

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 970**

51 Int. Cl.:

**C07H 15/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2004 E 04700403 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 1589934**

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

30 Prioridad:

**06.01.2003 US 438585 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.01.2016**

73 Titular/es:

**CORIXA CORPORATION (100.0%)  
Corporation Service Company, 2711 Centerville  
Road, Suite 400  
Wilmington, DE 19808, US**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, DAVID A.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 556 970 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

Ciertos compuestos de fosfato de aminoalquil glucosaminida y sus usos

## 5 Referencias cruzadas a aplicaciones relacionadas

Esta aplicación reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos 60/438,585 presentada el 6 de enero de 2003.

## 10 Antecedentes de la invención

Los receptores tipo Toll (TLR), han sido relacionados con la potente respuesta inmune innata y reconocen los diversos componentes estructurales que son únicos a los patógenos; esta interacción lleva al sistema inmune a un estado activado, con consecuencias a corto y a largo plazo. Existe interés significativo en desarrollar agonistas y antagonistas de TLRs ya que la manipulación farmacológica de las respuestas inmunes innatas puede llevar a vacunas más efectivas y a novedosas metodologías terapéuticas para enfermedades autoinmunes, atópicas, malignas e infecciosas. El primer producto microbiano que se descubrió ser un agonista receptor tipo Toll fue LPS, un componente de la membrana bacteriana específico de las bacterias gram-negativas, que activa el receptor tipo Toll 4 (TLR-4). Aunque el LPS es un potente agente inmunomodulador, su uso medicinal es limitado debido a su extrema toxicidad, incluyendo la inducción del síndrome de respuesta sistémica antiinflamatoria. La fracción subestructural endotóxica biológicamente activa de LPS es un lípido A, una glucosamina disacárido, ácido graso acilado de forma múltiple, fosforilado, que sirve para anclar toda la estructura en la membrana externa de la bacteria gram-negativa. Los efectos tóxicos del lípido A pueden ser mejorados por modificación química selectiva del lípido A para producir compuestos monofosforilados del lípido A (MPL<sup>TM</sup> inmunoestimulante; Corixa Corporation; Seattle, WA). Los métodos para hacer y usar compuestos inmunoestimulantes y estructuralmente similares a MPL<sup>TM</sup> en adyuvantes de vacunas y otras aplicaciones han sido descritos (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. 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 and Myers, en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach; Powell and Newman, Eds.; Plenum: New York, 495-524, 1995). En particular, estas y otras referencias han demostrado que inmunoestimulantes de MPL<sup>TM</sup> y compuestos relacionados tenían actividades adyuvantes significativas cuando son usados en formulaciones de vacunas con antígenos de proteína y carbohidratos para mejorar la inmunidad humoral y/o mediada por células a los antígenos e interactuar con receptores tipo Toll.

Extrayendo de la experiencia con inmunoestimulantes MPL<sup>TM</sup> y otros componentes de la pared celular, se desarrolló una familia de compuestos sintéticos novedosos, los fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGPs). Los compuestos AGP también interactúan con TLR-4, como agonistas y antagonistas. Los AGPs incluyen tanto compuestos acíclicos como compuestos cíclicos (Patentes de EE.UU. Nos. 6,113,918 y 6,303,347, WO 98/50399 publicada el Octubre 12 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 inmunoestimulante MPL<sup>TM</sup>, se ha demostrado que estos compuestos retienen características adyuvantes significativas cuando son formulados con antígenos en las composiciones de vacunas y, adicionalmente, tienen perfiles similares o mejorados de toxicidad cuando son comparados con inmunoestimulantes de MPL<sup>TM</sup>. Los AGPs también demuestran actividad adyuvante en la mucosa y son efectivos en la ausencia de un antígeno, haciéndolos compuestos atractivos para el uso profiláctico y/o terapéutico.

Otra ventaja significativa ofrecida por los AGPs sobre el inmunoestimulante MPL<sup>TM</sup> y similares es que los AGPs son fácilmente producibles en una escala comercial por medios sintéticos. Ya que son producidos sintéticamente los AGPs son libres de contaminantes traza biológicos encontrados en MPL. Como tal los AGPs tendrían una ventaja sobre los MPL como adyuvantes de vacunas en ciertas circunstancias, tales como en protocolos de inmunización pediátricos donde la pirogenicidad del adyuvante debe ser minimizada. Sin embargo, puesto que los AGPs son sintetizados químicamente, una estabilidad del compuesto menos que óptima puede llevar a la acumulación de productos de degradación que pueden resultar en actividad y estabilidad biológica variable de un lote a otro lote. Desde el punto de vista del proceso de desarrollo de GMP para la fabricación de materiales para pruebas clínicas humanas, la estabilidad del lote y variabilidad de un lote a otro lote son problemas mayores. Por lo tanto, son deseados los compuestos que tienen una actividad biológica aumentada en comparación con el inmunoestimulante MPL<sup>TM</sup> y similares, que interactúan con receptores tipo Toll y/o son optimizados para síntesis de GPL a gran escala. La presente invención aborda estas necesidades y más al proveer compuestos modificados para mejorar la actividad y estabilidad biológica, con una resistencia aumentada a la degradación enzimática y química, y/o perfiles de seguridad mejorados.

## 60 Resumen de la invención

En un aspecto de la invención, esta invención comprende ciertos compuestos de fosfato de aminoalquil glucosaminida, como se definen aquí, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

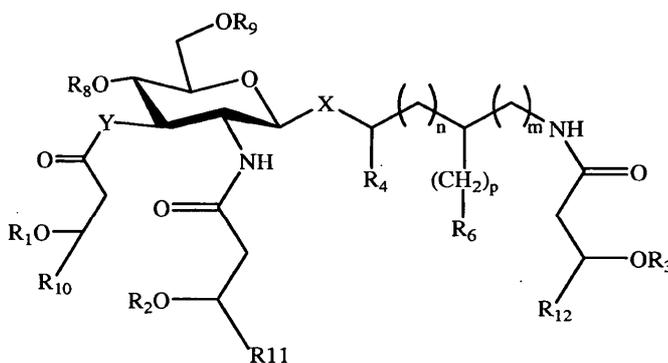
## 65 Descripción detallada de la invención

Los compuestos de la invención son miembros de la familia de 4-fosfato de aminoalquil glucosaminida (AGP). Como se describe, abajo, los compuestos de la invención poseen de forma variable modificaciones para las longitudes de las seis cadenas acilo (primario y secundario), modificaciones estructurales del brazo alquilo para incluir una fracción de fosfato, la modificación estructural para incluir un lípido de éter primario en la posición C-3 de azúcar como también tres lípidos de éter secundarios, y/o un grupo bloqueador 6-hidroxilo.

Conocidos químicamente como  $\omega$ -aminoalquil 2-amino-2-desoxi-4-fosfono- $\beta$ -D-glucopiranosidos las AGPs son una clase de lípidos A miméticos sintéticos que son estructuralmente relacionados al componente activo biológico mayor del componente en el lípido A monofosforilo. En las AGPs el azúcar reductor ha sido remplazado con una unidad N-[(R)-3-n-alcanoiloxitetradecanoil] aglucona de aminoalquilo. Como otros derivados de lípido A disacárido, las AGPs comprenden seis ácidos grasos para la actividad biológica máxima, pero a diferencia de los derivados de disacáridos, las AGPs contienen una unidad de aglucona  $\beta$  enlazada conformacionalmente flexible que permite el empaque apretado energéticamente favorable de las seis cadenas de acilos grasos. El empaque apretado de seis ácidos grasos en un despliegue hexagonal se cree que juega un papel esencial en la bioactividad de moléculas tipo lípido A (Seydel et al., Immunobiol; 187(3-5):191-211, 1993).

Los compuestos de la presente invención son considerados miembros de la familia AGP. Estos compuestos incluyen modificaciones a las longitudes de las seis cadenas de acilos (primaria y secundaria).

Se revela un compuesto que tiene la fórmula (III):

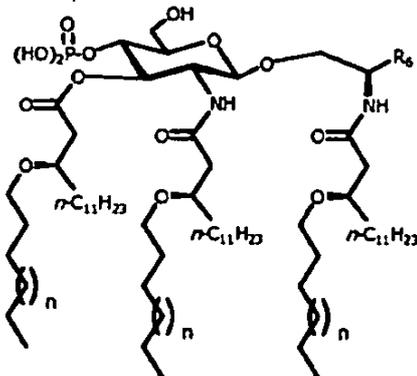


(III)

donde X es seleccionado del grupo que consiste de O y S en la posición axial o ecuatorial; Y es seleccionado del grupo que consiste de O y NH; n y m son 0; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y son grupos alquilo de cadena recta que tienen desde 1 a 20 átomos de carbono y donde uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> es opcionalmente hidrógeno; R<sub>4</sub> es seleccionado del grupo que consiste de H y metilo; p es 1 y R<sub>6</sub> es COOH o p es 2 y R<sub>6</sub> es OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>; R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son iguales o diferentes y son seleccionados del grupo que consiste de fosfeno y H, y por lo menos uno de R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> es fosfeno; y R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> son independientemente seleccionados de grupos alifáticos saturados no sustituidos de cadena recta que tienen desde 1 a 11 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención provee un compuesto que tiene la fórmula:



donde n es 1 o 5 y R<sub>6</sub> es COOH o CH<sub>2</sub>OP<sub>3</sub>H<sub>2</sub>.



