", como se utiliza aquí, incluye un grupo definido otra forma como -C(O)-alifático, en donde el grupo alifático es preferiblemente un grupo alifático saturado.

5 Se entiende que el término "sales farmacéuticamente aceptables" incluye sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, que dependen de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos aquí. Cuando los compuestos de la presente invención contienen grupos funcionales relativamente ácidos, se pueden obtener sales de adición básicas al poner en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un solvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición básica farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, amonio, de amino orgánico, o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen grupos funcionales relativamente básicos, se pueden obtener sales de adición ácidas al poner en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un solvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrocarbónico, fosfórico, monohidrogenfosfórico, dihidrogenfosfórico, sulfúrico, monohidrogensulfúrico, yodhídrico o fosforoso, y similares, así como también las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos tales como ácido acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucónico o galacturónico y similares (véase por ejemplo, Berge, S.M., et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19, 1977). Determinados compuestos específicos de la presente invención contienen grupos funcionales tanto básicos como ácidos que permiten que los compuestos sean convertidos en ya sea sales de adición básicas o ácidas.

25 Las formas neutras de los compuestos se pueden regenerar al poner en contacto la sal con una base o ácido, y aislar el compuesto original de la manera convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como solubilidad en solventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma original del compuesto para propósitos de la presente invención.

30 Además de las formas de sal, la presente invención proporciona compuestos que están en una forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos aquí son aquellos compuestos que pueden experimentar fácilmente cambios químicos bajo condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente invención. Adicionalmente, los profármacos se pueden convertir en los compuestos de la presente invención mediante métodos químicos o bioquímicos en un ambiente ex vivo. Por ejemplo, los profármacos se pueden convertir lentamente en los compuestos de la presente invención cuando se colocan en un depósito de parche transdérmico con una enzima o reactivo químico adecuado.

35 Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como también en formas solvatadas, que incluyen formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se consideran abarcadas dentro del alcance de la presente invención. Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se consideran dentro del alcance de la presente invención.

40 Determinados compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales, se consideran abarcados dentro del alcance de la presente invención.

45 Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos se pueden marcar radiactivamente con isótopos radioactivos tales como por ejemplo tritio ( $^3\text{H}$ ), yodo 125 ( $^{125}\text{I}$ ) o carbono 14 ( $^{14}\text{C}$ ). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sean radioactivas o no, se consideran abarcados dentro del alcance de la presente invención.

50 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante cualquier medio adecuado; véase la sección de Ejemplo adelante, muchos de los cuales se han descrito. Por ejemplo, los procesos para preparar determinados compuestos útiles en la presente invención se describen en la Patente Estadounidense No. 6,113,918; Patente Estadounidense No. 6,303,347; y PCT/US98/09385 (WO 98/50300, 12 de octubre de 1998). Aún otros compuestos se pueden preparar utilizando los métodos descritos en Johnson et al., J. Med. Chem. 42:4640-4649 (1999), Johnson, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2273-2278 (1999), y PCT/US98/50399 (WO 98/50399, 12 de noviembre de 1998). En general, los métodos sintéticos descritos en las referencias indicadas anteriormente y otros métodos sintéticos de otra forma familiares en la técnica, son ampliamente aplicables para la preparación de estos compuestos. Por ejemplo, para preparar compuestos que tienen grupos acilo y sustituciones diferentes, un experto en la técnica apreciará que los métodos convergentes descritos aquí se pueden modificar para utilizar agentes de acilación alternativos, o se pueden iniciar con materiales disponibles comercialmente que tienen unidos grupos acilo apropiados.

En las composiciones para provocar o mejorar una respuesta inmune, los compuestos de la presente invención se administran a un animal de sangre caliente, que incluye humanos, con un antígeno tal como un antígeno de proteína o polipéptido, o un polinucleótido que expresa un antígeno de proteína o polipéptido. La cantidad de antígeno administrado para provocar una respuesta deseada se puede determinar fácilmente por el experto en la técnica, y varía con el tipo de antígeno administrado, la ruta de administración y el programa de inmunización.

Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar sin un antígeno exógeno para provocar protección inmediata por medio de un efecto de resistencia no específica, tal como se describe adelante; véase Persing et al., publicación WIPO WO 01/90129, 29 de noviembre de 2001. Los compuestos que tienen la capacidad de estimular resistencia no específica y/o provocar un efecto adyuvante se pueden utilizar en la formulación de una vacuna rápida. La administración de los compuestos de la presente invención con un antígeno produce una respuesta inmune en la vía mucosa adquirida en el transcurso de tres a cuatro semanas. La administración semanal de dichos compuestos, por ejemplo, a través de una ruta intranasal, durante un periodo de cuatro semanas, proporcionaría una protección rápida y duradera al combinar la protección proporcionada por la respuesta inmune innata inicial, seguida por la respuesta inmune adquirida para el antígeno de interés.

Los compuestos de la presente invención se pueden evaluar en una variedad de formatos de ensayo para identificar y seleccionar aquellos que tienen las características más adecuadas para una aplicación dada de la invención. Por ejemplo, se pueden utilizar modelos de animal para identificar y evaluar los perfiles de liberación de citoquina en la circulación sistémica después de administración de un compuesto de la presente invención. Además, existen varios modelos in vitro e in vivo para examinar los cambios en uno o más aspectos de una respuesta inmune para diferentes componentes antigénicos con el fin de identificar compuestos más adecuados para provocar una respuesta inmune específica de interés. Por ejemplo, se puede poner en contacto un compuesto con las células objetivo, tales como macrófagos, células dendríticas o células de Langerhans, in vitro, y se pueden medir las citoquinas elaboradas. Además, se pueden utilizar matrices de expresión de gen para identificar las rutas específicas activadas o inhibidas por un compuesto particular de interés.

Se puede determinar la inducción/producción de citoquinas utilizando tratamiento de sangre y/o células humanas con los compuestos de la presente invención, y midiendo la inducción mediante ELISA (R&D Systems). También se pueden utilizar dichos métodos para determinar si la inducción es dependiente del receptor Toll. La respuesta citotóxica de linfocitos T después de administración de los compuestos de la presente invención se determina mediante un ensayo de citotoxicidad con base en <sup>51</sup>Cr. A este respecto, si se desea, se puede comparar el rendimiento del compuesto de la invención con otros compuestos conocidos por ser funcionales, tal como el lípido A, MPL, AGP o similares. Además, los compuestos de la invención se pueden evaluar en combinación con uno o más adyuvantes y/o agentes inmunomoduladores para identificar efectos sinérgicos (véanse por ejemplo Patentes Estadounidenses Nos. 6,303,347 y 6,113,918, y WO 01/90129, publicada el 29 de noviembre de 2001).

Los modelos de animal, tales como el modelo de inoculación de influenza de murino y el modelo de inoculación de *Listeria monocytogenes* murina, son útiles para evaluar la actividad de adyuvante e inmunomodulador. Brevemente, el compuesto se administra seguido por una inoculación de *L. monocytogenes* o influenza. El índice de la enfermedad (erupción cutánea, postura jorobada y dificultad respiratoria), pérdida de peso y mortalidad, en el caso de influenza, o el número de unidades formadoras de colonia en los bazos de ratones tratados/no tratados, en el caso de *L. monocytogenes* se monitorea como una indicación de protección proporcionada por la administración del compuesto de la invención (véase por ejemplo, WO 01/90129, publicada el 29 de noviembre de 2001).

Como se utiliza aquí, el término "polipéptido" se utiliza en su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica del producto; de esta manera, dentro de la definición de polipéptido se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas, y dichos términos se pueden utilizar de forma intercambiable aquí, a menos que se indique específicamente lo contrario. También, este término no se refiere a ni excluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no naturales. Un polipéptido puede ser una proteína completa o una subsecuencia de la misma. Los polipéptidos particulares de interés en el contexto de esta invención son subsecuencias de aminoácidos que comprenden epítomos, es decir, determinantes antigénicos sustancialmente responsables de las propiedades inmunogénicas de un polipéptido, capaces de provocar una respuesta inmune.

Los polipéptidos útiles en la presente invención algunas veces se mencionan aquí como proteínas de tumor o polipéptidos de tumor, como una indicación de que su identificación se ha basado por lo menos en parte en sus niveles en aumento de expresión en muestras de tumor. De esta manera, un "polipéptido de tumor" o "proteína de tumor", se refiere generalmente a una secuencia de polipéptidos de la presente invención, o una secuencia de polinucleótidos que codifica dicho polipéptido, que se expresa en una proporción sustancial de muestras de tumor; por ejemplo, preferiblemente en más de aproximadamente 20%, más preferiblemente en más de aproximadamente 30%, y aún más preferiblemente en más de

aproximadamente 50% o más, de las muestras de tumor probadas, a un nivel que es por lo menos dos veces, y preferiblemente por lo menos cinco veces mayor que el nivel de expresión en los tejidos normales, según se determina utilizando un ensayo representativo proporcionado aquí.

5 En determinadas realizaciones preferidas, los polipéptidos de la invención son inmunogénicos, es decir, reaccionan detectablemente dentro de un inmunoensayo (tal como un ELISA o ensayo de inoculación de células T) con antisuero y/o células T de un paciente con cáncer. El detección de la actividad inmunogénica se puede realizar utilizando técnicas muy conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, dichas detecciones se pueden realizar utilizando método tales como aquellos descritos en Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En un ejemplo ilustrativo, un polipéptido se puede inmovilizar en un soporte sólido y ponerse en contacto con el suero del paciente para permitir la unión de los anticuerpos dentro del suero con el polipéptido inmovilizado. Luego se puede eliminar el suero no unido y los anticuerpos unidos se detectan utilizando por ejemplo la proteína A marcada con <sup>125</sup>I.

15 Como lo reconocería el experto, las porciones inmunogénicas de los polipéptidos descritos aquí también se abarcan por la presente invención. Una "porción inmunogénica", como se utiliza aquí, es un fragmento de un polipéptido inmunogénico de la invención que por sí solo es inmunológicamente reactivo (es decir, se une específicamente) con los receptores de antígeno de superficie de células B y/o células T que reconocen el polipéptido. De manera general se pueden identificar las porciones inmunogénicas utilizando técnicas bien conocidas, tales como las que se resumen en Paul, "Fundamental Immunology", 3a ed., 243-247 (Raven Press, 1993), y las referencias citadas aquí. Dichas técnicas incluyen la detección de polipéptidos para determinar la capacidad de reaccionar con anticuerpos específicos de antígeno, antisuero y/o clones o estirpes de células T. Como se utiliza aquí, el antisuero y los anticuerpos son "específicos de antígeno" si se unen específicamente a un antígeno (es decir, reaccionan con la proteína en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo, y no reaccionan detectablemente con proteínas no relacionadas). Dicho antisuero y anticuerpo se pueden preparar como se describe aquí y utilizando técnicas bien conocidas.

25 En una realización preferida, una porción inmunogénica de un polipéptido de la presente invención es una porción que reacciona con antisuero y/o células T a un nivel que no es sustancialmente menor que la reactividad del polipéptido de longitud completa (por ejemplo en un ensayo ELISA y/o de reactividad de células T). Preferiblemente, el nivel de actividad inmunogénica de la porción inmunogénica es de por lo menos aproximadamente 50%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 70%, y aún más preferiblemente mayor de aproximadamente 90% de la inmunogenicidad del polipéptido de longitud completa. En algunos casos, las porciones inmunogénicas preferidas se identificarán porque tienen un nivel de actividad inmunogénica mayor que aquella del polipéptido correspondiente de longitud completa, por ejemplo, que tienen más de aproximadamente 100% o 150% o más de actividad inmunogénica.

35 En determinadas otras realizaciones, las porciones inmunogénicas ilustrativas pueden incluir péptidos en los cuales se ha suprimido una secuencia líder N-terminal y/o un dominio de transmembrana. Otras porciones inmunogénicas ilustrativas contendrán una pequeña supresión N y/ o C-terminal (por ejemplo, 1-30 aminoácidos, preferiblemente 5-15 aminoácidos), con respecto a la proteína madura.

40 En otra realización, una composición de polipéptido de la invención también puede comprender uno o más polipéptidos que son inmunológicamente reactivos con células T y/o anticuerpos generados contra un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos descrita aquí, o un fragmento o variante inmunogénico del mismo.

45 En otra realización de la invención se proporcionan polipéptidos que comprenden uno o más polipéptidos que son capaces de inducir células T y/o anticuerpos que son inmunológicamente reactivos para uno o más polipéptidos descritos aquí, o uno o más polipéptidos codificados por secuencias de ácidos nucleicos contiguos contenidos en los polinucleótidos descritos aquí, o fragmentos o variantes inmunogénicos de los mismos.

50 Los polipéptidos pueden comprender una secuencia de señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína que dirige la transferencia de la proteína, que dirige co-traducionalmente o post- traducionalmente la transferencia de la proteína. El polipéptido también se puede conjugar con un ligador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para aumentar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido se puede conjugar a una región Fc de inmunoglobulina.

55 Dentro de otras realizaciones ilustrativas, un polipéptido puede ser un polipéptido de fusión que comprende múltiples polipéptidos como los que se describen aquí, o que comprende por lo menos un polipéptido como se describe aquí y una secuencia no relacionada, tal como una proteína de tumor conocida. Un socio de unión, por ejemplo, puede ayudar a proporcionar los epítopos de células ayudadoras T de (un socio de fusión inmunológico), preferiblemente epítopos de células ayudadoras T reconocidos por humanos, o pueden ayudar en la expresión de la proteína (un potenciador de expresión) con rendimientos más altos que la proteína recombinante natural. Determinados socios de fusión preferidos son

socios de fusión inmunológicos y de incremento de expresión. Otros socios de fusión se pueden seleccionar con el fin de aumentar la solubilidad del polipéptido, o para permitir que el polipéptido sea dirigido a los compartimientos intracelulares deseados. Aún socios de fusión adicionales incluyen etiquetas de afinidad que facilitan la purificación del polipéptido.

5 En general, se pueden preparar los polipéptidos de fusión utilizando técnicas estándar, que incluyen conjugación química. Preferiblemente, un polipéptido de fusión se expresa como un polipéptido recombinante, que permiten la producción de niveles en aumento, con respecto a un polipéptido no fusionado en un sistema de expresión. Brevemente, se pueden ensamblar de forma separada secuencias de ADN que codifican los componentes de polipéptido, y se ligan en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente de polipéptido se liga, con o sin un  
10 ligador de péptido, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente del polipéptido de tal manera que los marcos de lectura de las secuencias están en fase. Esto permite la traducción en un solo polipéptido de fusión que retiene la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

15 Se puede emplear una secuencia ligadora de péptido para separar el primero y segundo componentes de polipéptido mediante una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y terciaria. Dicha secuencia ligadora de péptido se incorpora en el polipéptido de fusión utilizando técnicas estándares bien conocidas en el arte. Las secuencias ligadoras de péptido adecuadas se pueden elegir en función de los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pudiera interactuar con epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptidos; y (3) la falta de residuos hidrófobos o  
20 cargados que podrían reaccionar con los epítomos funcionales del polipéptido. Las secuencias ligadoras de péptido preferidas contienen residuos de Gly, Asn y Ser. También se pueden utilizar en la secuencia ligadora otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala. Las secuencias de aminoácido que se pueden emplear de forma conveniente como ligadores incluyen aquellas descritas en Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; Patente Estadounidense No. 4,935,233 y Patente Estadounidense No. 4,751,180. La secuencia ligadora  
25 generalmente puede tener de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. No se requieren secuencias de ligador cuando el primero y segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácido N-terminales no esenciales que se pueden utilizar para separar los dominios funcionales e impedir la interferencia estérica.

30 Las secuencias de ADN ligadas se unen de forma operativa con elementos reguladores adecuados de transcripción o traducción. Los elementos reguladores responsables de la expresión de ADN sólo se localizan en dirección 5' a la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. Del mismo modo, los codones de terminación requeridos para terminar la traducción y las señales de terminación de transcripción están presentes solo en dirección 3' a la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

35 El polipéptido de fusión puede comprender un polipéptido como se describe aquí, junto con una proteína inmunogénica no relacionada, tal como una proteína inmunogénica capaz de provocar una respuesta de memoria. Ejemplos de dichas proteínas incluyen proteínas de tétanos, tuberculosis y hepatitis (véase por ejemplo Stoute et al., New Engl. J. Med., 336:86-91, 1997).

40 En una realización preferida, el socio de fusión inmunológico se deriva de un *Mycobacterium* sp., tal como un fragmento Ra12 derivado de *Mycobacterium tuberculosis*. Las composiciones de Ra12 y los métodos para su uso en la mejora de la expresión y/o inmunogenicidad de las secuencias de polinucleótido/polipéptido heterólogas, se describen en la Solicitud de Patente Estadounidense 60/158,585. Brevemente, el Ra12 se refiere a una región de polinucleótido que es una subsecuencia del ácido nucleico MTB32A de *Mycobacterium tuberculosis*. La MTB32A es una serina proteasa con peso  
45 molecular de 32 KD, codificada por un gen en cepas virulentas y no virulentas de *M. tuberculosis*. Se ha descrito la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de MTB32A (por ejemplo, Solicitud de Patente Estadounidense 60/158,585; véase también Skeiky et al., Infection and Immun. (1999) 67:3998-4007). Fragmentos de C-terminal de la secuencia de codificación de MTB32A se expresan a altos niveles y permanecen como polipéptidos solubles a lo largo del proceso de purificación. Más aún, el Ra12 puede potenciar la inmunogenicidad de los polipéptidos inmunogénicos heterólogos con los cuales se fusiona. Un polipéptido de fusión Ra12 preferido comprende un fragmento C-terminal de 14  
50 KD que corresponde a los residuos de aminoácidos 192 a 323 de MTB32A. Otros polinucleótidos de Ra12 preferidos comprenden en general por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos consecutivos, por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 200 nucleótidos, o por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos, que codifican una porción de un polipéptido Ra12. Los polinucleótidos Ra12 pueden comprender una secuencia natural (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido Ra12 o una porción del mismo), o puede comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes del polinucleótido Ra12 pueden contener una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones, de tal manera que la actividad biológica del polipéptido de fusión codificado, sustancialmente no disminuye con respecto a un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido Ra12 nativo. Preferiblemente, las variantes exhiben por lo menos  
55 aproximadamente 70% de identidad, preferiblemente por lo menos 80% de identidad, y aún más preferiblemente por lo

menos aproximadamente 90% de identidad con una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido Ra12 natural o una porción del mismo.

5 Dentro de otras realizaciones preferidas, un socio de fusión inmunológico se deriva de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa Haemophilus influenza B (WO 91/18926). Preferiblemente, un derivado de proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (por ejemplo, los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales), y un derivado de proteína D se puede unir a un lípido. Dentro de determinadas realizaciones preferidas, los primeros 109 residuos de un socio de fusión de lipoproteína D están incluidos en el terminal N para proporcionar el polipéptido con epítomos exógenos adicionales de células T, y para aumentar el nivel de expresión en E. coli (de esta manera, funciona como un potenciador de expresión). La cola del lípido asegura la presentación óptima del antígeno a las células presentadoras de antígeno. Otros socios de fusión incluyen la proteína no estructural del virus de la influenza, NS1 (hemoaglutinina). Normalmente se utilizan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque se pueden utilizar diferentes fragmentos que incluyen epítomos de células ayudadoras T.

15 En otra realización, el socio de fusión inmunológico es la proteína conocida como LYTA, o una porción de la misma (preferiblemente una porción C-terminal). La LYTA se deriva de Streptococcus pneumoniae, que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa conocida como LYTA amidasa (codificada por el gen *LytA*; Gene 43:265-292, 1986). La LYTA es una autolisina que degrada específicamente determinados enlaces en la estructura principal del peptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es la responsable de la afinidad a la colina o a algunos análogos de colina, tales como DEAE. Se ha explotado esta propiedad para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA de E. coli útiles para expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en el extremo amino (véase Biotechnology 10:795-798, 1992). Dentro de una realización preferida se puede incorporar una porción de repetición de LYTA en un polipéptido de fusión. Una porción de repetición se encuentra en la región C-terminal empezando en el residuo 178. Una porción de repetición particularmente preferida incorpora los residuos 188-305.

25 Todavía otra realización ilustrativa incluye polipéptidos de fusión, y polinucleótidos que los codifican, en donde el socio de fusión comprende una señal objetivo capaz de dirigir un polipéptido al compartimiento endosómico/lisosómico, como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,633,234. Un polipéptido inmunogénico de la invención, cuando se fusiona con esta señal objetivo, se asociará más eficientemente con moléculas MHC de clase II, y por lo tanto proporciona una inoculación in vivo mejorada de las células CD4<sup>+</sup>-T específicas para el polipéptido.

30 Los polipéptidos de la invención se preparan utilizando cualquiera de una variedad de técnicas sintéticas y/o recombinantes bien conocidas. Utilizando técnicas bien conocidas por aquellos con experticia común en la técnica se pueden generar polipéptidos, porciones y otras variantes generalmente menores de aproximadamente 150 aminoácidos por medios sintéticos. En un ejemplo ilustrativo, dichos polipéptidos se sintetizan utilizando cualquiera de las técnicas de fase sólida disponibles comercialmente, tales como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, en donde se agregan de forma secuencial aminoácidos a una cadena de aminoácidos en crecimiento: véase Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1993. Los equipos para síntesis automática de polipéptidos están disponibles comercialmente, de proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems División (Foster City, California), y se pueden operar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 En general, se aíslan las composiciones de polipéptido de la invención (que incluyen polipéptidos de fusión). Un polipéptido "aislado" es aquél que se retira de su ambiente original. Por ejemplo, una proteína o polipéptido de origen natural se aísla si se le separa de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, dichos polipéptidos también se purifican, por ejemplo son por lo menos 90% puros, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95% puros y aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 99% puros.

45 La presente invención, en otros aspectos, proporciona compuestos que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican un antígeno polipéptidico como se estableció anteriormente. Los términos "ADN" y "polinucleótido", se utilizan esencialmente de forma intercambiable aquí para referirse a una molécula de ADN que se ha aislado del ADN genómico total de una especie particular. "Aislado", como se utiliza aquí, significa que un polinucleótido está sustancialmente separado de otras secuencias de codificación, y que la molécula de ADN no contiene porciones grandes de ADN codificador no relacionado, tales como fragmentos cromosómicos grandes ni otros genes funcionales, ni regiones que codifican polipéptidos. Por supuesto, esto se refiere a la molécula de ADN que se aísla originalmente, y no excluye genes ni regiones codificadoras agregadas posteriormente al segmento por manipulación humana.

50 Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia natural (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido/proteína de la invención o una porción de la misma), o pueden comprender una secuencia que codifica una variante o derivado, preferiblemente, y una variante o derivado inmunogénico de dicha secuencia. Normalmente las variantes de polinucleótido contendrán una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones, preferiblemente de modo que la inmunogenicidad del polipéptido codificado por el polinucleótido variante no disminuya sustancialmente con

respecto a un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido específicamente establecida aquí). También se debe entender que el término "variante" abarca genes homólogos de origen xenogénico.

En determinadas realizaciones preferidas, los polinucleótidos descritos anteriormente, por ejemplo las variantes, fragmentos y secuencias de hibridación de polinucleótidos, codifican polipéptidos que tiene inmunológicamente reacción cruzada con un polipéptido antigénico o inmunogénico como se estableció aquí anteriormente. En otras realizaciones preferidas, dichos polinucleótidos codifican polipéptidos que tienen un nivel de actividad inmunogénica de por lo menos aproximadamente 50%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 70%, y aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% de una secuencia de polipéptido específicamente establecida aquí.

Los polinucleótidos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, independientemente de la longitud de la secuencia de codificación en sí misma, se pueden combinar con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzima de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otras secuencias de codificación, y similares, de tal manera que su longitud general puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se puede emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, con la longitud total que preferiblemente se limita por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante destinado. Por ejemplo, los segmentos de polinucleótidos ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 10.000 pares de bases, de aproximadamente 5000 pares de bases, aproximadamente 3000 pares de bases, aproximadamente 2000 pares de bases, aproximadamente 1000 pares de bases, aproximadamente 500 pares de bases, aproximadamente 200 pares de bases, aproximadamente 100 pares de bases, aproximadamente 50 pares de bases, y longitudes similares (que incluyen todas las longitudes intermedias) se contempla que son útiles en muchas implementaciones de la invención.

Se pueden identificar, preparar y/o manipular las composiciones de polinucleótido de la presente invención utilizando cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas (véase en general, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, y otras referencias similares). Por ejemplo, se puede identificar un polinucleótido, como se describe en más detalle adelante, al detectar un micromatriz de ADNc para determinar la expresión asociada a tumor (es decir, la expresión que es por lo menos dos veces mayor en un tumor que en un tejido normal, como se determina utilizando un ensayo representativo proporcionado aquí). Dichas detecciones se pueden hacer, por ejemplo, utilizando la tecnología de micromatriz de Affymetrix, Inc. (Santa Clara, California), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (y esencialmente como lo describen Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619, 1996, y Heller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150- 2155, 1997). Alternativamente, los polinucleótidos se pueden amplificar a partir de ADNc preparado de células que expresan las proteínas descritas aquí, tales como células de tumor.