- 5 mismo, que puede ser completamente saturado, mono o poliinsaturado y puede incluir radicales di y multivalentes, teniendo el número de átomos de carbono designado (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> significa uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales de hidrocarburos saturados incluyen grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexilo)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-
- 10 pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alifático no saturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Ejemplos de grupos alifáticos no saturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros más altos. Típicamente, un grupo alifático tendrá desde 1 a 24 átomos de carbono. Un grupo "alifático más bajo" es un grupo alifático de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono.
- 15 El término "acilo" se refiere al grupo derivado de un ácido orgánico por la eliminación del grupo hidroxilo. Ejemplos de grupos acilo incluyen acetilo, propionilo, dodecanoilo, tetradecanoilo, isobutirilo, y similares. Por lo tanto, se entiende que el término "acilo" como se usa aquí incluye alifático saturado.
- 20 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se pretende que incluya sales de los compuestos activos las cuales son preparadas con ácidos y bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos aquí descritos. Cuando compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, pueden obtenerse sales de adición básica, poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, pudiendo ser pura o en un solvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición básica farmacéuticamente aceptables incluyen sodio, potasio, calcio, amoniaco, amina orgánica, o sal de magnesio, o una sal similar. Cuando compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición ácida poniendo en contacto la forma neutral de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, tanto puro o en un solvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos
- 25 inorgánicos como clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o ácidos fosforosos y similares, como también las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También están incluidas sales de aminoácidos tales como alginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácido glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al, "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19, 1977). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades básicas y ácidas que permiten que los compuestos sean convertidos a sales de adición básica o ácida.
- 30 Las formas neutras de los compuestos pueden ser regeneradas poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto original en la forma convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sales en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en solventes polares, pero de otra manera las sales son equivalentes a la forma original del compuesto para los propósitos de la presente invención.
- 35 Además de formas salinas, la presente invención provee compuestos que están en una forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos aquí son aquellos compuestos que fácilmente experimentan cambios químicos bajo condiciones fisiológicas para proveer los compuestos de la presente invención. Adicionalmente los profármacos pueden ser convertidos a los compuestos de la presente invención por métodos químicos o bioquímicos en un ambiente ex vivo. Por ejemplo, los profármacos pueden ser lentamente convertidos a los compuestos de la presente invención cuando son colocados en el depósito de un parche transdérmico con una enzima o un reactivo químico adecuado.
- 40 Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas como también en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a formas no solvatadas y se pretende que sean incluidas dentro del ámbito de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas y amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretende que se encuentren dentro del alcance de la presente invención.
- 45 Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; se pretende que los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales se encuentren todos incluidos dentro del alcance de la presente invención.
- 50 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 pueden ser radiomarcados con isótopos radioactivos, tales como por ejemplo tritio (<sup>3</sup>H), yodo-125 (<sup>125</sup>I) o carbono-14 (<sup>14</sup>C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sean o no radioactivos, se pretende que sean abarcados dentro del ámbito de la presente invención.
- 55 Los compuestos de la presente invención pueden ser preparados por cualquier método adecuado; véase la sección de Ejemplos abajo, muchos de los cuales han sido descritos. Por ejemplo, procesos para preparar ciertos
- 60
- 65

compuestos útiles en la presente invención son descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6,113,918; Patente de los Estados Unidos No. 6,303,347; y PCT/US98/09385 (WO 98/50300, 12 de octubre de 1998). Sin embargo otros compuestos pueden ser preparados usando 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 12 de 1998). En general, los métodos sintéticos descritos en las referencias arriba mencionadas y otros métodos sintéticos de otra forma familiares en el arte son ampliamente aplicables para la preparación de estos compuestos. Por ejemplo, haciendo compuestos que tienen diferentes grupos acilos y sustituciones, una persona experimentada en el arte apreciará que los métodos convergentes descritos allí pueden ser modificados para usar agentes acilantes alternativos, o pueden ser iniciados con materiales disponibles comercialmente que tienen unidos grupos acilo apropiados.

En composiciones para obtener o mejorar una respuesta inmune, los compuestos de la invención son administrados a un animal de sangre caliente, incluyendo humanos, con un antígeno tal como una proteína o antígeno polipéptido o un polinucleótido que expresa una proteína o antígeno polipéptido. La cantidad de antígeno administrado para obtener una respuesta deseada puede ser fácilmente determinada por una persona experimentada en el arte y variará con el tipo de antígeno administrado, ruta de administración y programa de inmunización.

Los compuestos de la presente invención también pueden ser administrados sin un antígeno exógeno, para obtener protección inmediata por medio de un efecto de resistencia no específico, como se describe abajo; véase Persing et al., Publicación WIPO WO 01/90129, 29 de noviembre de 2001. Compuestos que tienen la habilidad de estimular resistencia no específica y/o de obtener un efecto adyuvante pueden ser usados en una formulación de vacuna rápida. La administración de compuestos de la presente invención con antígeno conduce a una respuesta inmune de mucosa adquirida en el transcurso de tres a cuatro semanas. La administración semanal de tales compuestos, por medio de una ruta intranasal por ejemplo, sobre un periodo de cuatro semanas proveerá una protección rápida y duradera combinando la protección provista por la respuesta inmune innata inicial, seguida por la respuesta inmune adquirida para el antígeno de interés.

Los compuestos de la presente invención pueden ser evaluados en una variedad de formatos de análisis para identificar y seleccionar aquellos que tienen las características más aptas para una aplicación dada de la invención. Por ejemplo, se pueden usar modelos animales para identificar y evaluar perfiles de liberación de citoquina a la circulación sistémica seguidos por la administración de un compuesto de la presente invención. Adicionalmente, existen modelos in vitro e in vivo para examinar cambios en uno o más aspectos de una respuesta inmune a diferentes compuestos antigénicos para lograr identificar los compuestos más apropiados para obtener una respuesta inmune específica de interés. Por ejemplo, un compuesto puede ser puesto en contacto con células objetivo tales como macrófagos, células dendríticas o células de Langerhans in vitro, y pueden cuantificarse citoquinas elaboradas. Adicionalmente, pueden usarse disposiciones de expresión genética para identificar rutas específicas activadas o inhibidas por un compuesto particular de interés.

La inducción/producción de citoquina puede ser determinada usando el tratamiento de sangre y/o células humanas con compuestos de la presente invención y midiendo la inducción con ELISA (Sistemas R & D). Tales métodos también pueden ser usados para determinar si la inducción es dependiente del receptor tipo Toll. La respuesta citotóxica del linfocito T después de la administración de los compuestos de la presente invención es determinada por el análisis de citotoxicidad basado en <sup>51</sup>Cr. Si se desea, el desempeño en este respecto del compuesto inventivo puede ser comparado con otros compuestos que se conocen por ser funcionales en este respecto, tales como el lípido A, MPL, AGPs o similares. Adicionalmente, los compuestos de la invención pueden ser evaluados en combinación con uno o más agentes adyuvantes y/o inmunomoduladores para identificar efectos sinérgicos (véase por ejemplo Patentes de los Estados Unidos Nos; 6,303,347 y 6,113,918, y WO 01/90129, publicada el 29 de noviembre de 2001).

Modelos animales tales como el modelo de exposición de influenza murina y el modelo de exposición murina a *Listeria monocytogenes* son útiles para determinar la actividad adyuvante e inmunomoduladora. En resumen, el compuesto es administrado seguido por una exposición a influenza o a *L. monocytogenes*. El índice de enfermedad (pelaje alterado, postura arqueada y respiración trabajosa), pérdida de peso y mortalidad, en el caso de influenza o el número de unidades formadoras de colonia en los bazo de los ratones tratados/no tratados, en el caso de *L. Monocytogenes*, son monitorizados como una indicación de la protección provista por la administración del compuesto de la invención (véase por ejemplo, WO 01/90129 publicado Noviembre 29, 2001).

Como se usa aquí, el término "polipéptido" es usado en su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no son limitados a una longitud específica del producto; por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos, y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido, y tales términos pueden ser usados aquí intercambiamente a no ser que se indique específicamente de otra manera. Este término tampoco se refiere a o excluye modificaciones postexpresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, como también otras modificaciones conocidas en el arte, tanto de origen natural como de origen no natural. Un polipéptido puede ser una proteína completa, o una subsecuencia de la misma. Polipéptidos particulares de interés en el contexto de esta invención son subsecuencias de aminoácidos que comprenden epítopos, es decir,

determinantes antigénicos sustancialmente responsables de las propiedades inmunogénicas de un polipéptido y que son capaces de producir una respuesta inmune.

Los polipéptidos útiles en la presente invención son algunas veces mencionados como proteínas tumorales o polipéptidos tumorales, como una indicación de que su identificación ha sido basada por lo menos en parte por sus niveles aumentados de expresión en muestras tumorales. Por lo tanto, un "polipéptido tumoral" o una "proteína tumoral", se refiere generalmente a una secuencia de polipéptidos de la presente invención, o una secuencia de polinucleótidos que codifica tal polipéptido, que es expresado en una proporción sustancial de muestras tumorales, por ejemplo preferiblemente mayor que aproximadamente 20%, más preferiblemente mayor que aproximadamente 30%, y más preferiblemente mayor que aproximadamente 50% o más de muestras tumorales analizadas, a un nivel que es por lo menos dos veces mayor, y preferiblemente por lo menos cinco veces mayor, mayor que el nivel de expresión en tejidos normales, tal como se determina usando un análisis representativo provisto aquí.

En ciertas realizaciones preferidas, los polipéptidos útiles en la presente invención son inmunogénicos, es decir, reaccionan de forma detectable dentro de un inmunoensayo (tal como ELISA o un análisis de estimulación de células T) con antisuero y/o células T de un paciente con cáncer. El examen para la actividad inmunogénica puede ser realizada usando técnicas bien conocidas para los expertos en el arte. Por ejemplo, tales exámenes pueden ser realizados usando métodos tales como aquellos descritos en Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En un ejemplo ilustrativo, un polipéptido puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido y puesto en contacto con suero del paciente para permitir el enlace de anticuerpos dentro del suero al polipéptido inmovilizado. El suero no enlazado puede entonces ser eliminado y los anticuerpos enlazados pueden ser detectados usando, por ejemplo, Proteína A marcada con <sup>125</sup>I.

Como sería reconocido por el experto en el arte, las porciones inmunogénicas de los polipéptidos revelados aquí también son útiles en la presente invención. Una "porción inmunogénica", como se usa aquí, es un fragmento de un polipéptido inmunogénico de la invención que es a su vez reactivo inmunológicamente (es decir, se enlaza específicamente) con las células B y/o receptores de antígeno de la superficie de las células T que reconoce el polipéptido. Las porciones inmunogénicas pueden ser generalmente identificadas usando técnicas bien conocidas, como aquellas resumidas en Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993) y referencias citadas allí. Tales técnicas incluyen examinar los polipéptidos en cuanto a su habilidad para reaccionar con anticuerpos, antisuero y/o líneas de células T o clones específicos para antígeno. Como se usa aquí, antisuero y anticuerpos son "específicos para antígeno" si se enlazan específicamente a un antígeno (es decir, reaccionan con la proteína en un ELISA u otro inmunoensayo, y no reaccionan de forma detectable con proteínas no relacionadas). Tal antisuero y anticuerpos pueden ser preparados como se describe aquí, y usando técnicas bien conocidas.

En una realización preferida, una porción inmunogénica de un polipéptido útil en 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 (es decir, en ELISA o un análisis de reactividad de células T). Preferiblemente, el nivel de actividad inmunogénica de la porción inmunogénica es por lo menos aproximadamente 50%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 70% y más preferiblemente mayor que aproximadamente 90% de la inmunogenicidad para el polipéptido de longitud completa. En algunas ocasiones, serán identificadas porciones inmunogénicas preferidas que tienen un nivel de actividad inmunogénica mayor que aquel del polipéptido de longitud completa que le corresponde, por ejemplo, que tienen actividad inmunogénica mayor que aproximadamente 100% o 150% o más.

En otras ciertas realizaciones, porciones inmunogénicas ilustrativas pueden incluir péptidos en los cuales una secuencia guía con terminal N y/o un dominio transmembrana han sido borrados. Otras porciones inmunogénicas ilustrativas van a contener una pequeña eliminación del terminal N y/o del terminal C (por ejemplo, 1-30 aminoácidos, preferiblemente 5-15 aminoácidos), con relación a la proteína madura.

En otra realización, una composición de polipéptido útil en la presente invención puede también 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 aminoácido revelada aquí, o a un fragmento inmunogénico o variante del mismo.

En otra realización, se proveen polipéptidos que comprenden uno o más polipéptidos que son capaces de obtener células T y/o anticuerpos que son inmunológicamente reactivos con uno o más polipéptidos descritos aquí, o uno o más polipéptidos codificados por secuencias de ácido nucleico contiguas contenidas en los polinucleótidos revelados aquí, o fragmentos inmunogénicos o variantes del mismo.

Los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo del terminal N de la proteína, la cual cotraslacionalmente o postraslacionalmente dirige la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede ser conjugado a un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para mejorar el enlace del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede ser conjugado a una región de inmunoglobulina Fc.

Dentro de otras realizaciones ilustrativas, un polipéptido puede ser un polipéptido de fusión que comprende múltiples polipéptidos como son descritos aquí, o que comprende por lo menos un polipéptido como se describe aquí y una secuencia sin relación, tal como una proteína tumoral conocida. Un asociado de fusión puede, por ejemplo, asistir en proveer epítomos ayudantes T (un asociado de fusión inmunológico), preferiblemente epítomos ayudantes T reconocidos por humanos, o puede asistir en expresar la proteína (un mejorador de expresión) a más altos rendimientos que la proteína recombinante nativa. Ciertos asociados de fusión preferidos son asociados de fusión mejoradores tanto inmunológicos como de expresión. Otros asociados de fusión pueden ser seleccionados para aumentar la solubilidad del polipéptido o para permitir que el polipéptido sea **direccionado** a compartimentos intracelulares deseados. Adicionalmente, los asociados de fusión incluyen etiquetas de afinidad, las cuales facilitan la purificación del polipéptido.

Los polipéptidos de fusión pueden ser preparados generalmente usando técnicas estándar, incluyendo conjugación química. Preferiblemente, un polipéptido de fusión es expresado como un polipéptido recombinante, permitiendo la producción de niveles aumentados, relativos a polipéptidos no fusionados., en un sistema de expresión. En resumen, secuencias de ADN que codifican los componentes del polipéptido pueden ser ensambladas separadamente, y ligadas a un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente del polipéptido está ligada, con o sin un enlazador de péptido, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido componente para que las estructuras de lectura de las secuencias estén en fase. Esto permite el traslado a un polipéptido de fusión único que mantenga la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

Una secuencia enlazadora de péptido puede ser usada para separar el primero y segundo componentes polipeptídicos con suficiente distancia para asegurar que cada polipéptido se pliegue a sus estructuras secundarias y terciarias. Tal secuencia enlazadora de péptido es incorporada en el polipéptido de fusión usando técnicas estándar bien conocidas en el arte. Secuencias enlazadoras de péptido adecuadas pueden ser elegidas con base en los siguientes factores: (1) su habilidad para adoptar una conformación flexible extendida; (2) su inhabilidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interactuar con epítomos funcionales en el primero y segundo polipéptidos; y (3) la falta de residuos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los epítomos funcionales de péptido. Las secuencias enlazadoras de péptido preferidas contienen residuos Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos neutros cercanos, tales como Thr y Ala también pueden ser usados en la secuencia de enlace. Las secuencias de aminoácido que pueden ser útilmente usadas como enlazadores incluyen aquellas reveladas en Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; Patente de los Estados Unidos No. 4,935,233 y Patente de los Estados Unidos No. 4,751,180. La secuencia enlazadora puede tener generalmente desde 1 a aproximadamente 50 aminoácidos en longitud. Las secuencias enlazadoras no son requeridas cuando el primero y segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos de terminal N no esenciales que pueden ser usadas para separar los dominios funcionales y prevenir la interferencia estérica.

Las secuencias ligadas de ADN son enlazadas operablemente a elementos regulatorios transcripcionales o traslacionales adecuados. Los elementos regulatorios responsables de la expresión de ADN están localizados solamente en 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De manera similar, los codones de pausa requeridos para finalizar las señales de terminación de traslación y transcripción solamente están presentes en 3' de la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

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 obtener una respuesta de memoria. Ejemplos de tales proteínas incluyen proteínas de tétano, tuberculosis y hepatitis (véase, por ejemplo, Stoute et al. New Engl. J. Med., 336:86-91, 1997).

En una realización preferida, el asociado de fusión inmunológico es derivado de una Mycobacterium sp., tal como un fragmento Ra12 derivado de Mycobacterium tuberculosis. Las composiciones de Ra12 y métodos para su uso en el mejoramiento de la expresión y/o inmunogenicidad de secuencias heterólogas de polinucleótido/polipéptido son descritas en la Aplicación de Patente de los Estados Unidos 60/158,585. Brevemente, el Ra12 se refiere a una región de un polinucleótido que es una subsecuencia de un ácido nucleico MTB32A de Mycobacterium tuberculosis. El MTB32A es una proteasa de serina con peso molecular de 32KD codificado por un gen en cepas virulentas y avirulentas de M. Tuberculosis. La secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácido de MTB32A han sido descritas (por ejemplo, Aplicación de Patente de los Estados Unidos 60/158,585; véase también, Skeiky et al., Infection and Immun. (1999) 67:3998-4007). Fragmentos C terminales de la secuencia que codifica MTB32A expresan a altos niveles y se mantienen como un polipéptido soluble a través del proceso de purificación. Además, el Ra12 puede mejorar la inmunogenicidad de polipéptidos inmunogénicos heterólogos con los que se ha fusionado. Un polipéptido de fusión Ra12 preferido comprende un fragmento C terminal de 14KD que corresponde a los residuos de aminoácidos 192 a 323 de MTB32A. Otros polinucleótidos Ra12 preferidos generalmente comprenden 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 nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido Ra12 o una porción del mismo) o puede comprender una variante de tal secuencia. Las variantes del polinucleótido Ra12 pueden contener una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones

y/o inserciones tales que la actividad biológica del polipéptido de fusión codificado no sea sustancialmente disminuida, con relación a un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido Ra12 nativo. Las variantes preferiblemente exhiben por lo menos aproximadamente 70% de identidad, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 80% de identidad y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% de identidad a una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido Ra12 nativo o una porción del mismo.

Dentro de otras realizaciones preferidas, un asociado de fusión inmunológico es derivado de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa *Haemophilus influenzae* B (WO 91/18926). Preferiblemente, un derivado de la proteína D que comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (por ejemplo, el primer terminal N de 100-110 aminoácidos), y un derivado de la proteína D puede ser lipidado. Dentro de ciertas realizaciones preferidas, los primeros 109 residuos de un asociado de fusión de la Lipoproteína D está incluido en el terminal N para proveer al polipéptido con epítomos adicionales exógenos de célula T y para aumentar el nivel de expresión en *E. Coli* (por lo tanto funcionando como un mejorador de expresión). La cola del lípido asegura la presentación óptima de las células que presentan de antígeno a antígeno. Otros asociados de fusión incluyen la proteína no estructural del virus de la influenza, NS1 (hemaglutinina). Típicamente, se usan los aminoácidos del terminal N 81, aunque pueden ser usados diferentes fragmentos que incluyen epítomos de ayudantes T.

En otra realización, el asociado de fusión inmunológico es la proteína conocida como LYTA, o una porción de la misma (preferiblemente la porción terminal C). La LYTA es derivada del *Streptococcus pneumoniae*, el cual sintetiza un N-acetil-L-alanina amidasa conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; Gen 43:265-292, 1986). La LYTA es una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en el esqueleto del péptidoglicano. El dominio C terminal de la proteína LYTA es responsable por la afinidad a la colina o a algunos análogos de colina tales como DEAE. Esta propiedad ha sido explotada para el desarrollo de plásmidos que expresan *E. Coli* C-LYTA útiles para la expresión de proteínas de fusión. La purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en el terminal del aminoácido han sido descritas (véase *Biotechnology* 10:795-798, 1992). Dentro de una realización preferida, una porción repetida de LYTA puede ser incorporada a un polipéptido de fusión. Una porción repetida es encontrada en la región C terminal comenzando en el residuo 178. Una porción de repetición particularmente preferida incorpora los residuos 188-305.

Aun otra realización ilustrativa involucra polipéptidos de fusión, y los polinucleótidos que los codifican, donde los asociados de fusión comprenden una señal objetivo capaz de dirigir un polipéptido al compartimento endosomal/lisosomal, como es descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,633,234. Un polipéptido inmunogénico de la invención, cuando es fusionado con su señal objetivo, se va a asociar más eficientemente con las moléculas clase II MHC y por lo tanto proveen una estimulación in vivo mejorada de células T CD4<sup>+</sup> específicas para el polipéptido.

Polipéptidos útiles en la presente invención son preparados usando cualquiera de una variedad de técnicas sintéticas y/o recombinantes bien conocidas. Polipéptidos, porciones y otras variantes generalmente menos que aproximadamente 150 aminoácidos pueden ser generados por medios sintéticos, usando técnicas bien conocidas a aquellos con experiencia ordinaria en el arte. En un ejemplo ilustrativo, tales polipéptidos son sintetizados usando cualquiera de las técnicas de fase sólida comercialmente disponibles, tales como el método de síntesis de fase sólida de Merrifield, donde aminoácidos son secuencialmente agregados a una cadena de aminoácidos en crecimiento. Véase Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2146, 1963. El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está disponible comercialmente de proveedores tales como Perkin Elmer/Applied Biosystems Division (Foster City, CA), y puede ser operado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En general, las composiciones de polipéptidos (incluyendo polipéptidos de fusión) útiles en la presente invención son aisladas. Un polipéptido "aislado" es uno que es retirado de su ambiente original. Por ejemplo, una proteína o polipéptido de origen natural es aislado si está separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, tales polipéptidos también son purificados, por ejemplo, son por lo menos aproximadamente 90% puros, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95% puros y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 99% puros.

En otros aspectos, se proveen compuestos que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican un antígeno de polipéptido como se describe aquí arriba. Los términos "ADN" y "polinucleótido" son usados esencialmente intercambiamente aquí para hacer referencia a una molécula de ADN que ha sido aislada libre de ADN genómico total de una especie en particular. "Aislado", como se usa aquí, significa que un polinucleótido está sustancialmente lejos de otras secuencias codificadoras, y que la molécula de ADN no contiene porciones grandes de ADN codificador no relacionado, tal como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificadoras de polipéptidos. Evidentemente, esto hace referencia a la molécula de ADN como es aislada originalmente, y no excluye genes o regiones codificadoras después agregadas al segmento por la mano humana.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido/proteína útil en la presente invención o una porción del mismo) o puede comprender una secuencia que codifica una variante o derivada, preferiblemente una variante inmunogénica o derivada, de tal secuencia. Típicamente, variantes de polinucleótido van a contener una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones y/o

inserciones, preferiblemente tales que la inmunogenicidad del polipéptido codificado por el polinucleótido variante no sea sustancialmente disminuida relativa a un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido específicamente expuesta aquí). El término "variantes" también debe ser entendido por abarcar genes homólogos de origen xenogénico.