Están disponibles muchos procesos dependientes de plantilla para amplificar una secuencia objetivo de interés presente en una muestra. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de polimerasa (PCR<sup>TM</sup>), que se describe en detalle en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159. Brevemente, en PCR<sup>TM</sup>, se preparan dos secuencias de cebador que son complementarias a regiones sobre cadenas complementarias opuestas de la secuencia objetivo. Un exceso de trifosfatos de desoxinucleósido se agrega a una mezcla de reacción junto con una polimerasa de ADN (por ejemplo, polimerasa Taq). Si la secuencia objetivo está presente en una muestra, los cebadores se unirán al objetivo, y la polimerasa provocará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia objetivo al agregar nucleótidos. Al aumentar y reducir la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del objetivo para formar productos de reacción, el exceso de cebadores se unirá al objetivo y al producto de reacción y el proceso se repite. Preferiblemente, se puede efectuar transcripción inversa y procedimiento de amplificación PCR<sup>TM</sup> para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado. La metodología de reacción en la cadena de polimerasa es bien conocida.

Se conocen y están disponibles fácilmente cualquier número de otros procesos dependientes de plantilla, muchos de los cuales son variaciones de la técnica de amplificación de PCR<sup>TM</sup> en el Arte. Ilustrativamente, algunos de dichos métodos incluyen reacción en cadena de ligasa (denominada como LCR), descrita, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente Europea No. 320,308, y la Patente Estadounidense No. 4,883,750; Qbeta Replicase", descrita en la Publicación de Solicitud de Patente No. PCT/US87/00880; Amplificación de Desplazamiento de Cadena (SDA) y Reacción de Cadena de Reparación (RCR). Otros métodos de amplificación se describen en la Solicitud de Patente de la Gran Bretaña No. 2 202 328, en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US89/01025. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas de amplificación con base en la transcripción (TAS) (Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 88/10315), que incluye amplificación con base en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y 3SR. La Publicación de Solicitud de Patente Europea No. 329,822 describe un proceso de amplificación de ácido nucleico que incluye sintetizar cíclicamente ARN de una cadena sencilla ("ARNcs"), ADNcs, y ADN de doble cadena (ADNdc). La Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 89/06700 describe un esquema de amplificación de secuencia de ácido nucleico con base en la hibridación de una secuencia promotora/cebadora con un ADN de cadena sencilla objetivo ("ADNss"), seguido por transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Otros métodos de amplificación tales como "RACE" (Frohman, 1990), y "PCR unilateral" (Ohara, 1989), también son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Una porción amplificada de un polinucleótido de la presente invención se puede utilizar para aislar un gen de longitud completa de una colección adecuada (por ejemplo una colección de ADNc de tumor), utilizando técnicas bien conocidas. Dentro de estas técnicas, una colección (de ADNc o genómica) se detecta utilizando una o más sondas o cebadores de polinucleótido adecuados para amplificación. Preferiblemente una colección se selecciona por tamaño para incluir moléculas más grandes. También se pueden preferir las colecciones iniciadas aleatoriamente para identificar regiones 5' y en dirección 5' de genes. Se prefieren las colecciones genómicas para obtener intrones y secuencias en dirección 5' que se extienden.

Para técnicas de hibridación, se puede marcar una secuencia parcial (por ejemplo, por traslado de mella o marcación de extremo con <sup>32</sup>P) utilizando técnicas muy conocidas. Después, generalmente se detecta una colección bacteriana o de bacteriófagos mediante filtros de hibridación que contienen colonias bacterianas desnaturalizadas (o céspedes que contienen placas de fago) con la sonda marcada (véase Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). Las colonias o placas que se hibridan se seleccionan y expanden, y el ADN se aísla para análisis adicional. Los clones de ADNc se pueden analizar para determinar la cantidad de secuencia adicional, por ejemplo por mediante PCR utilizando un cebador de la secuencia parcial y un cebador del vector. Se pueden generar mapas de restricción y secuencias parciales para identificar uno o más clones traslapados. Luego la secuencia completa se puede determinar utilizando técnicas estándares, que pueden incluir la generación de una serie de clones de supresión. Las secuencias traslapadas resultantes luego se pueden ensamblar en una sola secuencia contigua. Se puede generar una molécula de ADNc de longitud completa al ligar los fragmentos adecuados, utilizando técnicas bien conocidas.

Alternativamente, las técnicas de amplificación, como aquellas descritas anteriormente, pueden ser útiles para obtener una secuencia de codificación de longitud completa a partir de una secuencia de ADN parcial. Una de dichas técnicas de amplificación es la PCR inversa (véase Triglia et al., Nucl. Acids. Res. 16:8186, 1988), que utiliza enzimas de restricción para generar un fragmento en la región conocida del gen. El fragmento luego se cicliza mediante ligación intramolecular y se utiliza como plantilla para la PCR con cebadores divergentes derivados de la región conocida. Dentro de un método alternativo, las secuencias adyacentes a la secuencia parcial se pueden recuperar mediante amplificación con un cebador para una secuencia ligadora y un cebador específico para una región conocida. Las secuencias amplificadas normalmente se someten a una segunda ronda de amplificación con el mismo cebador ligador y un segundo cebador específico para la región conocida. En el documento WO 96/38591, se describe una variación de este procedimiento, que emplea dos cebadores que inician la extensión en direcciones opuestas a las de la secuencia conocida. Otra de estas técnicas se conoce como "amplificación rápida de los extremos de ADNc" o RACE. Esta técnica incluye el uso de un cebador interno y un cebador externo, que hibridan a una región de poli-A o secuencia de vector, para identificar secuencias que están en dirección 5' y 3' de una secuencia conocida. Técnicas adicionales incluyen PCR de captura (Lagerstrom et al., PCR Methods Applic. 1:111-19, 1991), y PCR de caminata (Parker et al., Nucl. Acids. Res. 19:3055-60, 1991). También se pueden emplear otros métodos que utilizan amplificación para obtener una secuencia de ADNc de longitud completa.

En determinados casos es posible obtener una secuencia de ADNc de longitud completa mediante análisis de secuencias proporcionadas en una base de datos de etiqueta de secuencia expresada (EST), tal como la que está disponible de GenBank. En general, se pueden realizar búsquedas de EST traslapadas utilizando programas muy conocidos (por ejemplo, búsquedas NCBI BLAST), y dichas EST se pueden utilizar para generar una secuencia contigua de longitud completa. Las secuencias de ADN de longitud completa también se pueden obtener mediante análisis de fragmentos genómicos.

En otras realizaciones de la invención, las secuencias de polinucleótido o fragmentos de las mismas que codifican los polipéptidos establecidos aquí anteriormente, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de las mismas, se pueden utilizar en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido en células anfitrionas apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, se pueden producir otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia funcionalmente equivalente, y estas secuencias se pueden utilizar para clonar y expresar un polipéptido dado.

Las secuencias que codifican un polipéptido deseado se pueden sintetizar, parcial o totalmente, utilizando métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers, M. H. et al. (1980) Nucl. Acids. Res. Symp. Ser. 215-223; Horn, T. et al. (1980) Nucl. Acids. Res. Symp. Ser. 225-232).

Con el fin de expresar un polipéptido deseado, las secuencias de nucleótido que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, se pueden insertar en el vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Se pueden utilizar métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de transcripción y de traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas, y recombinación genética in vivo. Dichas técnicas se describen

por ejemplo en Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York, and Ausubel, F. M. et al. (1989) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, N.Y.

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector - potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3' - que interactúan con las proteínas celulares anfitrionas para llevar a cabo la transcripción y traducción. Dichos elementos pueden variar en su resistencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y el anfitrión utilizado, se puede utilizar cualquier cantidad de elementos de transcripción y traducción adecuados, que incluyen promotores constitutivos e inducibles.

En células de mamífero, generalmente están disponibles una serie de sistemas de expresión con base en virus. Por ejemplo, en los casos donde se utiliza un adenovirus como un vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés se pueden ligar en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste del promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Se puede utilizar la inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma vírico para obtener un virus viable capaz de expresar el polipéptido en células anfitrionas infectadas, (Logan, J. y Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659). Además, se pueden utilizar potenciadores de transcripción, tales como el potenciador del virus de sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en las células anfitrionas de mamífero.

También se pueden utilizar señales de iniciación específicas para obtener una traducción más eficiente de las secuencias que codifican un polipéptido de interés. Dichas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos donde se insertan secuencias que codifican el polipéptido., su codón de iniciación y secuencias en dirección 5' en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de transcripción o traducción adicionales. Sin embargo, en casos en donde sólo se inserta la secuencia de codificación o una porción de la misma, se deben proporcionar señales de control de traducción exógenas que incluyen el codón de iniciación ATG. Adicionalmente, el codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de todo el inserto. Los elementos de traducción exógenos y los codones de iniciación pueden tener diverso origen, tanto natural como sintético. La eficiencia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de potenciadores que son apropiados para el sistema celular particular que se utiliza, tales como aquellos que se describen en la bibliografía (Scharf, D. et al. (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162).

Se conoce en la técnica una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de los productos codificados con polinucleótido, que utilizan ya sea anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Ejemplos incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Un inmunoensayo con base monoclonal, de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epítomos sin interferencia o un polipéptido dado pueden ser preferidos para algunas aplicaciones, pero también se puede emplear un ensayo de unión competitivo. Estos y otros ensayos se describen, entre otras referencias, en Hampton, R. et al. (1990; "Serological Methods, a Laboratory Manual", APS Press. St Paul., Minn) y Maddox, D. E. et al. (1983; J. Exp. Med. 158:1211-1216).

#### Composiciones y métodos farmacéuticos

Se entenderá que, si se desea, los compuestos descritos aquí se pueden administrar en combinación con otras modalidades terapéuticas, tales como compuestos antimicrobianos, antivirales y antifúngicos o terapias, varios productos terapéuticos con base en ADN, productos terapéuticos con base en ARN, productos terapéuticos con base en polipéptidos, y/o otros inmunofactores. De hecho, esencialmente también se puede incluir cualquier otro componente, dado que el o los componentes adicionales no provocan un efecto adverso significativo al contacto con las células objetivo o tejidos anfitriones. De esta manera, las composiciones se pueden suministrar junto con otros agentes según se requiera o se desee para las realizaciones específicas de la invención que se ponen en práctica. Ilustrativamente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir, o se pueden utilizar en conjunto con, ADN que codifica una o más proteínas terapéuticas, ARNs antisentido, ribozimas, o similares.

En un aspecto, los compuestos y composiciones de la invención que los comprenden se pueden administrar junto con un antígeno, para proporcionar un efecto adyuvante o potenciador del antígeno, es decir, para mejorar la respuesta inmune del paciente o sujeto. En otro aspecto, los compuestos y composiciones de la invención se administran en ausencia de antígeno exógeno, para efecto terapéutico del compuesto en sí mismo.

En otro aspecto, en donde el compuesto o la composición se administra sin antígeno exógeno, la presente invención proporciona dichos compuestos o composiciones en el tratamiento, alivio y/o prevención sustancial de enfermedades infecciosas en sujetos eucarióticos, particularmente en animales, preferiblemente en humanos. Dada la importancia de la señalización mediada por TLR en la respuesta inmune innata a la inoculación microbiana, la capacidad para estimular selectivamente dichas rutas y con mínima toxicidad representa una propuesta poderosa para modalidades de tratamiento profiláctico y/o terapéutico contra un amplio rango de agentes infecciosos.

Los compuestos para uso descritos aquí son aplicables esencialmente contra cualquier tipo de agente infeccioso, que incluye bacterias, virus, parásitos y hongos. De forma ilustrativa, la invención es útil para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de infecciones bacterianas causadas en especies de *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Candida*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* y muchas otras. Las afecciones virales ilustrativas que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen aquellas provocadas por ejemplo, por los virus de influenza, adenovirus, virus de para influenza, rinovirus, virus sincitial respiratorio (RSVs), virus del Herpes, Citomegalovirus, virus de la hepatitis, por ejemplo virus de hepatitis B y C, entre otros. Los hongos ilustrativos incluyen, por ejemplo, *Aspergillus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, y otros.

En una realización ilustrativa, la invención proporciona compuestos o composiciones para el tratamiento de sujetos, particularmente sujetos inmunocomprometidos, que han desarrollado o están en riesgo de desarrollar infecciones, tales como bacterias nosocómicas e infecciones virales. Aproximadamente 2 millones de los 40 millones de individuos hospitalizados cada año desarrollan una infección nosocómica durante su estancia, y aproximadamente 1% de estos, aproximadamente 400.000 pacientes, desarrollan pulmonía nosocómica, más de 7000 de los cuales mueren. Esto hace a la pulmonía nosocómica la causa principal de muerte por infecciones adquiridas en el hospital. De esta manera, esta realización llena una necesidad significativa de propuestas profilácticas eficientes para el tratamiento de infecciones nosocómicas.

En una realización relacionada, la presente invención proporciona tratamientos profilácticos para pacientes inmunocomprometidos, tales como pacientes positivos a VIH, que han desarrollado o están en riesgo de desarrollar pulmonía, ya sea de una infección oportunista o a partir de la reactivación de una infección suprimida o latente. En 1992, solo en los Estados Unidos se reportaron aproximadamente 20.000 casos de infecciones por *Pneumocystis carinii* en pacientes con SIDA. Adicionalmente, 60%-70% de todos los pacientes con SIDA adquieren *P. carinii* en algún momento durante su enfermedad. De esta manera, se describen aquí métodos profilácticos efectivos para esta población en riesgo.