5 En ciertas realizaciones preferidas, los polinucleótidos expuestos arriba, por ejemplo variantes de polinucleótido, fragmentos y secuencias hibridantes, codifican polipéptidos que son inmunológicamente de reactividad cruzada con un polipéptido antigénico o inmunogénico como se expone aquí arriba. En otras realizaciones preferidas, tales polinucleótidos codifican polipéptidos que tienen un nivel de actividad inmunogénica de por lo menos aproximadamente 50%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 70%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% de ese nivel para una secuencia de polipéptido específicamente expuesta aquí.

10 Los polinucleótidos revelados o fragmentos del mismo, sin importar la longitud de la secuencia codificadora, pueden ser combinados con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de restricción enzimática adicionales, múltiples sitios de clonación, otros segmentos codificadores, y similares, tal que su longitud total puede variar considerablemente. Es por lo tanto contemplado que un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud puede ser utilizado, con la longitud total preferiblemente siendo limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo previsto del ADN recombinante. Por ejemplo, segmentos de polinucleótido ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 10,000, aproximadamente 5000, aproximadamente 3000, aproximadamente 2,000, aproximadamente 1,000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases en longitud, y similares, (incluyendo todas las longitudes intermedias) son contempladas por ser útiles en muchas implementaciones de esta invención.

15 Composiciones de polinucleótidos útiles en la presente invención pueden ser identificadas, preparadas y/o manipuladas usando cualesquiera de una variedad de técnicas bien establecidas (véase generalmente, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y otras referencias similares). Por ejemplo, un polinucleótido puede ser identificado, como se describe en más detalle abajo, examinando una microdisposición de cADNs de expresión tumoral asociada (es decir, expresión que es por lo menos dos veces mayor en un tumor que en tejido normal, como es determinado usando un análisis representativo provisto aquí). Tales exámenes pueden ser realizados, por ejemplo, usando la tecnología de microdisposición de Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (y esencialmente como se describe por 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 pueden ser amplificados de cADN preparado de células que expresan las proteínas descritas aquí, tales como células tumorales.

20 Muchos procesos dependientes de plantilla están disponibles para amplificar una secuencia objetivo de interés presente en una muestra. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es el de reacción en cadena de la polimerasa (PCR™) el cual se describe en detalle en la Patente de U.S. Nos. 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159. Brevemente, en PCR™, dos secuencias cebadoras son preparadas las cuales son complementarias a las regiones sobre cadenas opuestas complementarias de la secuencia objetivo. Un exceso de trifosfatos desoxinucleósidos es agregado 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 van a enlazarse al objetivo y la polimerasa va a causar que los cebadores sean extendidos a lo largo de la secuencia objetivo agregando nucleótidos. Al aumentar y disminuir la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos van a disociarse del objetivo para formar productos de reacción, los cebadores en exceso van a enlazarse al objetivo y al producto de reacción y el proceso es repetido. Preferiblemente los procedimientos de transcripción inversa y amplificación por PCR™ pueden ser realizados para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado. Las metodologías de la reacción en cadena de la polimerasa son bien conocidas en el arte.

25 Cualquiera de un número de otros procesos dependientes de plantilla, muchos de los cuales son variaciones de la técnica de amplificación por PCR™, son fácilmente conocidos y disponibles en el arte. Ilustrativamente, algunos de esos métodos incluyen la reacción en cadena de la ligasa (llamada LCR), descrita por ejemplo, en *Eur. Pat. Appl. Publ. No. 320,308* y Patente de los Estados Unidos No. 4,883,750; Qbeta Replicase, descrita en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente PCT No. PCT/US87/00880; Amplificación por Desplazamiento de la Cadena (SDA) y Reacción en Cadena de Reparación (RCR). Otros métodos de amplificación son descritos en la Solicitud de Patente. No. 2 202 328 de Gran Bretaña, y en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente PCT N°. PCT/US89/01025. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS) (Publicación de Solicitud Internacional de Patente PCT No. WO 88/10315), incluyendo amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) y 3SR. *Eur. Pat. Appl. Publ. No. 329,822* describe un proceso de amplificación de ácido nucleico que involucra la síntesis cíclica del ARN de una cadena ("ssARN"), ssADN, y ADN de doble cadena (dsADN). La PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. WO 89/06700 describe un esquema de amplificación de secuencia de ácido nucleico basado en la hibridación de una secuencia promotora/cebadora a un ADN objetivo de cadena única ("ssADN") seguido por la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Otros métodos de amplificación tales como "RACE" (Frohman, 1990), y "PCR de un lado" (Ohara, 1989) también son bien conocidos a aquellos con experiencia en el arte.

Una porción amplificada de un polinucleótido de la presente invención puede ser usada para aislar un gen de longitud completa de una biblioteca apropiada (por ejemplo, una biblioteca de cADN tumoral) usando técnicas bien conocidas. Dentro de tales técnicas, se examina una biblioteca (cADN o genómica) usando una o más sondas o cebadores adecuados para la amplificación. Preferiblemente, se selecciona una biblioteca de acuerdo al tamaño para incluir moléculas más grandes. Bibliotecas cebadas aleatorias pueden también ser preferidas para identificar las regiones 5' y corriente arriba de genes. Se prefieren bibliotecas genómicas para obtener intrones y extender secuencias 5'.

Para técnicas de hibridación, una secuencia parcial puede ser marcada (por ejemplo, por traslación por muesca o marcado final con <sup>32</sup>P) usando técnicas bien conocidas. Una biblioteca bacteriana o bacteriófaga es entonces generalmente examinada por filtros hibridantes que contienen colonias de bacterias desnaturalizadas (o tamices que contienen placas bacteriófagas) con la sonda marcada (véase Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Se seleccionan y se expanden colonias hibridantes o placas, y el ADN es aislado para análisis adicional. Clones de cADN pueden ser analizados para determinar la cantidad de secuencia adicional por, por ejemplo, PCR usando un cebador de la secuencia parcial y un cebador del vector. Mapas de restricción y secuencias parciales pueden ser generadas para identificar uno o más clones solapados. La secuencia completa puede entonces ser determinada usando técnicas estándar, que pueden involucrar generar una serie de clones de eliminación. Las secuencias solapadas resultantes pueden entonces ser ensambladas en una sola secuencia contigua. Una molécula de cADN de longitud completa puede ser generada ligando fragmentos adecuados, usando técnicas bien conocidas.

Alternativamente, técnicas de amplificación, tales como aquellas descritas arriba, pueden ser útiles para obtener una secuencia codificadora de longitud completa de una secuencia parcial de cADN. Un ejemplo de tal técnica de amplificación es el PCR inverso (véase Triglia et al., *Nucl. Acids Res.* 16:8186, 1988), el cual usa enzimas de restricción para generar un fragmento en la región conocida del gen. El fragmento es entonces circularizado por ligación intramolecular y usado como plantilla para PCR con cebadores divergentes derivados de la región conocida. Dentro de un abordaje alternativo, secuencias adyacentes a una secuencia parcial pueden ser recuperadas por amplificación con un cebador a una secuencia enlazadora y un cebador específico a una región conocida. Las secuencias amplificadas son típicamente sometidas a una segunda ronda de amplificación con el mismo cebador enlazador y un segundo cebador específico para la región conocida. Una variación sobre este procedimiento, el cual utiliza dos cebadores que inician la extensión en direcciones opuestas de la secuencia conocida, se describe en WO 96/38591. Otra técnica similar se conoce como "rápida amplificación de extremos de cADN" o RACE. Esta técnica involucra el uso de un cebador interno y un cebador externo, los cuales se hibridizan a una región poliA o secuencia de vector, para identificar secuencias que son 5' y 3' de una secuencia conocida. Técnicas adicionales incluyen PCR de captura (Lagerstrom et al., *PCR Methods Applic.* 1:111-19, 1991) PCR por pase (Parker et al., *Nucl. Acids. Res.* 19:3055-60, 1991). Otros métodos que utilizan amplificación pueden también ser usados para obtener una secuencia de cADN de longitud completa.

En ciertas ocasiones, es posible obtener una secuencia de cADN de longitud completa por análisis de secuencias provistas en un dato de bases de etiqueta de secuencia expresada (EST), tales como la disponible de GenBank. Generalmente pueden realizarse búsquedas de ESTs solapados usando programas bien conocidos (por ejemplo, búsquedas NCBI BLAST), y tales ESTs pueden ser usados para generar una secuencia contigua de longitud completa. Secuencias de ADN de longitud completa también pueden ser obtenidas por análisis de fragmentos genómicos.

En otras realizaciones, las secuencias de polinucleótidos o fragmentos de las mismas que codifican los polipéptidos expuestos aquí arriba, o proteínas de fusión o los equivalentes funcionales de las mismas, pueden ser usadas en moléculas recombinantes de ADN para dirigir la expresión de un polipéptido en células huésped adecuadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma o una secuencia de aminoácido funcionalmente equivalente puede ser producida y estas secuencias pueden ser usadas para clonar y expresar un polipéptido dado.

Secuencias que codifican un polipéptido deseado pueden ser sintetizadas, completas o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en el arte (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).

Para lograr expresar un polipéptido deseado, las secuencias de nucleótido que codifican el polipéptido, o sus equivalentes funcionales, pueden ser insertadas en el vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada. Métodos bien conocidos para aquellos expertos en el arte pueden ser usados para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos adecuados de control transcripcional y de traducción. Estos métodos incluyen técnicas recombinantes de ADN in vitro, técnicas sintéticas, y recombinación genética in vivo. Tales técnicas son descritas, por ejemplo, en Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Los "elementos control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector, -mejoradores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3'- que interactúan con proteínas celulares huésped para llevar a cabo la transcripción y traducción. Tales elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema vector y huésped utilizado, pueden ser usados cualquier número de elementos adecuados de transcripción y traducción, incluyendo promotores constitutivos e inducibles.

En células de mamíferos, un número de sistemas de expresión basados en virus es generalmente disponible. Por ejemplo, en casos donde un adenovirus es usado como un vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden estar ligadas a un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste del promotor tardío y la secuencia guía tripartita. La inserción en una región no esencial E1 o E3 del genoma viral puede ser usada para obtener un virus viable que es capaz de expresar el polipéptido en células huésped infectadas (Logan, J. and Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659). Adicionalmente, los mejoradores de transcripción, tales como el mejorador de virus sarcoma Rous (RSV), pueden ser usados para aumentar la expresión en las células huésped de mamífero.

Señales específicas de iniciación también pueden ser usadas para lograr una traducción más eficiente de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En casos donde las secuencias que codifican el polipéptido, su codón de iniciación, y secuencias corriente arriba son insertadas dentro de los vectores de expresión apropiados, no se necesitan señales adicionales de control transcripcionales o de traducción. Sin embargo, en casos donde solo la secuencia de codificación, o una porción de la misma, es insertada, señales de control de traducción exógenas incluyendo el codón de iniciación ATG deben ser provistos. Además, el codón de iniciación debe estar en el marco correcto de lectura para asegurar la traducción de la inserción completa. Elementos exógenos de traducción y codones de iniciación pueden ser de varios orígenes, tanto natural como sintético. La eficiencia de expresión puede ser mejorada por la inclusión de mejoradores que son apropiados para el sistema celular particular que es usado, tal como los descritos en la literatura (Scharf, D. et al. (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162).

Una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados con polinucleótidos, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto son conocidos en el arte. Ejemplos incluyen ensayos inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). Un inmunoensayo de dos sitios, con base monoclonal usando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítopos que no interfieren sobre un polipéptido dado puede ser preferido para algunas aplicaciones, pero también puede ser usado un ensayo de enlace competitivo. Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, 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 farmacéuticas y métodos

Debe entenderse que, si se desea, los compuestos revelados aquí pueden ser administrados en combinación con otras modalidades terapéuticas, tales como compuestos o terapias antimicrobianas, antivirales y antifúngicas, varios agentes terapéuticos con base de ADN, agentes terapéuticos basados en ARN, agentes terapéuticos basados en polipéptido y/o con otros inmunoefectores. De hecho, esencialmente cualquier otro componente también puede ser incluido, con la condición de que el componente(s) adicional no cause un efecto adverso significativo tras el contacto con las células objetivo o tejidos del huésped. Las composiciones por lo tanto pueden ser administradas junto con otros agentes como sea requerido o deseado para las realizaciones específicas de la invención que sean implementadas. Ilustrativamente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir, o ser usadas en conjunción con, ADN que codifica una o más proteínas terapéuticas, ARNs antisentido, ribozimas o similares.

Los métodos descritos aquí son aplicables esencialmente contra cualquier tipo de agente infeccioso, incluyendo bacterias, virus, parásitos, y hongos. Ilustrativamente, la invención es útil para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de infecciones bacterianas causadas por especies de Pseudomonas, Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Serratia, Candida, Staphylococci, Streptococci, Chlamydia, Mycoplasma y otras numerosas. Condiciones virales ilustrativas que pueden ser tratadas de acuerdo con la invención incluyen aquellas causadas, por ejemplo, por virus de Influenza, Adenovirus, virus de Parainfluenza, Rhinovirus, virus sincicial respiratorio (RSVs), Herpes virus, Citomegalovirus, Virus de Hepatitis, por ejemplo, virus de Hepatitis B y C, y otros. Hongos ilustrativos incluyen, por ejemplo, Aspergillus, Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Coccidioides immitis, y otros.

También se describen aquí métodos para el tratamiento de sujetos, particularmente sujetos inmunocomprometidos que han desarrollado o están a riesgo de desarrollar infecciones, tales como infecciones bacterianas nosocomiales y virales. Aproximadamente 2 millones de 40 millones de individuos hospitalizados cada año desarrollan infecciones nosocomiales durante su estadía y aproximadamente 1% de estas, o aproximadamente 400,000 pacientes, desarrollan neumonía nosocomial, más de 7000 de los cuales mueren. Esto hace que la neumonía nosocomial sea la causa líder de muerte en infecciones adquiridas en el hospital. Por lo tanto, esto llena una necesidad importante para acercamientos profilácticos efectivos en el tratamiento de infecciones nosocomiales.

También se describen aquí tratamientos profilácticos para pacientes inmunocomprometidos, tales como pacientes VIH positivos, quienes han desarrollado o están a riesgo de desarrollar neumonía de una infección oportunista o de la reactivación de una infección suprimida o latente. En 1992, aproximadamente 20,000 casos de infecciones de *Pneumocystis carinii* en pacientes con SIDA fueron reportados en los Estados Unidos solamente. Adicionalmente, 60-70% de todos los pacientes con SIDA adquieren *P. carinii* en algún punto durante su enfermedad. Por lo tanto, se describen aquí métodos profilácticos efectivos para esta población en riesgo.

Los métodos descritos aquí pueden ser usados para tratar otras poblaciones de pacientes que pueden estar inmunocomprometidos y/o en riesgo de desarrollar enfermedades infecciosas, incluyendo, por ejemplo, pacientes con fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y otros pacientes inmunocomprometidos y/o institucionalizados.

Los compuestos y composiciones que se describen aquí pueden ser utilizados (sin un antígeno exógeno) en métodos para tratar, mejorar, o prevenir sustancialmente trastornos y condiciones alérgicas, tales como sinusitis, rinosinusitis crónica, asma, dermatitis atópica y psoriasis. Este acercamiento está basado por lo menos en parte en la habilidad de los compuestos para activar la producción de citoquinas de células objetivo que pueden competir con respuestas de citoquina estereotípicas tipo alérgicas caracterizadas por la producción de IL-4 o hiperrespuesta a la actividad de IL-4. La administración de ciertos de los compuestos mono y disacáridos revelados aquí resultan en la expresión de IFN-gamma y IL-12 de células que procesan y presentan antígenos, como también otras células, resultando en subregulación de citoquinas asociadas con respuestas alérgicas tales como IL-4, 5, 6, 10 y 13.

Los compuestos y composiciones descritas aquí pueden ser utilizados (sin un antígeno exógeno) en métodos para tratar enfermedades y condiciones autoinmunes. Los compuestos serán típicamente seleccionados de aquellos capaces de antagonizar, inhibir o modular negativamente uno o más receptores tipo Toll, particularmente Tlr2 y/o Tlr4, tales como una respuesta autoinmune asociada con una condición dada es mejorada o sustancialmente prevenida. Ilustrativamente, los métodos pueden ser usados en el tratamiento de condiciones tales como enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, artritis crónica, esclerosis múltiple y psoriasis.

Los compuestos de la invención también pueden ser usados como adyuvantes e inmunoefectores que mejoran la generación de anticuerpos en animales inmunizados, estimulan la producción de citoquinas y estimulan una respuesta inmune mediada por células incluyendo una respuesta citotóxica de linfocito T.

En métodos descritos aquí, por ejemplo, para causar un efecto en la respuesta inmune de un individuo, los compuestos y composiciones descritas aquí pueden ser formulados con un vehículo farmacéutico aceptable para inyección o ingestión. Como se usa aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un medio que no interfiere con la actividad inmunomoduladora del ingrediente activo y no es tóxico para el paciente al cual se le administra. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, composiciones acuosas, liposomas, microperlas y microsomas. Por ejemplo, el vehículo puede ser una microesfera o micropartícula que tiene un compuesto de esta invención dentro de la matriz de la esfera o partícula o adsorbida en la superficie de la esfera o partícula. El vehículo también puede ser una solución acuosa o dispersión micelar que contiene trietilamina, trietanolamina u otro agente que vuelve la formulación alcalina en naturaleza, o una suspensión que contiene hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, fosfato de calcio o adsorbato de tirosina. Los vehículos también pueden incluir todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, reguladores, soluciones vehículo, suspensiones, coloides, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en el arte. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en las composiciones terapéuticas es contemplado.

Formulaciones de los compuestos de la invención que pueden ser administradas parenteralmente, es decir, vía intraperitoneal, vía subcutánea o vía intramuscular incluyen los siguientes vehículos preferidos. Ejemplos de vehículos preferidos para uso subcutáneo incluyen una solución salina reguladora de fosfato (PBS) y 0.01-0.1% de trietanolamina en Agua USP para Inyección. Vehículos apropiados para inyección intramuscular incluyen 10% de etanol USP, 40% de propilenglicol y el balance una solución isotónica aceptable tal como 5% dextrosa.

Ejemplos de vehículos preferidos para uso intravenoso incluyen 10% de etanol USP, 40% propilenglicol USP y el balance de Agua USP para Inyección. Otro vehículo aceptable incluye 10% etanol y Agua USP para Inyección; aun otro vehículo aceptable es 0.01-0.1% trietanolamina en Agua USP para inyección. Solventes parenterales farmacéuticamente aceptables son tales que proveen una solución o dispersión que puede ser filtrada a través de un filtro de 5 micrones sin eliminar el ingrediente activo.

Un método preferido de administración de las composiciones descritas aquí es administración a través de la mucosa, particularmente administración intranasal o administración por inhalación (administración pulmonar). La distribución pulmonar de fármacos puede ser lograda por varias metodologías diferentes, incluyendo nebulizadores líquidos, inhaladores con dosis medida con base de aerosol (MDIs), y aparatos para la dispersión de polvos secos. Composiciones para el uso en administraciones de este tipo son típicamente polvos secos o aerosoles. Para la

administración de aerosoles, el cual es el método preferido de administración, las composiciones son distribuidas por inhaladores, algunos de los cuales son descritos abajo.

Los polvos secos contienen, además del ingrediente activo, un vehículo, un mejorador de absorción, y opcionalmente otros ingredientes. El vehículo es, por ejemplo, un mono, di o polisacárido, un alcohol azucarado u otro poliol. Vehículos apropiados incluyen lactosa, glucosa, rafinosa, melezitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol; y almidón. La lactosa es particularmente preferida, especialmente en la forma de su monohidrato. También se incluyen mejoradores de absorción tales como polipéptidos, surfactantes, glicosidos de alquilo, sales de amino y ácidos grasos o fosfolípidos. Los ingredientes de la formulación típicamente deben estar en una forma finamente dividida, es decir, su diámetro medio de volumen debe generalmente ser desde aproximadamente 30 a aproximadamente 200 micrones, como es medido por un instrumento de difracción de láser o un contador Coulter. El tamaño de partícula deseado puede ser producido usando métodos conocidos en el arte, por ejemplo, triturado, micronización o precipitación directa.

La vía de administración intranasal provee 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 el marco institucional, conlleva a preocupaciones entre el personal médico sobre el riesgo de contraer la enfermedad al clavarse accidentalmente la aguja contaminada. También deben ser impuestos en el marco institucional estrictos requisitos para la eliminación segura de la aguja usada y la jeringa. En contraste, la administración intranasal requiere poco tiempo de parte del paciente y del personal de atención médica, y es mucho menos molesto para la institución que los inyectables.

Una segunda ventaja importante de la administración intranasal es la aceptación del paciente del sistema de administración del fármaco. La administración intranasal es percibida como no invasiva, no está acompañada de dolor, no tiene efectos posteriores significativos y produce la gratificación de alivio rápido en el paciente que exhibe el síntoma. Esto es de particular ventaja cuando el paciente es un niño. Otra consideración importante es que el paciente puede ser capaz de administrarse a sí mismo la dosificación(es) prescrita del aerosol nasal.