En otro método relacionado, los compuestos y composiciones de la presente invención se utilizan para tratar otras poblaciones de pacientes que pueden estar inmunocomprometidos y/o en riesgo de desarrollar enfermedades infecciosas, que incluyen por ejemplo pacientes con fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y otros pacientes inmunocomprometidos y/o internados.

En otro aspecto de la invención, se emplean compuestos y composiciones de la invención (sin antígeno exógeno) en el tratamiento, alivio o prevención sustancial de trastornos y afecciones alérgicas, tales como sinusitis, rinosinusitis crónica, asma, dermatitis atópica y soriasis. Este método se basa por lo menos en parte en la capacidad de los compuestos para activar la producción de citoquinas de células objetivo que pueden competir con las respuestas estereotípicas de citoquina de tipo alérgicas caracterizadas por la producción de IL-4 o hipersensibilidad a actividad de IL-4. La administración de determinados compuestos mono- y disacáridos descritos aquí da como resultado la expresión de IFN-gamma e IL-12 a partir de células que procesan y presentan antígeno, así como también en otras células, dando como resultado la regulación por disminución de las citoquinas asociadas con respuestas alérgicas, tales como IL-4, 5, 6, 10 Y 13.

En aún otro aspecto de la invención, se emplean compuestos y composiciones de la misma (sin antígeno exógeno) en el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunes. Los compuestos para utilizar en esta realización normalmente serán seleccionados de aquellos capaces de antagonizar, inhibir o modular negativamente de otra manera, uno o más receptores similares a Toll, particularmente Tlr2 y/o Tlr4, de tal manera que sustancialmente se previene o se alivia una respuesta autoinmune asociada con una afección dada. De forma ilustrativa, los compuestos y composiciones proporcionadas por esta realización se pueden utilizar en el tratamiento de condiciones tales como enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, artritis crónica, esclerosis múltiple y soriasis.

Los compuestos de la invención objeto también se pueden utilizar como adyuvantes e inmunoefectores que incrementan la generación de anticuerpos en animales inmunizados, estimulan la producción de citoquinas y estimulan una respuesta inmune mediada por células, que incluye una respuesta de linfocitos T citotóxicos.

En los compuestos y composiciones para uso de acuerdo con la invención, por ejemplo, para efectuar la respuesta inmune de un individuo, se pueden formular los compuestos y composiciones de la invención objeto con un portador farmacéuticamente aceptable para inyección o ingestión. Como se utiliza aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" significa un medio que no interfiere con la actividad inmunomoduladora del ingrediente activo y no es tóxico para el paciente al que se le administra. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen emulsiones de aceite en agua o agua en aceite, composiciones acuosas, liposomas, microglóbulos y microsomas. Por ejemplo, el portador puede ser una microesfera o micropartícula que tiene un compuesto de esta invención dentro de la matriz de la esfera o partícula, o puede ser absorbido sobre la superficie de la esfera o partícula. También, el portador puede ser una solución acuosa o dispersión micelar que contiene trietilamina, trietanolamina, u otro agente que hace a la formulación de naturaleza alcalina, o una

suspensión que contiene hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, fosfato de calcio o ascorbato de tirosina. Los portadores también pueden incluir todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, reguladores, soluciones de portador, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es muy conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o antígeno convencional que sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas.

Las formulaciones de los compuestos de la invención objeto que se pueden administrar parenteralmente, es decir, intraperitonealmente, subcutáneamente o intramuscularmente, incluyen los siguientes portadores preferidos. Ejemplos de portadores preferidos para uso subcutáneo incluyen una solución salina reguladora de fosfato (PBS), y trietanolamina al 0,01-0,1% en Agua USP para Inyección. Los portadores adecuados para inyección intramuscular incluyen etanol USP al 10%, propilenglicol al 40%, y el equilibrio de una solución isotónica aceptable tal como dextrosa al 5%.

Ejemplos de portadores preferidos para uso intravenoso incluyen etanol USP al 10%, propilenglicol USP al 40%, y el resto Agua USP para Inyección. Otro portador aceptable incluye etanol USP al 10% y Agua USP para Inyección; otro portador aceptable es trietanolamina al 0,01-0,1% en Agua USP para Inyección. Los solventes parenterales farmacéuticamente aceptables son tales que proporcionan una solución o dispersión que se puede filtrar a través de un filtro de 5 micras sin eliminar el ingrediente activo.

Un método preferido de administración de las composiciones de esta invención es la administración por vía mucosa, particularmente la administración intranasal o la administración mediante inhalación (administración pulmonar). El suministro pulmonar de fármacos se puede lograr mediante diversos métodos diferentes, que incluyen nebulizadores de líquido, inhaladores dosificadores con base en aerosol (MDIs), y dispositivos de dispersión de polvo seco. Normalmente las composiciones para uso en administración de este tipo son polvos secos y aerosoles. Para la administración de aerosoles, que es el método preferido de administración de esta invención, las composiciones se suministran por medio de inhaladores, algunos tipos de los cuales se describen adelante.

Los polvos secos contienen, además del ingrediente activo, un portador, un potenciador de absorción, y opcionalmente otros ingredientes. El portador es por ejemplo un mono-, di- o polisacárido, un alcohol de azúcar u otro poliol. Los portadores adecuados incluyen lactosa, glucosa, rafinosa, melezitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol; y almidón. Se prefiere particularmente la lactosa, especialmente en la forma de su monohidrato. También se incluyen potenciadores de absorción tales como polipéptidos, agentes surfactantes, alquilglicósidos, sales de amina de ácidos grasos o fosfolípidos. Los ingredientes de la formulación normalmente deben estar en una forma finamente dividida, es decir, su diámetro de volumen medio debe ser por lo general de aproximadamente 30 a aproximadamente 200 micras, medido con un instrumento de difracción de láser o un contador Coulter. El tamaño de partícula deseado se puede producir utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo molienda, micronización o precipitación directa.

La ruta de administración intranasal proporciona numerosas ventajas sobre muchas otras formas de administración para los compuestos de esta invención. Por ejemplo, una ventaja de la administración intranasal es la conveniencia. Un sistema inyectable requiere esterilización de la jeringa hipodérmica y en las instalaciones institucionales, conduce a problemas entre el personal médico por el riesgo de contraer una enfermedad al ser pinchados accidentalmente por una aguja contaminada. También se deben imponer requerimientos estrictos para el desecho seguro de la aguja y jeringa utilizadas en la instalación institucional. En contraste, la administración intranasal requiere poco tiempo de parte del paciente y del personal médico encargado, y es mucho menos gravosa para la institución que la administración inyectable.

Una segunda ventaja importante de la administración intranasal es la aceptación del paciente del sistema de suministro de fármaco. La administración intranasal es percibida como no invasiva, y no acompañada de dolor; no tiene efectos colaterales significativos y produce la gratificación de un alivio rápido en el paciente que presenta el síntoma. Esto es de particular ventaja cuando el paciente es un niño. Otra consideración importante es que el paciente puede ser capaz de autoadministrarse las dosificaciones prescritas de aerosol nasal.

Para administración intranasal, las composiciones de esta invención se pueden formular como líquidos o como sólidos. Dichas composiciones pueden contener uno o más adyuvantes, agentes para potenciar la absorción de los ingredientes activos mediante permeación a través de la membrana nasal, y un diluyente acuoso (para composiciones líquidas), por ejemplo agua. Alternativamente, el diluyente puede comprender un regulador acuoso tal como regulador de fosfato. Opcionalmente, la composición puede incluir adicionalmente uno o más alcoholes polihídricos y uno o más agentes conservantes, tales como por ejemplo gentamicina, bacitracina (0,005%), o cresol. Las composiciones se pueden administrar en la cavidad nasal en forma de un aerosol utilizando un atomizador, nebulizador, pulverizador, gotero u otro dispositivo que asegure el contacto de la solución con la membrana de mucosa nasal. El dispositivo puede ser un dispositivo simple, tal como un atomizador nasal simple que puede ser utilizado por el paciente, o puede ser un instrumento más

elaborado para suministrar con más precisión las composiciones, que puede ser utilizado en el consultorio del médico o en una instalación médica.

5 Las composiciones nasales en polvo se pueden hacer al mezclar el agente activo y el excipiente, ambos con el tamaño de partícula deseado. En primer lugar se hace una solución del agente activo y los excipientes de ciclodextrina, seguido por precipitación, filtración y pulverización. También es posible eliminar el solvente mediante secado por congelamiento, seguido por pulverización del polvo al tamaño de partícula deseado al utilizar técnicas convencionales conocidas en la bibliografía farmacéutica. La etapa final es la clasificación por tamaño, por ejemplo mediante tamizado, para obtener preferiblemente partículas de un tamaño de entre 30 y 200 micras de diámetro. Los polvos se pueden administrar utilizando un insuflador nasal, o se pueden colocar en una cápsula puesta en un dispositivo de inhalación o insuflación. Una aguja perfora la cápsula haciendo poros en la parte superior e inferior de la cápsula, y se envía aire para soplar hacia fuera las partículas de polvo. La formulación en polvo también se puede administrar de un atomizador a chorro de gas inerte, o suspendida en fluidos orgánicos líquidos.

15 En una realización específica, la composición farmacéutica se puede suministrar en un sistema de liberación controlada o sostenida. En una realización, se puede utilizar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véase Langer, Science, 249:1527-1533 (1990); Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:10; Buschwald et al., 1980, Surgery 88:507; Sandek et al., 1989 N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida del agonista del receptor  $\kappa$ -opioides y/o antagonista opioides (véase, por ejemplo, "Medical Applications of Controlled Release", Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Florida 1974); "Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance", Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macrol. Chem. 23:61; véase también Levy et al., 1985 Science 228:190; Doring et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105; Patente Estadounidense No. 5,679,377; Patente Estadounidense No. 5,916,597, Patente Estadounidense No. 5,912,015; Patente Estadounidense No. 5,989,463; Patente Estadounidense No. 5,128,326; Publicación PCT No. WO 99/12154; y Publicación PCT No. WO 99/20253). Ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxi-etilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilacturos (PLA), poli(lacturo-co-glicólidos) (PLGA) y poliolefinas. En una realización preferida, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable en almacenamiento, estéril y biodegradable. En todavía otra realización, un sistema de liberación controlada o sostenida se puede poner en la proximidad de un objetivo terapéutico, requiriéndose de esta manera sólo una fracción de la dosis sistémica (véase por ejemplo Goodson, en Medical Applications of Controlled Release", supra, vol. 2, p. 115-138 (1984)).

35 Los portadores para uso con dichas composiciones farmacéuticas son biocompatibles y también pueden ser biodegradables. En determinadas realizaciones, la formulación proporciona preferiblemente un nivel relativamente constante de liberación del componente activo. En otras realizaciones, sin embargo, puede ser deseable una liberación más rápida inmediatamente después de administración. La formulación de dichas composiciones está del dominio del experto en la materia utilizando técnicas conocidas. Los portadores ilustrativos útiles a este respecto incluyen micropartículas de poli(lacturo-co-glicólido), poli(acrilato), látex, almidón, celulosa, dextrano y similares. Otros portadores de liberación prolongada ilustrativos incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un núcleo hidrófilo no líquido (por ejemplo, un polisacárido u oligosacárido entrelazado) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifílico, tal como un fosfolípido (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,151,254 Y las solicitudes PCT WO 94/20078, WO/94/23701 y WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implante, la velocidad y duración esperada de liberación, y la naturaleza de la afección que se va a tratar o evitar.

50 Los compuestos de la invención objeto se administran a un individuo en una cantidad efectiva o cantidad farmacéuticamente efectiva, para activar o mejorar la respuesta inmune del individuo. Como se utiliza aquí, "cantidad efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" es aquella cantidad que muestra una respuesta sobre y por encima de los controles de vehículo o negativos. Una "cantidad efectiva de adyuvante" es aquella cantidad del compuesto en cuestión que, cuando se administra en conjunto con un antígeno, muestra una respuesta por encima de la producida por el antígeno solo. La dosificación precisa de los compuestos de la presente invención para administrar a un paciente, dependerá del compuesto particular utilizado, la ruta de administración, la composición farmacéutica y el paciente. Por ejemplo, cuando se administra subcutáneamente para mejorar la respuesta de anticuerpo, la cantidad de compuesto utilizado es desde 1 hasta aproximadamente 250 microgramos, preferiblemente desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 microgramos, con base en la administración a un paciente adulto normal de 70 kg.