Para administración intranasal las composiciones de esta invención pueden ser formuladas como líquidas o como sólidas. Tales composiciones pueden contener uno o más adyuvantes, agentes para mejorar la absorción de los ingredientes activos por permeación a través de la membrana nasal, y (para composiciones líquidas) un diluyente acuoso, por ejemplo agua. Alternativamente, el diluyente puede comprender un regulador acuoso tal como un regulador de fosfato. La composición puede además incluir opcionalmente uno o más alcoholes polihídricos y uno o más agentes conservantes tales como, por ejemplo, gentamicina, bacitracina (0.005%), o cresol. Las composiciones pueden ser administradas a la cavidad nasal en la forma de un aerosol usando un atomizador, nebulizador, rociador, gotero u otro aparato que asegure el contacto de la solución con las membranas mucosas nasales. El aparato puede ser uno simple tal como un rociador nasal simple que puede ser usado por el paciente, o puede ser un instrumento más elaborado para una administración más precisa de las composiciones, que puede ser usado en la consulta de un médico o en una instalación médica.

Pueden hacerse composiciones de polvos nasales mezclando el agente activo y el excipiente, teniendo ambos el tamaño de partícula deseado. Primeramente, se hace una solución del agente activo y los excipientes de ciclodextrina, seguida por precipitación, filtración y pulverización. También es posible eliminar el solvente por liofilización, seguida de pulverización del polvo al tamaño de partícula deseado usando técnicas convencionales, conocidas en la literatura farmacéutica. El último paso es la clasificación por tamaño por ejemplo tamizado, para obtener partículas que estén preferiblemente entre 30 y 200 micrones de diámetro. Los polvos pueden ser administrados usando un insuflador nasal, o pueden ser colocados en una capsula situada en un aparato de inhalación o insuflador. Se hace penetrar una aguja a través de la cápsula para hacer poros en la parte de arriba y de abajo de la cápsula y se envía aire para liberar las partículas de polvo. La formulación en polvo también puede ser administrada por aerosol en chorro de un gas inerte o suspendida en fluidos orgánicos líquidos.

En una realización específica, la composición farmacéutica puede ser administrada por un sistema de liberación controlado o sostenido. En una realización, puede ser usada 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; Saudek et al., 1989 N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, pueden ser usados materiales poliméricos para lograr una liberación controlada o sostenida del agonista del receptor de  $\kappa$ -opioide y/o antagonista de opioide (véase por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, 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; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105; Patente de los Estados Unidos No. 5,679,377; Patente de los Estados Unidos No. 5,916,597, Patente de los Estados Unidos No. 5,912,015; Patente de los Estados Unidos No. 5,989,463; Patente de los Estados Unidos No. 5,128,326; Publicación PCT No. WO 99/12154; y Publicación PCT No. WO 99/20253). Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no están limitados a, poli(2-hidroxi metacrilato de etilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(pirrolidona de N-vinilo), poli(alcohol de vinilo),

poliacrilamida, poli(etilen glicol), poliactidas (PLA), poli(láctido-co-glicólidos)(PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable durante el almacenamiento, estéril, y biodegradable. En aún otra realización, un sistema de liberación controlada o sostenida puede ser situado en proximidad al objetivo terapéutico, por lo tanto requiriendo solo una fracción de la dosis sistemática (véase por ejemplo, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Los vehículos para uso con tales composiciones farmacéuticas son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables. En ciertas realizaciones, la formulación preferiblemente provee un nivel relativamente constante de liberación del componente activo. En otras realizaciones, sin embargo, se puede desear un índice más rápido de liberación inmediatamente después de la administración. La formulación de tales composiciones se encuentra dentro de un nivel de experiencia ordinaria en el arte usando técnicas conocidas. Vehículos ilustrativos útiles en este aspecto incluyen micropartículas de poli(láctido-co-glicólido), poliacrilato, látex, almidón, celulosa, dextrano y similares. Otros vehículos ilustrativos de liberación retrasada incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un núcleo hidrofílico no líquido (por ejemplo, un polisacárido entrecruzado u oligosacárido) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifílico, tal como un fosfolípido (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,151,254 y aplicaciones PCT WO 94/20078, WO 94/23701, WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implantación, el índice y la duración esperada de liberación y la naturaleza de la condición que va a ser tratada o prevenida.

Los compuestos de la invención pueden ser administrados a un individuo en una cantidad efectiva o una cantidad farmacéuticamente efectiva, para efectuar o mejorar la respuesta inmune del individuo. Como se usa aquí, "cantidad efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" es aquella cantidad que muestra una respuesta sobre y por encima del vehículo o los controles negativos. Una "cantidad adyuvante efectiva" es aquella cantidad del compuesto en cuestión que, cuando es administrada en conjunción con un antígeno, muestra una respuesta sobre y por encima de aquella producida por el antígeno solo. La dosis precisa de los compuestos de la presente invención que puede ser administrada a un paciente va a depender del compuesto particular usado, la ruta de administración, la composición farmacéutica, y el paciente. Por ejemplo, cuando es administrada subcutáneamente para mejorar una respuesta del anticuerpo, la cantidad del compuesto usado es desde 1 a aproximadamente 250 microgramos, preferiblemente desde aproximadamente 25 a aproximadamente 50 microgramos basado en la administración a un paciente adulto típico de 70 kg.

En otra realización, las composiciones ilustrativas inmunogénicas, por ejemplo, composiciones inmunogénicas y/o vacunas, descritas aquí comprenden ADN que codifica uno o más de los polipéptidos como son descritos arriba, tal que el polipéptido es generado in situ. Como se destaca arriba, el polinucleótido puede ser administrado dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de administración conocidos para aquellos de experiencia ordinaria en el arte. De hecho, numerosas técnicas de administración de genes son bien conocidas en el arte, tales como aquellas descritas por Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15:143-198, 1998, y las referencias citadas allí. Los sistemas de expresión de polinucleótidos apropiados van, por supuesto, a contener las secuencias de ADN regulatorias necesarias para la expresión en un paciente (tal como un acelerador adecuado y una señal de terminación).

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunogénicos descritos aquí son introducidos dentro de células huésped de mamífero adecuadas para expresión usando cualquiera de un número de sistemas de base viral conocidos. En una realización ilustrativa, los retrovirus proveen una plataforma conveniente y efectiva para sistemas de administración de genes. Una secuencia de nucleótido seleccionada que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser insertada a un vector y empacada en partículas retrovirales usando técnicas conocidas en el arte. El virus recombinante puede entonces ser aislado y administrado a un sujeto. Un número de sistemas retrovirales ilustrativos han sido descritos (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,219,740; Miller y Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Bums et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; y Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

Adicionalmente, un número de sistemas ilustrativos basados en adenovirus también han sido descritos. A diferencia de los retrovirus que se integran al genoma del huésped, los adenovirus persisten extracromosómicamente minimizando por lo tanto los riesgos asociados con la mutagénesis insercional (Haj-Ahmad y 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).

Diversos sistemas de vector virus adenoasociados (AAV) también han sido desarrollados para la administración de polinucleótidos. Los vectores AAV pueden ser fácilmente construidos usando técnicas bien conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 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 Harbor 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.

5 Vectores virales adicionales útiles para la administración de polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la presente invención por transferencia de genes incluyen aquellos derivados de la familia de virus de viruela, tales como el vaccinia virus y el virus de la viruela aviar. Por ejemplo, recombinantes del vaccinia virus que expresan las moléculas novedosas pueden ser construidos como sigue. El ADN que codifica un polipéptido es primero insertado en un vector apropiado para que esté adyacente a un promotor de vaccinia y secuencias de ADN de vaccinia  
10 flanqueante, tales como la secuencia que codifica la timidina quinasa (TK). Este vector es entonces usado para transfectar células que son simultáneamente infectadas 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 recombinante TK.sup.(-) resultante puede ser seleccionado cultivando las células en la presencia de 5-bromodesoxiuridina y seleccionando placas virales resistentes a este.

15 Un sistema de infección/transfección basado en vaccinia puede ser convenientemente usado para proveer una expresión inducible, transitoria o coexpresión de uno o más polipéptidos descritos aquí en las células huésped de un organismo. Es este sistema particular, las células son primero infectadas in vitro con un virus de vaccinia recombinante que codifica bacteriófago T7 ARN polimerasa. Esta polimerasa muestra una especificidad exquisita en cuanto a que solo transcribe plantillas que tienen los promotores T7. Después de la infección, las células son trasfectadas con el polinucleótido o polinucleótidos de interés, impulsado por el promotor T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del recombinante de virus de vaccinia transcribe el ADN transfectado en ARN que es entonces traducido a un polipéptido por la maquinaria traductora del huésped. El método provee para una producción citoplásmica de alto nivel, transitoria, de grandes cantidades de ARN y sus productos de traducción.  
20 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 pueden usarse virus de viruela aviar, tales como el virus de viruela aviar y viruela de canario, para administrar las secuencias codificadoras de interés. Se sabe que virus de viruela aviar recombinantes,  
30 que expresan inmunógenos de patógenos de mamífero, proveen una inmunidad protectora cuando son administrados a especies no aviares. El uso de un vector de viruela aviar es particularmente deseable en humanos u otras especies de mamíferos ya que los miembros del género de viruela aviar solamente pueden replicarse productivamente en especies aviares susceptibles y por lo tanto no existen células de mamífero infecciosas. Se conocen en el arte métodos para producir virus de viruela aviar recombinantes y utilizan recombinación genética,  
35 como se describe arriba con respecto a la producción de virus de vaccinia. Véase, por ejemplo, WO 91/12882; WO 89/03429; y WO 92/03545.

Cualquiera de un número de vectores de alfavirus también pueden ser usados para la administración de composiciones de polinucleótidos de la presente invención, tales como aquellos vectores descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 y 6,015,694. Ciertos vectores basados en la Encefalitis Equina Venezolana (VEE) también pueden ser usados, ejemplos ilustrativos de los cuales pueden ser encontrados en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,505,947 y 5,643,576.

Además, vectores moleculares conjugados, tales como los vectores de adenovirus quiméricos 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, también pueden ser usados para la administración de genes bajo la invención.

Información ilustrativa adicional en estos y otros sistemas de administración con base viral conocidos puede ser encontrada, 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 de los Estados Unidos Nos. 4,603,112, 4,769,330, y 5,017,487; WO 89/01973; Patente de los Estados Unidos No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Rosenfeld 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; Guzman et al., *Circulation* 88:2838-2848, 1993; y Guzman et al., *Cir. Res.* 73:1202-1207, 1993.

55 En ciertas realizaciones, un polinucleótido puede ser integrado en el genoma de una célula objetivo. Esta integración puede ser en el lugar y orientación específicos vía recombinación homóloga (reemplazo de genes) o puede ser integrada en un sitio aleatorio, no específico (acrecentamiento de genes). En aún más realizaciones, el polinucleótido puede ser mantenido establemente en la célula como un segmento separado, episómico de ADN. Tales segmentos de polinucleótido o "epitomas" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independiente de o en sincronización con el ciclo celular del huésped. La forma en la que la estructura de expresión es administrada a una célula y dónde en la célula permanece el polinucleótido es dependiente del tipo de estructura de expresión utilizada.

65 En otra realización de la invención, un polinucleótido es administrado/entregado como ADN "desnudo", 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 del ADN desnudo puede ser aumentada cubriendo con ADN perlas biodegradables, las cuales son eficientemente transportadas a las células.