60 En otra realización, las composiciones inmunogénicas ilustrativas, por ejemplo composiciones inmunogénicas y/o de vacuna de la presente invención, comprenden ADN que codifica uno o más de los polipéptidos como se describió anteriormente, de tal manera que el polipéptido es generado in situ. Como se indicó anteriormente, el polinucleótido se puede administrar

dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de suministro conocidos por aquellos expertos en la materia. De hecho, se conocen en el arte muchas técnicas de suministro de gen tales como aquellas descritas por Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carder Systems 15:143-198, 1998, y Referencias citadas allí. Por supuesto, los sistemas de expresión de polinucleótido apropiados contendrán las secuencias reguladoras de ADN necesarias para expresión en un paciente (tal como un promotor adecuado y señal de terminación).

Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos inmunogénicos descritos aquí se introducen en células anfitrionas de mamífero adecuadas para expresión, utilizando cualquiera de un número de sistemas conocidos con base en virus. En una realización ilustrativa, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente y eficiente para sistemas de suministro de gen. Una secuencia de nucleótidos seleccionada que codifica un polipéptido de la presente invención se puede insertar en un vector y empacarse en partículas retrovirales utilizando las técnicas conocidas en el arte. El virus recombinante luego se puede aislar y suministrar a un sujeto. Se han descrito una serie de sistemas retrovirales ilustrativos (por ejemplo, véase la Patente Estadounidense No. 5,219,740; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1 :5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849- 852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Axad. Sci. USA 90:8033-8037; y Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109.

Además, también se han descrito una serie de sistemas ilustrativos con base en adenovirus. A diferencia de los retrovirus que se integran en el genoma del anfitrión, los adenovirus persisten extracromosómicamente, minimizando de esta manera los riesgos asociados con la mutagénesis insercional (Haj- Ahmad and Graham (1986) J. Virol. 57:267-274; Bett et al. (1993) J. Virol. 67:5911~5921; Mittereder et al. (1994) Human Gene Therapy 5:717-729; Seth et al. (1994) J. Virol. 68:933-940; Barr et al. (1994) Gene Therapy 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) BioTechniques 6:616-629; y Rich et al. (1993) Human Gene Therapy 4:461-476).

También se han desarrollado varios sistemas de vector de virus adeno-asociados (AAV) para el suministro de polinucleótidos. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente utilizando las técnicas conocidas en el arte. Véanse, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 5,173,414 y 5,139,941; Publicaciones Internacionales Nos. WO 92/01070 Y WO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbar Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion In Biotechnology 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Shelling and Smith (1994) Gene Therapy 1:165-169 y Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875.

Vectores virales adicionales útiles para suministrar los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la presente invención mediante transferencia de genes, incluyen aquellos derivados de la familia del poxvirus, tales como el virus de vaccinia y poxvirus de ave. A manera de ejemplo, se pueden construir recombinantes del virus vaccinia que expresan las moléculas novedosas, de la siguiente manera. En primer lugar el ADN que codifica un polipéptido se inserta en un vector apropiado de tal manera que quede adyacente a un promotor de vaccinia y secuencias de ADN de vaccinia de flaqueo, tales como la secuencia que codifica timidina quinasa (TK). Este vector luego se utiliza para transfectar células que se infectan simultáneamente con vaccinia. La recombinación homóloga sirve para insertar el promotor de vaccinia más el gen que codifica el polipéptido de interés en el genoma viral. El TK.sup.(-) recombinante resultante se puede seleccionar al cultivar las células en presencia de 5-bromodesoxiuridina y al escoger las placas virales resistentes a la misma.

Se puede utilizar convenientemente un sistema de infección/transfección con base en vaccinia para proporcionar la expresión o coexpresión inducible transitoria de uno o más de los polipéptidos descritos aquí en células anfitrionas de un organismo. En este sistema particular, las células primero se infectan in vitro con un recombinante del virus vaccinia que codifica ARN polimerasa del bacteriófago T7. Esta polimerasa exhibe especificidad exquisita ya que solamente transcribe plantillas que llevan los promotores T7. Después de infección, las células se transfectan con el polinucleótido o polinucleótidos de interés, conducidos por un promotor T7. La polimerasa, expresada en el citoplasma del recombinante del virus vaccinia, transcribe el ADN transfectado a ARN, que luego se traduce al polipéptido por la maquinaria de traducción del anfitrión. El método proporciona la producción citoplásmica transitoria de alto nivel de grandes cantidades de ARN y sus productos de traducción. Véase por ejemplo, Elroy-Stein and Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747; Fuerst et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126.

Alternativamente, también se pueden utilizar poxvirus de ave, tales como el virus de la viruela de gallina y de la viruela del canario, para suministrar secuencias de codificación de interés. Se sabe que los virus avipox recombinantes que expresan inmunógenos de patógenos de mamífero, confieren inmunidad protectora cuando se administran a especies que no son aves. El uso de un vector de Avipox es particularmente deseable en humanos y otras especies de mamíferos, puesto que los miembros del género Avipox sólo pueden replicarse productivamente en especies de ave susceptibles, y por lo tanto no son infecciosos en células de mamífero. Los métodos para producir los virus Avipox recombinantes son conocidos en la técnica y emplean recombinación genética, como se describió anteriormente con respecto a la producción de los virus vaccinia. Véase, por ejemplo, WO 91/12882; WO 89/03429 y WO 92/03545.

También se puede utilizar cualquiera de una cantidad de vectores de alfavirus para el suministro de composiciones de polinucleótido de la presente invención, tales como aquellos vectores descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 y 6,015,694. También se pueden utilizar determinados vectores de encefalitis equina de Venezuela (VEE), cuyos ejemplos ilustrativos se pueden encontrar en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,505,947 y 5,643,576.

Más aún, también se pueden utilizar vectores conjugados moleculares, tales como vectores quiméricos de adenovirus descritos en Michael et al., J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869 y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103, para suministro de gen bajo la invención.

La información ilustrativa adicional sobre estos y otros sistemas de suministro con base viral conocidos se pueden encontrar por ejemplo en Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321,1989; Flexner et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989; Flexner et al., Vaccine 8:17- 21, 1990; Patentes Estadounidenses Nos. 4,603,112, 4,769,330 y 5,017,487; WO 89/01973; Patente Estadounidense No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Roschfeld et al., Science 252:431-434,1991; Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215- 219, 1994; Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502, 1993; Guzmán et al., Circulation 88:2838-2848, 1993; y Guzman et al., Cir. Res. 73:1202-1207,1993.

En determinadas realizaciones se puede integrar un polinucleótido en el genoma de una célula objetivo. Esta integración puede estar en la localización y orientación específica a través de recombinación homóloga (reemplazo de gen), o se puede integrar en una localización aleatoria, no específica (aumento de gen). En todavía realizaciones adicionales, el polinucleótido se puede mantener establemente en la célula como un segmento episómico separado de ADN. Dichos segmentos de polinucleótido o "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y réplica independientes o en sincronización con el ciclo celular del anfitrión. La manera en la cual se suministra la construcción de expresión a una célula, y en donde permanece el polinucleótido en la célula, dependen del tipo de construcción de expresión empleada.

En otra realización de la invención, un polinucleótido se administra/suministra como un ADN "libre de histona", por ejemplo como se describe en Ulmer et al., Science 259:1745-1749, 1993, y revisado por Cohen, Science 259:1691-1692,1993. La absorción de ADN libre de histona se puede incrementar al recubrir el ADN sobre glóbulos biodegradables que son transportados de forma eficiente a las células.

En aún otra realización, una composición de la presente invención se puede suministrar por medio de un método de bombardeo de partículas, muchos de los cuales se han descrito. En un ejemplo ilustrativo, se puede lograr aceleración de partículas impulsada por gas con dispositivos tales como aquellos fabricados por Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, Reino Unido) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), algunos ejemplos de los cuales se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807 y Patente Europea No. 0500 799. Este método ofrece un método de suministro sin aguja, en donde una formulación de polvo seco de partículas microscópicas, tales como partículas de polinucleótido o polipéptido, son aceleradas a alta velocidad dentro de un chorro de gas helio generado por un dispositivo manual, que impulsa las partículas hacia el tejido objetivo de interés.

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

Dentro de determinadas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica es preferiblemente una que induce una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Altos niveles de citoquinas del tipo Th1 (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes mediadas por célula a un antígeno administrado. En contraste, altos niveles de citoquinas del tipo Th2 (por ejemplo, IL- 4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales. Después de la aplicación de una composición inmunogénica como la proporcionada aquí, un paciente soportará una respuesta inmune que incluye respuestas de tipo Th1 y Th2. Dentro de una realización preferida, en la cual una respuesta es predominantemente del tipo Th1, el nivel de las citoquinas del tipo Th1 aumentará a un mayor grado que el nivel de citoquinas de tipo Th2. los niveles de estas citoquinas se pueden determinar fácilmente utilizando ensayos estándares. Alternativamente, o adicionalmente, para determinadas aplicaciones terapéuticas pueden ser deseables altos niveles de citoquinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). Los niveles de estas citoquinas se pueden evaluar fácilmente utilizando ensayos estándares. Para una revisión de las familias de citoquinas véase Mosmann and Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173,1989.

Las composiciones ilustrativas para uso en la inducción de citoquinas de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de oligonucleótidos que contienen CpG (en el que el dinucleótido CpG no está metilado) como se describe por ejemplo en los

documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y las Patentes Estadounidenses Nos. 6,008,200 Y 5,856,462. También se describen secuencias de ADN inmunoestimulador, por ejemplo, en Sato et al., Science 273:352, 1996. Otros inmunoestimuladores adecuados comprenden saponinas tales como QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), y derivados y miméticos de saponina relacionados de los mismos.

5 Se puede incluir cualquiera de una variedad de inmunoestimuladores en las composiciones de esta invención. Por ejemplo, citoquinas tales como GM-CSF, interferones o interleuquinas, para modular más una respuesta inmune de interés. Adicionalmente, Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie de adyuvantes SBAS (por ejemplo, SBAS-2 o SBAS-4, disponibles de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), y el inmunoestimulador Enhanzyn™ (Corixa, Hamilton, MT). Los inmunoestimuladores de éter de polioxietileno se describen en el documento WO 99/52549A1, y también se pueden utilizar.

10 Las composiciones farmacéuticas de la invención frecuentemente comprenderán uno o más reguladores (por ejemplo, solución salina reguladora neutra o solución salina regulada con fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos como glicina, antioxidantes, bacteriostáticos, agentes quelantes tales como EDTA o glutationa, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio), solutos que hacen la formulación isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes. Alternativamente, las composiciones de la presente invención se pueden formular como un liofilizado.

15 Las composiciones farmacéuticas descritas aquí pueden estar presentes en contenedores de dosificación unitaria o de dosis múltiples, tales como ampollitas o frascos sellados. Dichos contenedores normalmente se sellan de tal manera que conservan la esterilidad y estabilidad de la formulación hasta que se utiliza. En general, las formulaciones se pueden almacenar como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. Alternativamente, una composición farmacéutica se puede almacenar en una condición de secado por congelamiento que requiere sólo la adición de un portador líquido estéril inmediatamente antes de uso.

20 El desarrollo de la dosificación y regímenes de tratamiento adecuados para utilizar las composiciones particulares descritas aquí, en una variedad de regímenes de tratamiento que incluyen por ejemplo administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular; son bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se discuten brevemente adelante para propósitos generales de ilustración.

25 En determinadas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden ser suministradas a través de administración oral a un animal. Como tal, estas composiciones se pueden formular con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o se pueden comprimir en comprimidos, o se pueden incorporar directamente en la comida de la dieta.

30 Los compuestos activos se pueden incorporar incluso con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares (véase por ejemplo Mathiowitz, et al., Nature 1997 Mar 27;386(6623):410-4; Hwang et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1998; 15(3):243-84; Patente Estadounidense 5,641,515; Patente Estadounidense 5,580,579 y Patente Estadounidense 5,792,451). Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener cualquiera de una variedad de componentes adicionales, por ejemplo, se puede agregar un aglutinante tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes como fosfato de dicalcio, un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina, o un agente saborizante tal como menta, aceite de gualteria o sabor de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido. Pueden estar presentes otros materiales, como recubrimientos o materiales para modificar de otra manera la forma física de la dosificación unitaria. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden recubrir con goma laca, azúcar o ambas cosas. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

35 Normalmente estas formulaciones contendrán por lo menos aproximadamente 0,1% del compuesto activo o más, aunque por supuesto el porcentaje de los ingredientes activos puede variar, y puede estar convenientemente entre aproximadamente 1% o 2% y aproximadamente 60% o 70% o más, del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de compuestos activos en cada composición terapéuticamente útil se puede preparar en tal una forma que se pueda obtener una dosificación adecuada en una dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, ruta de administración, vida útil del producto, así como también otras consideraciones farmacológicas, se contemplarán por un experto en la técnica de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas, y como tal, puede ser deseable una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

5 Para administración oral las composiciones de la presente invención se pueden incorporar alternativamente en uno o más excipientes en la forma de un enjuague bucal, dentífrico, comprimido bucal, aerosol oral, o formulación sublingual administrada oralmente. Alternativamente, el ingrediente activo se puede incorporar en una solución oral, tal como una que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o dispersar en un dentífrico, o agregarse en una cantidad terapéuticamente efectiva a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes saborizantes, agentes espumantes y humectantes. Alternativamente, las composiciones se pueden modelar en forma de un comprimido o solución que se puede colocar bajo la lengua o se puede disolver de otra manera en la boca.

10 En determinadas circunstancias será deseable suministrar las composiciones farmacéuticas descritas aquí por vía parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal. Dichos métodos son bien conocidos por el técnico experto, algunos de los cuales se describen adicionalmente, por ejemplo, en la Patente Estadounidense 5,543,158; la Patente Estadounidense 5,641,515, y la Patente Estadounidense 5,399,363. En algunas realizaciones se pueden preparar soluciones de los compuestos activos como base libre o como sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas convenientemente con un surfactante tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilén glicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones comunes de almacenamiento y uso, estas preparaciones generalmente contendrán un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

15 Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (véase por ejemplo Patente Estadounidense 5,466,468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida a tal grado que exista una fácil capacidad de inyección con jeringa. Debe ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser conservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene por ejemplo agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilén glicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión, y/o mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede facilitar por medio de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir utilizando en las composiciones agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

20 En una realización, para administración parenteral en una solución acuosa, la solución debe ser adecuadamente reguladora si fuera necesario, y el diluyente líquido primero se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, se puede emplear un medio acuoso estéril que será conocido por aquellos expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación se puede disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y agregarse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia, o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15a edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente ocurrirán algunas variaciones de la dosificación dependiendo de la condición del sujeto a ser tratado. Más aún, para administración humana, por supuesto, las preparaciones deberán cumplir preferiblemente con los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad general y pureza como lo requiere la Oficina de estándares biológicos de la FDA.

25 En otra realización de la invención, las composiciones descritas aquí se pueden formular en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína), que se forman con ácidos inorgánicos tales como por ejemplo ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. También se pueden derivar sales formadas con grupos carboxilo libres de bases inorgánicas tales como por ejemplo hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, metilamina, histidina, procaína y similares. Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en cantidades terapéuticamente efectivas.

30 En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden suministrar por medio de aerosoles intranasales, inhalación u otros vehículos de suministro en aerosol. Se han descrito métodos para suministrar genes, ácidos nucleicos y composiciones de péptidos directamente a los pulmones a través de atomizaciones de aerosol nasales, por ejemplo, en la Patente Estadounidense 5,756,353 y Patente Estadounidense 5,804,212. Del mismo modo, también es muy conocido en la práctica farmacéutica el suministro de fármacos utilizando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga et al., J Controlled Release 1998 Mar 2;52(1-2):81-7) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente Estadounidense 5,725,871). Del mismo modo, se describe un suministro de fármaco transmucosa ilustrativo en la forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno en la Patente Estadounidense 5,780,045.

En determinadas realizaciones se utilizan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas de lípido, vesículas y similares para la introducción de las composiciones de la presente invención en células/organismos anfitriones adecuados. En particular, las composiciones de la presente invención se pueden formular para suministro ya sea encapsuladas en una partícula de lípidos, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. Alternativamente, las composiciones de la presente invención se pueden unir, ya sea covalentemente o no covalentemente, a la superficie de dichos vehículos portadores.

La formación y uso de liposoma y de preparaciones similares a liposoma como portadores potenciales de fármacos generalmente se conocen por aquellos expertos en la técnica (véase por ejemplo, Lasic, Trends Biotechnol 1998 Jul;16(7):307-21; Takakura, Nippon Rinsho 1998 Mar;56(3):691-5; Chandran et al., Indian J Exp Biol. 1997 Aug;35(8):801-9; Margalit, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995;12(2-3):233-61; Patente Estadounidense 5,567,434; Patente Estadounidense 5,552,157; Patente Estadounidense 5,565,213; Patente Estadounidense 5,738,868 y Patente Estadounidense 5,795,587).

Los liposomas se han utilizado exitosamente con varios tipos de células que normalmente son difíciles transfectar mediante otros procedimientos, que incluyen suspensiones de células T, cultivos de hepatocito primario y células PC 12 (Renneisen et al., J Biol. Chem. 1990 Sep 25; 265(27):16337-42; Muller et al., DNA Cell Biol. 1990 Abr; 9(3):221- 9). Además, los liposomas están libres de las restricciones de longitud de ADN que son típicas de los sistemas de suministro con base en virus. Los liposomas se han utilizado eficientemente para introducir genes, varios fármacos, agentes radioterapéuticos, enzimas, virus, factores de transcripción, efectores alostéricos y similares, en una variedad de estirpes celulares cultivadas y en animales. Adicionalmente, el uso de liposomas no parece estar asociado con respuestas autoinmunes ni toxicidad inaceptable después del suministro sistémico.

En determinadas realizaciones se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapa concéntricas multilaminares (también denominadas vesículas multilaminares (MLVs)).

Alternativamente, en otras realizaciones, la invención proporciona formulaciones de nanocápsula farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente invención. Generalmente las nanocápsulas pueden atrapar los compuestos de una manera estable y reproducible (véase por ejemplo, Quintanar-Guerrero et al., Drug Dev Ind Pharm. 1998 Dec;24(12):1113-28). Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de tamaño de alrededor de 0,1  $\mu\text{m}$ ) se pueden diseñar utilizando polímeros capaces de ser degradados in vivo. Dichas partículas se pueden hacer como se describe por ejemplo en Couvreur et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988; 5(1): 1-20; zur Muhlen et al., Eur J Pharm Biopharm. 1998 Mar;45 (2): 149-55; Zambaux et al. J Controlled Release. 1998 Jan 2;50(1-3):31-40; y Patente Estadounidense 5,145,684.

#### Terapias para el cáncer

Los métodos inmunológicos para la terapia del cáncer se basan en el reconocimiento de que las células de cáncer frecuentemente pueden evadir las defensas del cuerpo contra las células y moléculas aberrantes o extrañas, y que estas defensas pueden ser estimuladas terapéuticamente para recuperar el campo perdido; por ejemplo, las páginas 623-648 en Klein, Immunology (Wiley-Interscience, New York, 1982). Muchas observaciones recientes de que varios efectores inmunes pueden inhibir directa o indirectamente el crecimiento de tumores ha conducido a un renovado interés en este método para la terapia del cáncer, por ejemplo véase, Jager et al., Oncology 2001;60(1): 1-7; Renner et al., Ann Hematol, 2000 Dec; 79(12)651-9.

Los cuatro tipos de células básicas cuya función se ha asociado con la inmunidad celular antitumoral y la eliminación de células de tumor del cuerpo son: i) linfocitos B, que secretan inmunoglobulinas en el plasma sanguíneo para identificar y marcar las células invasoras no propias; ii) monocitos, que secretan las proteínas de complemento que son responsables de provocar lisis y procesar las células invasoras objetivo recubiertas con inmunoglobulina; iii) linfocitos asesinos naturales que tienen dos mecanismos para la destrucción de células de tumor, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y destrucción natural; y iv) linfocitos T, que poseen receptores específicos de antígeno y tienen la capacidad de reconocer una célula de tumor que lleva moléculas marcadoras complementarias (Schreiber, H., 1989, en Fundamental Immunology, W. E. Paul (ed), p. 923-955).

La inmunoterapia del cáncer en general se enfoca en inducir respuestas inmunes humorales, respuestas inmunes celulares, o ambas. Más aún, está bien establecido que es necesaria la inducción de células ayudadoras T CD4<sup>+</sup> para inducir secundariamente anticuerpos o células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> T Los antígenos de polipéptido que son selectivos o idealmente específicos para células de cáncer ofrecen un método poderoso para inducir respuestas inmunes contra el cáncer, y son un aspecto importante de la presente invención.

5 Por lo tanto, en aspectos adicionales de la presente invención, las composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden utilizar para estimular una respuesta inmune contra el cáncer. Dentro de dichos métodos, las composiciones farmacéuticas descritas aquí se administran a un paciente, normalmente un animal de sangre caliente, preferiblemente un humano. Un paciente puede o no estar afectado con cáncer. Las composiciones farmacéuticas y las vacunas se pueden administrar antes o después de la eliminación quirúrgica de tumores primarios y/o de un tratamiento tal como la administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales. Como se discutió anteriormente, la administración de las composiciones farmacéuticas puede ser por medio de cualquier método adecuado, que incluye la administración mediante rutas intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica, anal, vaginal, tópica y otras.

10 Dentro de determinadas realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia activa, en la cual el tratamiento se basa en la estimulación in vivo del sistema inmune endógeno del anfitrión para que reaccione contra tumores con la administración de agentes que modifican respuesta inmunes (tales como los polipéptidos y polinucleótidos que se proporcionan aquí).

15 Las rutas y frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas descritas aquí, así como también la dosificación, varían de individuo a individuo, y pueden ser establecidas fácilmente utilizando técnicas estándares. En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas se pueden administrar por medio de inyección (por ejemplo, intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), intranasalmente (por ejemplo, por medio de aspiración) u oralmente. Preferiblemente se pueden administrar entre 1 y 10 dosis durante un período de 52 semanas. Preferiblemente se administran 6 dosis a intervalos de 1 mes, y después se pueden dar vacunaciones de refuerzo periódicamente. En pacientes individuales pueden ser apropiados protocolos alternativos. Una dosis adecuada es una cantidad de compuesto que, cuando se administra como se describió anteriormente, es capaz de promover una respuesta inmune antitumoral, y es por lo menos 10-50% superior al nivel basal (es decir, sin tratamiento). Dicha respuesta se puede monitorear al medir los anticuerpos antitumorales en un paciente, o mediante generación dependiente de vacuna de células efectoras citolíticas capaces de destruir las células de tumor del paciente in vitro. Dichas vacunas también serían capaces de provocar una respuesta inmune que conduce a un resultado clínico mejorado (por ejemplo remisiones más frecuentes, supervivencia completa o parcial o más prolongada sin la enfermedad) en los pacientes vacunados en comparación con los pacientes no vacunados. En general, para las composiciones farmacéuticas y las vacunas que comprenden uno o más polipéptidos, la cantidad de cada polipéptido presente en una dosis varía de aproximadamente 25 µg a 5 mg por kg de peso del anfitrión. Los tamaños de dosis adecuados varían con la talla del paciente, pero normalmente estarán en el rango de aproximadamente 0,1 mL a 30 aproximadamente 5 mL.

35 En general, una dosificación y régimen de tratamiento apropiados proporcionan el compuesto activo en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Dicha respuesta se puede monitorear al establecer un resultado clínico mejorado (por ejemplo remisiones más frecuentes, supervivencia completa o parcial o prolongada sin la enfermedad) en pacientes tratados en comparación con pacientes no tratados. Los aumentos de la respuesta inmune preexistente a una proteína de tumor se correlacionan de manera general con un resultado clínico mejorado. Dichas respuestas inmunes en general se pueden evaluar utilizando proliferación estándar, citotoxicidad, o ensayos de citoquina, que se pueden realizar utilizando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

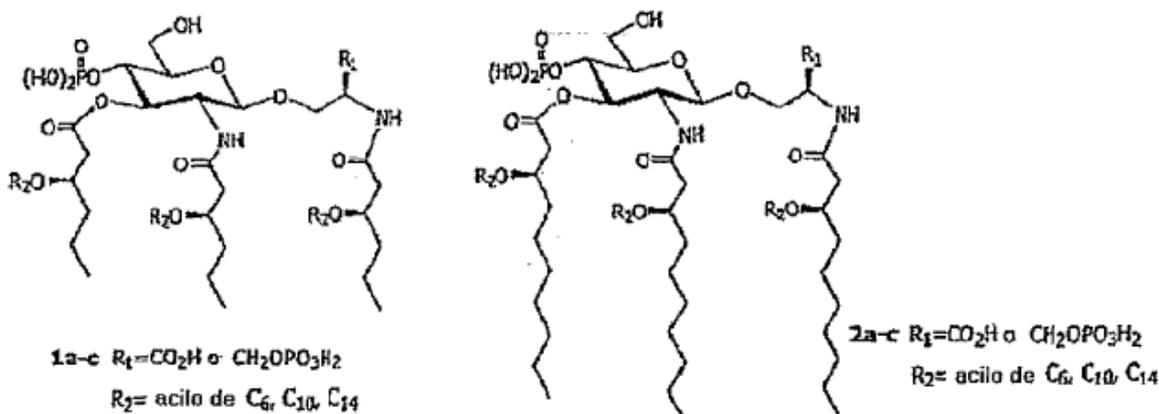
40 La presente invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes Ejemplos y Ejemplos de Prueba que se dan solo con propósitos ilustrativos.