5 En aún otra realización, una composición de la presente invención puede ser administrada a través de una metodología de bombardeo de partículas, muchos de los cuales han sido descritos. En un ejemplo ilustrativo, la aceleración de partículas impulsadas por gas puede ser logrado con aparatos tales como aquellos fabricados por Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), algunos ejemplos de los cuales son descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; y Patente EP No. 0500 799. Esta metodología ofrece una metodología de administración libre de agujas donde una  
10 formulación de polvo seco de partículas microscópicas, tales como partículas de polinucleótidos o de polipéptidos, son aceleradas a alta velocidad dentro de un chorro de gas de helio generado por un aparato portátil, que propulsa las partículas al tejido objetivo de interés.

15 En una realización relacionada, otros aparatos y métodos que pueden ser útiles para la inyección de las composiciones impulsadas por gas sin aguja descritas aquí incluyen aquellos provistos por Bioject, Inc. (Portland, OR), algunos ejemplos de los cuales son descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 y 5,993,412.

20 La composición farmacéutica es preferiblemente una que induzca una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Altos niveles de citoquinas tipo Th1 (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 y IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por célula a un antígeno administrado. En contraste, altos niveles de citoquinas tipo Th-2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas humorales inmunes. Después de la aplicación de una composición inmunogénica como se provee aquí, un paciente va a soportar una respuesta inmune que incluye respuestas tipo Th-1 y Th-2. Dentro de una realización preferida, en la cual una respuesta es predominantemente tipo Th-1, el nivel de citoquinas tipo Th-1 va a aumentar en una mayor medida que el nivel de las citoquinas tipo Th-2. Los niveles de estas citoquinas pueden ser evaluados fácilmente usando análisis estándar. Alternativamente, o adicionalmente, altos niveles de citoquinas tipo Th-2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6, y IL-10) pueden ser deseados para ciertas aplicaciones terapéuticas. Los niveles de estas citoquinas pueden ser evaluados fácilmente usando análisis estándar. Para un repaso de las familias de citoquinas, véase  
25 Mosmann and Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989.

30 Composiciones ilustrativas para el uso en la inducción de citoquinas tipo Th-1 incluyen, por ejemplo, una combinación de oligonucleótidos que contienen CpG (en el cual el dinucleótido CpG no está metilado) como se describe, por ejemplo, en WO 96/02555, WO 99/33488 y Patente de los Estados Unidos Nos. 6,008,200 y 5,856,462. Secuencias de ADN inmunoestimuladoras también son descritas, por ejemplo, por Sato et al., Science 273:352, 1996. Otros inmunoestimulantes apropiados comprenden saponinas, tales como QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), y derivados de saponina relacionados y miméticos de la misma.

35 Cualquiera de una variedad de inmunoestimulantes adicionales puede ser incluida en las composiciones de esta invención. Por ejemplo, citoquinas, tales como GM-CSF, interferones o interleucinas para modular adicionalmente una respuesta inmune de interés. Adicionalmente, Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), las series SBAS de adyuvantes (por ejemplo, SBAS-2 o SBAS-4, disponibles de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), y Enhanzyn™ immunostimulant (Corixa, Hamilton, MT). Inmunoestimulantes de éter de polioxiétileno, son descritos en WO 99/52549A1 y también pueden ser usados.

40 Las composiciones farmacéuticas descritas aquí usualmente también van a comprender uno o más reguladores (por ejemplo, solución salina neutra regulada o solución salina de fosfato regulada), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextrano), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostáticos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatona, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio), solutos que vuelven la formulación isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes. Alternativamente, las composiciones descritas aquí pueden ser formuladas como un liofilizado.

45 Las composiciones farmacéuticas descritas aquí pueden ser presentadas en recipientes de una dosis o dosis múltiples, tales como ampollas selladas o viales. Tales recipientes son típicamente sellados de tal forma para preservar la esterilidad y estabilidad de la formulación hasta su uso. En general, las formulaciones pueden ser almacenadas como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos de aceite o acuosos. Alternativamente, una composición farmacéutica puede ser almacenada en una forma liofilizada que requiere solamente la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

50 El desarrollo de regímenes adecuados de dosificación y tratamiento para usar las composiciones particulares descritas aquí en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, e intramuscular, son bien conocidos en el arte, algunos de los cuales son brevemente discutidos abajo para propósitos generales de ilustración.

En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas reveladas aquí pueden ser administradas a animales a través de administración oral. Como tales, estas composiciones pueden ser formuladas con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden estar contenidas en cápsulas de gelatina de envoltura dura o suave, o pueden ser comprimidas en tabletas, o pueden ser incorporadas directamente con el alimento de la dieta.

Los compuestos activos pueden incluso ser incorporados con excipientes y usados en la forma de tabletas digeribles, tabletas bucales, pastillas, 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 Sits 1998;15(3):243-84; Patente de los Estados Unidos. 5,641,515; Patente de los Estados Unidos 5,580,579 y Patente de los Estados Unidos 5,792,451). Las tabletas, pastillas, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener cualquiera de una variedad de componentes adicionales, por ejemplo, un enlazador, tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tales como fosfato de dicalcio; un agente desintegrador, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y un agente endulzante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina pueden ser agregados o un agente saborizante, tal como menta, aceite de gaulteria, o sabor de cereza. Cuando la forma de la unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo arriba mencionados, un vehículo líquido. Otra variedad de materiales pueden estar presentes como revestimientos o de otra forma para modificar la forma física de unidad de dosificación. Por ejemplo, las tabletas, píldoras, o capsulas pueden estar cubiertas con shellac, azúcar, o ambas. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de la forma de unidad de dosificación debe ser farmacéuticamente pura y sustancialmente no tóxica en las cantidades usadas. Adicionalmente, los compuestos activos pueden ser incorporados a una preparación y formulaciones de liberación sostenida.

Típicamente, estas formulaciones van a contener por lo menos aproximadamente 0.1% del compuesto activo o más, aunque el porcentaje del ingrediente(s) activo puede, por supuesto, ser variado y puede ser convenientemente entre aproximadamente 1 o 2% y aproximadamente 60% o 70% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad del compuesto(s) activo en cada composición terapéuticamente útil puede ser preparada de tal forma que una dosificación adecuada será obtenida en cualquier dosis única dada del compuesto. Factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, vía de administración, vida útil del producto, como también otras consideraciones farmacológicas serán contempladas por alguien experto en el arte de preparar tales formulaciones farmacéuticas, y como tal, una variedad de dosis y regímenes de tratamiento pueden ser deseados.

Para la administración oral las composiciones descritas aquí pueden alternativamente ser incorporadas con uno o más excipientes en la forma de enjuague bucal, pasta dental, tableta bucal, aerosol oral, o formulaciones orales administradas sublingualmente. Alternativamente, el ingrediente activo puede ser incorporado en una solución oral tal como una que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o dispersado en una pasta dental, o agregado en una cantidad terapéuticamente efectiva a una composición que puede incluir agua, enlazadores, abrasivos, agentes saborizantes, agentes espumantes, y humectantes. Alternativamente las composiciones pueden ser fabricadas en una tableta o forma de solución que puede ser situada debajo de la lengua o de otra manera disuelta en la boca.

En ciertas circunstancias será deseable administrar las composiciones farmacéuticas reveladas aquí parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, o inclusive intraperitonealmente. Tales metodologías son bien conocidas para el experto en el arte, algunas de las cuales son descritas adicionalmente, por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos 5,543,158; Patente de los Estados Unidos 5,641,515 y Patente de los Estados Unidos 5,399,363. En ciertas realizaciones, las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden ser preparadas en agua apropiadamente mezclada con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicol líquido, y mezclas del mismo y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones generalmente van a contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Formas farmacéuticas ilustrativas apropiadas para uso inyectable incluyen soluciones estériles acuosas o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables (por ejemplo, véase Patente de los Estados Unidos 5,466,468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida al punto de que exista fácil aplicabilidad por jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas apropiadas del mismo, y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o por el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede ser facilitada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En varios casos, será preferido incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser lograda por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En una realización, para la administración parenteral en una solución acuosa, la solución debe ser regulada adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero debe volverse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente apropiadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En conexión con esto, un medio acuoso estéril que puede ser utilizado será conocido para aquellos expertos en el arte a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede ser disuelta en 1 ml de solución isotónica de NaCl y puede ser agregada a 1000 ml de fluido para hipodermoclixis o inyectado en el sitio de infusión propuesto, (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. Además, para la administración en humanos, las preparaciones cumplirán por supuesto preferiblemente con esterilidad, pirogenicidad, y los estándares generales de seguridad y pureza requeridos por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

Las composiciones reveladas aquí pueden ser formuladas en una forma neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y las cuales son formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden ser derivadas de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones serán administradas de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente efectiva.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas por aerosoles intranasales, por inhalación, y/u otros vehículos de administración por aerosol. Métodos para administrar genes, ácidos nucleicos, y composiciones de péptidos directamente a los pulmones mediante aspersores nasales por aerosol han sido descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos 5,756,353 y Patente de los Estados Unidos 5,804,212. De forma similar, la administración de fármacos utilizando resinas de micropartícula intranasales (Takenaga et al., J Controlled Release 1998 Mar 2;52(1-2):81-7) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente U. S. 5,725,871) también es bien conocida en las artes farmacéuticas. De forma similar, la administración transmucosa ilustrativa de fármacos en la forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la Patente de los Estados Unidos 5,780,045.

En ciertas realizaciones, se usan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas de lípidos, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones aquí descritas en organismos/células de huésped adecuadas. En particular, las composiciones aquí descritas pueden ser formuladas para administración encapsulada en una partícula de lípido, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, o una nanopartícula o similares. Alternativamente, las composiciones descritas aquí pueden ser enlazadas, tanto covalentemente como no covalentemente, a la superficie de tales vehículos transportadores.

La formación y uso de preparaciones de liposoma y tipo liposoma como potenciales vehículos de fármacos es generalmente conocida para aquellos con experiencia en el arte (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 de los Estados Unidos 5,567,434; Patente de los Estados Unidos 5,552,157; Patente de los Estados Unidos 5,565,213; Patente de los Estados Unidos 5,738,868 y Patente de los Estados Unidos 5,795,587).

Los liposomas han sido usados con éxito con un cierto número de tipos de células que son normalmente difíciles de transfectar por otros procedimientos, incluyendo suspensiones de células T, cultivos primarios de hepatocitos y células PC 12 (Renneisen et al., J Biol Chem. 1990 Sep 25;265(27):16337-42; Muller et al., DNA Cell Biol. 1990 Apr;9(3):221-9). Adicionalmente, los liposomas están libres de las restricciones de la longitud de ADN que son típicas en los sistemas de administración con base viral. Los liposomas han sido usados efectivamente para introducir genes, diversos fármacos, agentes radioterapéuticos, enzimas, virus, factores de transcripción, efectores alostéricos y similares, a una variedad de líneas celulares cultivadas y animales. Adicionalmente, el uso de liposomas no parece estar asociado con respuestas autoinmunes o toxicidad inaceptable después de la administración sistémica.