#### EJEMPLOS

45 Ejemplo 1

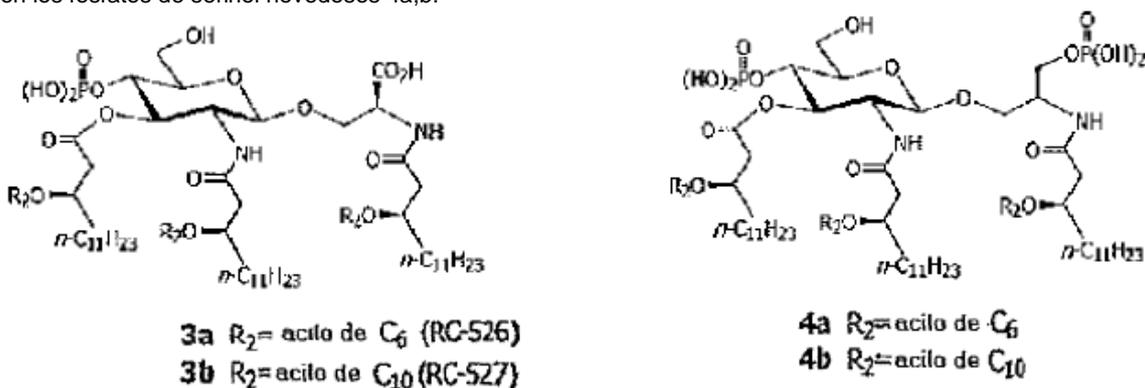
Modificaciones de cadena de acilo graso primario

50 Este ejemplo describe la preparación de derivados de ácido graso primarios que tienen cadenas de acilo graso primario de longitud variable, solas o en combinación con cadenas variables de ácido graso secundario. Por ejemplo, los compuestos 1 a-c y 2a-c, en los cuales se combinan ácidos grasos primarios de cadena corta (C<sub>6</sub>) y media (C<sub>10</sub>), con ácidos grasos secundarios de cadena corta, media o larga.



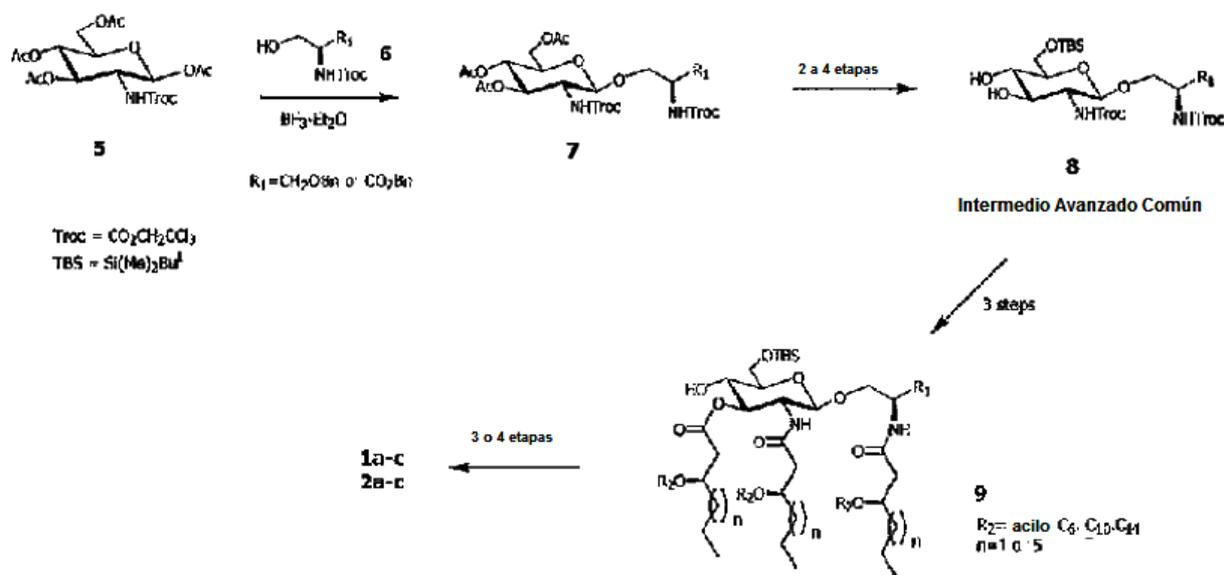
NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

5 Estos compuestos se preparan ya sea utilizando el aglicón de serina bien establecido ( $R_1 = \text{CO}_2\text{H}$ ) o, alternativamente, utilizando una unidad de aglicón de fosfato de serinol químicamente más estable e ionizable ( $R_1 = \text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$ ). La selección de fosfato de serilo/serinol se basará en la comparación de las actividades biológicas de los derivados de serilo conocidos 3a, b, con los fosfatos de serinol novedosos 4a, b.



NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

10 Los compuestos derivados modificados de cadena primaria se sintetizan por medio de una modificación de un método previamente descrito (B1 en Johnson et al., Patente Estadounidense No. 6,355,251) que emplea un intermedio avanzado común que permite la introducción de ácidos aciloxienlazados por amida y éster cerca del final de la síntesis (Esquema I).  
 15 La etapa inicial de la síntesis es la glicosilación del receptor 6 con el tetraacetato 5 conocido (preparado en 4 etapas a partir de glucosamina), para dar el  $\beta$ - glicósido 7, y la conversión de 7 en el intermedio avanzado común (CAI) 8, que está optimizado para  $R_1 = \text{CO}_2\text{Bn}$ . La 4-O-acilación selectiva y N-desprotección/ acilación resulta en el derivado hexaacilo 9, que se convierte en 3 a 4 etapas a 1 a-c o 2a-c a través de fosforilación y desbloqueo.



Esquema I

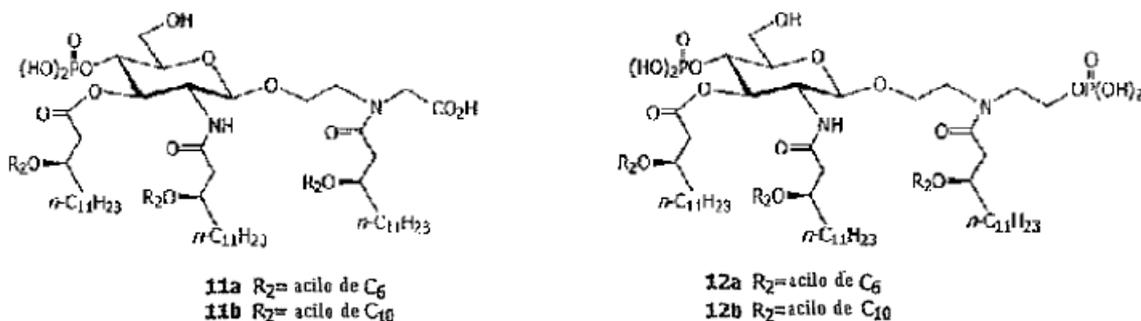
NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

5 Los ácidos (R)-3-n-alcanoilalcanoicos requeridos se preparan de acuerdo con Keegan et al., Tetrahedron: Asymmetry; 7(12):3559-3564, 1996, empezando con los ésteres 3-oxo metílicos apropiados. Se obtiene una pureza química y diastereomérica alta de los productos 1 y 2, ya sea por cromatografía en fase normal sobre gel de sílice, o alternativamente por medio de cromatografía de celulosa o cromatografía de partición líquido-líquido sobre gel Sephadex LH-20. La pureza de las sales de trietilamonio aisladas se establece por medios espectroscópicos (IR, y RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y físicos (análisis de combustión, FAB-MS), así como también mediante HPLC.

Ejemplo 2

Compuestos de Glicilo y Fosfonooxietilo (PE)

15 Este ejemplo describe la síntesis de los compuestos de glicilo 11a, b y compuestos de fosfonooxietilo (PE) 12a, b, que son casi regioisómeros de 3a, b y 4a, b.



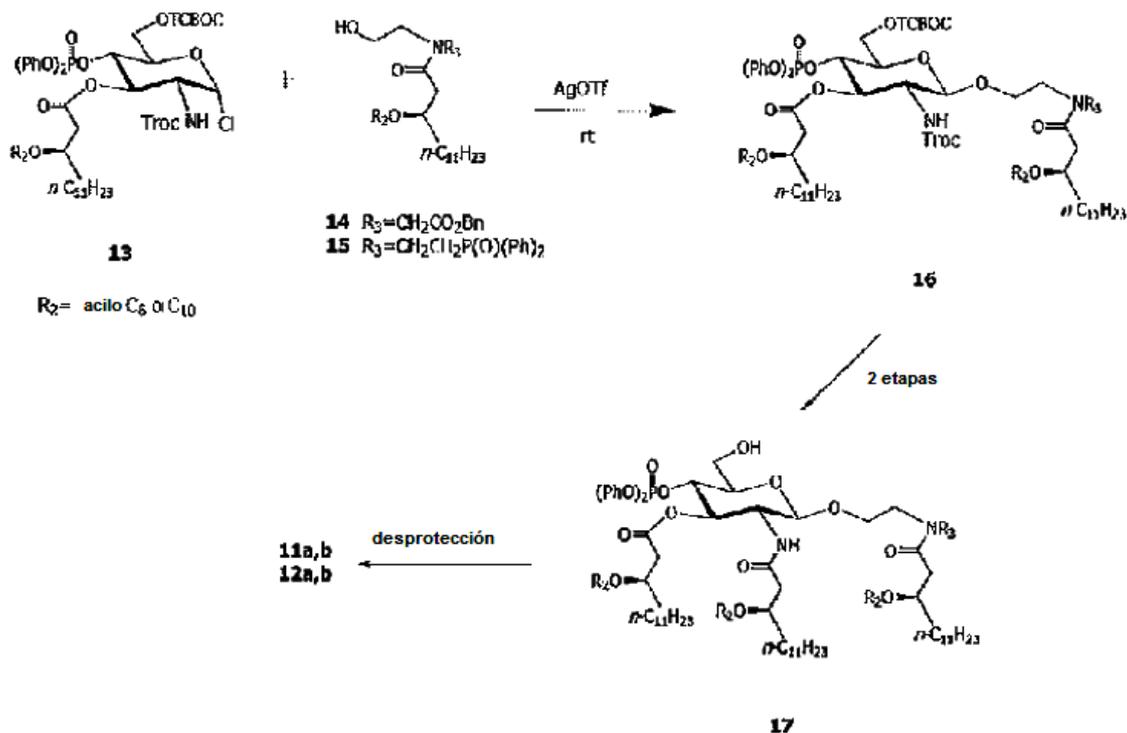
20

NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

25 Estos compuestos se preparan más fácilmente mediante una síntesis más convergente que aquella descrita en el Esquema 1, en donde un donador de glicosilo  $C_6$  o  $C_{10}$  común se acopla con una unidad receptora N-acilada apropiada (o alternativamente, N-Troc protegida -no mostrada), 14 o 15, en presencia del ión plata, para dar los  $\beta$ -glicósidos 16 (Esquema II). El aceptor de glicina 14 se prepara de acuerdo con Bulusu et al., J. Med. Chem; 35(19):3463-3469, 1992, a partir de etanolamina y bromoacetato de bencilo (o t-butilo), seguido por N-acilación o protección. El fosfato 15 se prepara

mediante monofosforilación de dietanolamina N-acilata (o protegida). Se espera que la N-desprotección/acilación, o N,N-diacilación en el caso del aglicón Troc-prottegido (Jiang et al., Tetrahedron; 58(43):8833-8842, 2002) de los β-glicósidos 16, y división del fenilo y otros grupos protectores del derivado hexaacilado resultante 17, de los compuestos deseados 11 a, b y 12a, b, que se aíslan y caracterizan como sus sales de trietilamonio después de purificación cromatográfica sobre sílice o gel LH-20 o celulosa DEAE.

Se muestra adelante el Esquema II:



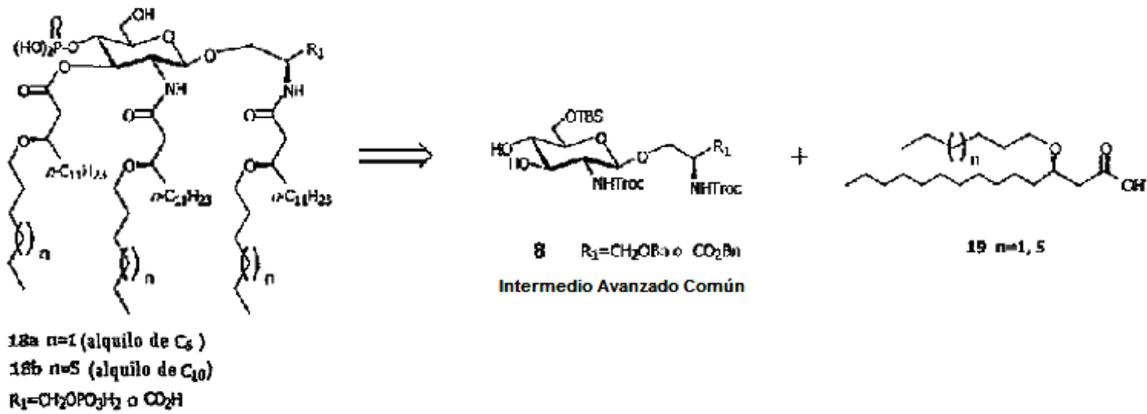
Esquema II

NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

Ejemplo 3

Éter-Lípidos Secundarios

Este ejemplo describe la síntesis de derivados de ácido (R)-3- alquioxitetradecanoico (18a, b) que son resistentes al metabolismo desfavorable y/o hidrólisis acuosa. Para sintetizar los compuestos 18a, b, se deben preparar inicialmente los análogos de éter-lípido de los ácidos grasos secundarios presentes en los compuestos 3a, b o los fosfatos de serinol 4a, b correspondientes. Como se muestra retrosintéticamente en el esquema III, la síntesis de las moléculas objetivo 18a, b se puede lograr al sustituir el ácido (R)-3-hexiloxitetradecanoico o el ácido (R)-3- deciloxitetradecanoico los aciloxiácidos para los aciloxiácidos correspondientes empezando con la 3-O-acilación selectiva del intermedio avanzado común 8 en el Esquema I, y procediendo a través del intermedio 9 ( $R_2 = \text{alquilo } C_6 \text{ o } C_{10}, n=9$ ). Los alquiloácidos 19 requeridos se sintetizan a partir de ácido (R)-3-hidroxitetradecanoico, o su éster de fenacilo, intermedios, en la síntesis de aciloxiácido, con >50% de rendimiento general mediante métodos conocidos (Keegan et al., Tetrahedron: Asymmetry, 7(12):3559-3564, 1996, Watanabe et al., Carbohydr Res; 332(3):257-277, 2001, Jiang, Bioorg Med Chem Lett; 12(16):2193-2196,2002, Christ et al., Patente Estadounidense No. 5,530,113, 1996).



Esquema III

NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

5

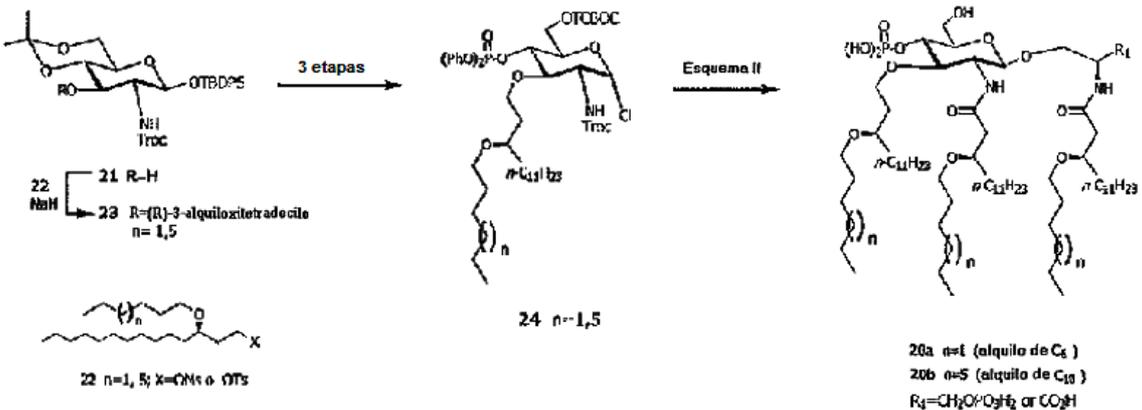
Ejemplo 4

Éter-lípidos primarios y secundarios

10

Este ejemplo describe compuestos (20a, b) que contienen un éter-lípido primario en la posición C-3 del azúcar, así como también tres éter lípidos secundarios. Estos compuestos se sintetizan mediante alquilación del acetónido 21, un intermedio en la síntesis del donador de glicosilo 13 (Esquema II) con sulfonato 22, que a su vez es generado en una etapa a partir del precursor de alcohol 19, para dar el diéter 23 (esquema IV). La 4,6-funcionalización y la activación anomérica proporcionan cloruro de glicosilo 24, que luego se procesa como en el Esquema II utilizando los alquiloxiácidos correspondientes en las etapas de N-acilación. En un esquema alternativo, se puede emplear el derivado 2-azido<sup>42</sup> o 2-trifluoroacetamido<sup>45</sup> en la etapa de 3- O-alquilación.

15



20

Esquema IV

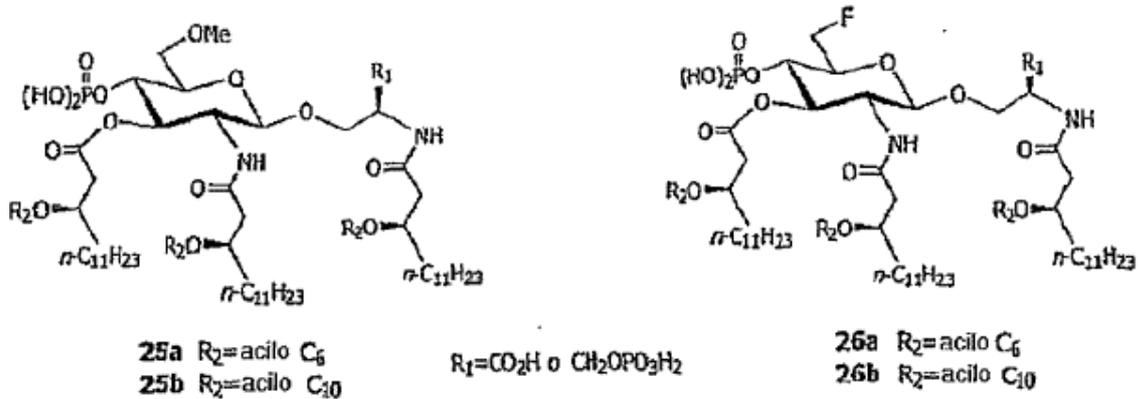
NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

Ejemplo 5

25

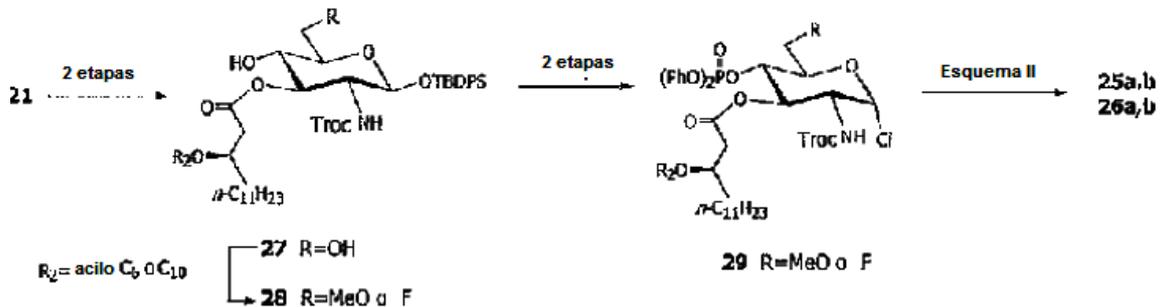
Compuestos modificados en C-6

Este ejemplo describe los compuestos que tienen un 6-hidroxilo bloqueado o un 6-sustituyente como flúor en. En este ejemplo se utiliza un grupo de éter metílico o flúor en conjunto con compuestos de fosfato de serilo o serinol 25a, b y 26a, b.



NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

- 5 Los compuestos se preparan a partir del diol 27 como se muestra en el esquema V. El intermedio 27, obtenido en dos etapas a partir del acetónido 21, es funcionalizado en la posición 6 mediante métodos conocidos (Christ et al., Patente Estadounidense No. 5,530,113, 1996; Watanabe et al., Carbohydr Res; 333(3):203-231, 2001), para dar el alcohol 28. La conversión de 28 a los cloruros 29 en dos etapas y la elaboración de acuerdo con el Esquema II proporciona moléculas objetivo 25a,b y 26a, b. Los compuestos con enlaces de éter primario y/o secundario descritos anteriormente en el Ejemplo 4, se pueden modificar como se describe en este ejemplo para proteger adicionalmente las moléculas contra la degradación química y enzimática.
- 10



- 15 Esquema V

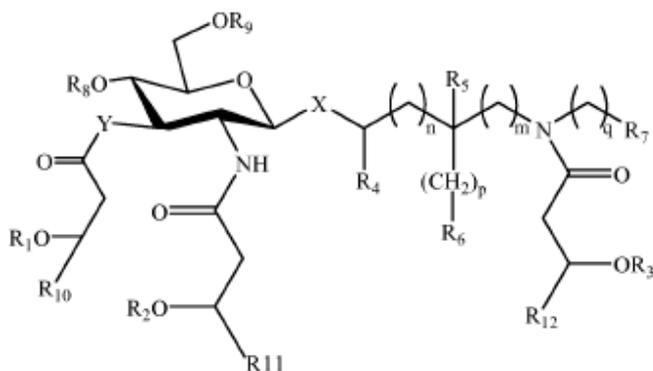
NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

- Se entiende que los ejemplos anteriores son únicamente ilustrativos de la presente invención. Se pueden hacer determinadas modificaciones de las composiciones y/o métodos empleados y aún lograr los objetivos de la invención. Dichas modificaciones se contemplan dentro del alcance de la invención reivindicada.
- 20

## Reivindicaciones

1. Un compuesto que tiene la fórmula (III)

5



(III)

en donde X se selecciona del grupo que consiste en O y S, en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona del grupo que  
 10 consiste de O y NH; n, m, p y q son enteros de 0 a 6; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y son grupos alquilo de cadena  
 recta no sustituidos que tienen de 6 a 14 átomos de carbono, y en donde uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> es opcionalmente hidrógeno;  
 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H y metilo; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son iguales o diferentes y se  
 15 seleccionan del grupo que consiste en H, hidroxilo, alcoxi, fosfona, fosfonoxi, sulfona, sulfoxi, amino, mercapto, ciano, nitro,  
 formilo y carboxi, y ésteres y amidas de los mismos; R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que  
 consiste en fosfona y H, y por lo menos uno de R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> es fosfona; R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> se seleccionan independientemente de  
 grupos alifáticos saturados no sustituidos, de cadena recta, que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

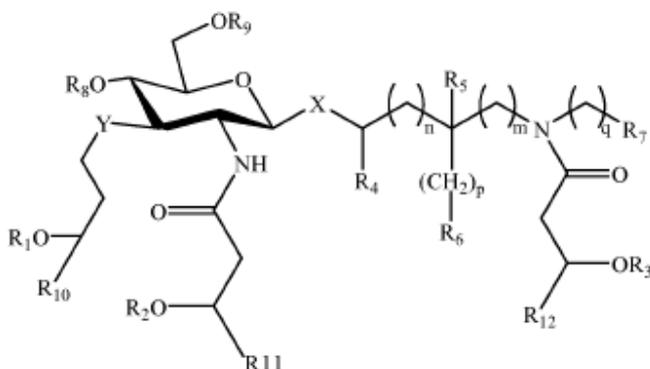
dado que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> son grupos alquilo de cadena recta C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> no sustituidos o una sal farmacéuticamente aceptable de  
 los mismos.

20 2. Una composición farmacéutica de la materia que comprende:

(a) una cantidad efectiva de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del  
 mismo; y

25 (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

3. Un compuesto que tiene la fórmula (IV)



(IV)

30

en donde X se selecciona del grupo que consiste en O y S, en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona del grupo que  
 consiste de O y NH; n, m, p y q son enteros de 0 a 6; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y son grupos alquilo de cadena

5 recta no sustituidos que tienen de 6 a 14 átomos de carbono, y en donde uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> es opcionalmente hidrógeno; R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H y metilo; R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H, hidroxilo, alcoxi, fosfona, fosfonoxi, sulfona, sulfoxi, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxi, y ésteres y amidas de los mismos; R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en fosfona y H, y por lo menos uno de R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> es fosfona; R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> se seleccionan independientemente de grupos alifáticos saturados no sustituidos, de cadena recta, que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

10 dado que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> son grupos alquilo de cadena recta C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> no sustituidos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

10 4. Una composición farmacéutica de la materia que comprende:

15 (a) una cantidad efectiva de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

15 (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

5. Un compuesto o composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde X y Y son oxígeno.

20 6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4, adecuada para administración por vía mucosa.

7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4, adecuada para administración intranasal.

25 8. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4, que comprende adicionalmente un antígeno, y que comprende una cantidad adyuvante efectiva de dicho compuesto o sal del mismo.

30 9. Un compuesto o composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en mejorar la respuesta inmune de un sujeto dicho uso comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de dicho compuesto o composición.

30 10. Un compuesto o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9 en donde dicho uso comprende adicionalmente administrar un antígeno exógeno a dicho sujeto

35 11. Un compuesto o composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en un método para aliviar o prevenir sustancialmente una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune, o una afección alérgica en un sujeto, dicho uso comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de dicho compuesto o composición.