En ciertas realizaciones, los liposomas son formados de fosfolípidos que son dispersados en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de doble capa multilamelares concéntricas (también llamadas vesículas multilamelares (MLVs)).

Alternativamente, también son descritas aquí formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones descritas aquí. Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar compuestos de una forma 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 una sobrecarga intracelular polimérica, tales partículas ultrafinas (con tamaño de aproximadamente 0.1  $\mu\text{m}$ ) pueden ser diseñadas usando polímeros que son capaces de ser degradados in vivo. Tales partículas pueden ser hechas como se describe, por ejemplo, por 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 la Patente de los Estados Unidos 5,145,684.

## 5 Terapias contra el cáncer

5 Metodología inmunológicas para terapias contra el cáncer se basan en el reconocimiento de que las células cancerígenas pueden usualmente evadir las defensas del cuerpo contra células y moléculas aberrantes y extrañas, y que éstas defensas pueden ser estimuladas terapéuticamente para recuperar el terreno perdido, por ejemplo, páginas 623-648 en Klein, Immunology (Wiley-Interscience, New York, 1982). Numerosas observaciones recientes  
 10 de que varios efectores inmunes pueden inhibir directa o indirectamente el crecimiento de tumores ha llevado a un renovado interés en esta metodología de terapia contra el cáncer, por ejemplo, Jager, et al., Oncology 2001;60(1):1-7; Renner, et al., Ann Hematol 2000 Dec;79(12):651-9.

15 Cuatro tipos de célula básicos cuyas funciones han sido asociadas con inmunidad celular antitumoral y la eliminación de células tumorales del cuerpo son: i) linfocitos B los cuales secretan inmunoglobulinas al plasma sanguíneo para identificar y marcar las células invasoras no propias; ii) monocitos los cuales secretan las proteínas de complemento que son responsables por romper o procesar las células invasoras objetivo cubiertas por inmunoglobulina; iii) los asesinos naturales, linfocitos que tienen dos mecanismos para la destrucción de células tumorales, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y matanza natural; y iv) linfocitos T que procesan  
 20 receptores antígeno específicos y tienen la capacidad de reconocer una célula tumoral que lleve moléculas marcadoras complementarias (Schreiber, H., 1989, in Fundamental Immunology (ed). W. E. Paul, pp. 923-955).

25 La inmunoterapia contra el cáncer generalmente se enfoca en inducir respuestas humorales inmunes, respuestas celulares inmunes, o ambas. Además, está bien establecido que la inducción de células ayudantes CD4<sup>+</sup>T es necesaria para inducir secundariamente anticuerpos o células citotóxicas CD8<sup>+</sup>T. Antígenos de polipéptido que son selectivos o idealmente específicos para células cancerígenas ofrecen una metodología poderosa para inducir respuestas inmunes contra el cáncer.

30 Las composiciones farmacéuticas descritas aquí pueden ser usadas para estimular una respuesta inmune contra el cáncer. Dentro de tales métodos, las composiciones farmacéuticas descritas aquí son administradas a un paciente, típicamente un animal de sangre caliente, preferiblemente un humano. Un paciente puede o puede no estar afligido por cáncer. Las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden ser administradas antes de o después de la extirpación quirúrgica de tumores primarios y/o tratamiento tal como la administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales. Como se discute arriba, la administración de las composiciones farmacéuticas  
 35 puede ser realizada por cualquier método apropiado, incluyendo la administración por ruta intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica, anal, vaginal, tópica y oral.

40 Dentro de ciertas realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia activa, en la cual el tratamiento depende en la estimulación in vivo del sistema inmune endógeno del huésped para reaccionar contra tumores con la administración de agentes modificadores de la respuesta inmune (tales como polipéptidos y polinucleótidos como los que se proveen aquí).

45 Las rutas y frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas descritas aquí, como también la dosificación, variarán de un individuo a otro, y pueden ser fácilmente establecidas usando técnicas estándar. En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas puede ser administradas por inyección (por ejemplo, intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), intranasal (por ejemplo, por aspiración) u oralmente. Preferiblemente, entre 1 y 10 dosificaciones pueden ser administradas en un periodo de 52 semanas. Preferiblemente, se administran 6 dosificaciones, a intervalos de 1 mes, y pueden ser administrados refuerzos de vacunaciones periódicamente a partir de entonces. Protocolos alternativos pueden ser apropiados para pacientes  
 50 individuales. Una dosificación adecuada es una cantidad de un compuesto que, cuando es administrada como se describe arriba, es capaz de promover una respuesta inmune antitumoral, y está por lo menos 10-50% por encima del nivel basal (es decir, sin tratamiento). Tal respuesta puede ser monitorizada midiendo los anticuerpos antitumorales en un paciente o por la generación dependiente de vacunación de células citolíticas efectoras capaces de matar las células tumorales del paciente in vitro. Tales vacunas también deben ser capaces de causar una  
 55 respuesta inmune que conlleva un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia completa, parcial o más larga libre de enfermedad) en pacientes vacunados en comparación con pacientes no vacunados. En general, para composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden uno o más polipéptidos, la cantidad de cada polipéptido presente en una dosificación varía desde aproximadamente 25 µg a 5mg por kg del huésped. Tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del paciente, pero típicamente  
 60 oscilan desde aproximadamente 0.1 mL a aproximadamente 5 mL.

65 En general, una dosificación y un régimen de tratamiento apropiados proveen el compuesto(s) activo en una cantidad suficiente para proveer beneficios terapéuticos y/o profilácticos. Tal respuesta puede ser monitorizada estableciendo un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia completa, parcial o más larga libre de enfermedad) en pacientes tratados en comparación con pacientes no tratados. Aumentos en respuestas inmunes preexistentes a una proteína tumoral generalmente se correlacionan con un

resultado clínico mejorado. Tales respuestas inmunes pueden generalmente ser evaluadas usando proliferación estándar, análisis de citotoxicidad o citoquina, los cuales pueden ser realizados usando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

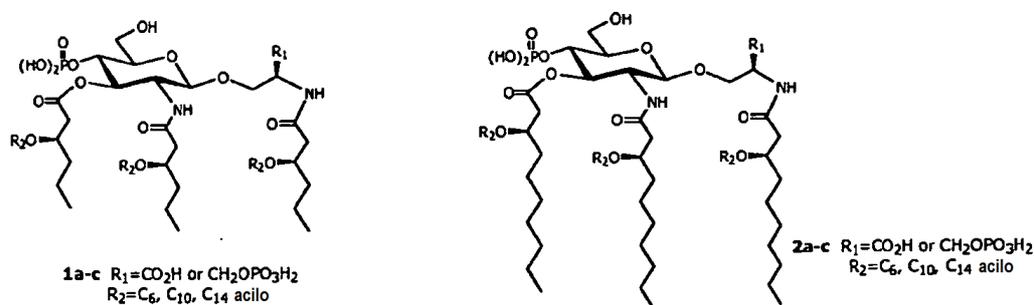
- 5 La presente invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes Ejemplos y Ejemplos de Prueba no limitantes que son dados para propósitos ilustrativos solamente.

Ejemplos

- 10 Ejemplo 1

Modificaciones de la cadena acilo graso primaria

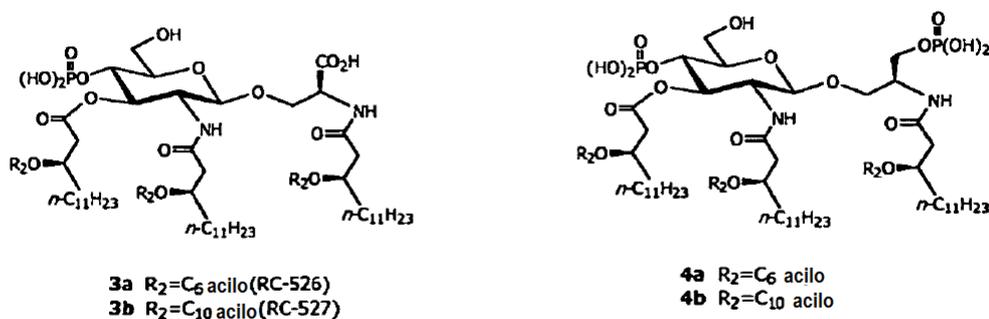
- 15 Este ejemplo describe la preparación de derivados primarios de ácidos grasos que tienen cadenas acilo graso primarias de longitud variable, solas o en combinación con cadenas variables de ácido graso secundarias. Por ejemplo, los compuestos 1a-c y 2a-c, donde ácidos grasos primarios de cadena corta (C<sub>6</sub>) y cadena mediana (C<sub>10</sub>) son combinados con ácidos grasos secundarios de cadena corta, mediana, o larga.



- 20 NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

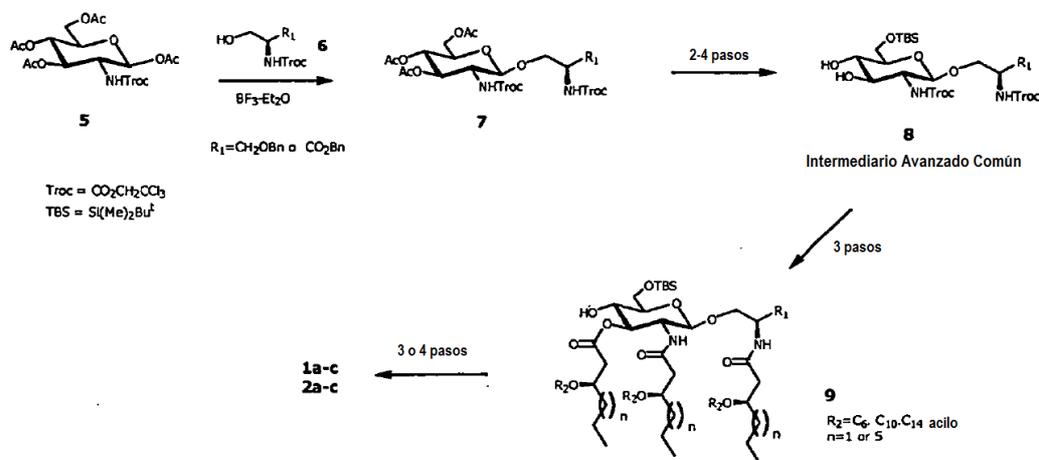
Estos compuestos son preparados usando aglucona de serina (R<sub>1</sub>=CO<sub>2</sub>H) bien establecida, o alternativamente, usando una unidad químicamente más estable e ionizable de aglucona de fosfato de serinol (R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>OP<sub>3</sub>H<sub>2</sub>). La selección de fosfato de seril/serinol será basada en la comparación de las actividades biológicas de los derivados de serilo conocidos 3a,b con fosfatos de serinol novedosos 4a,b.

- 25



NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

- 30 Los derivados de los compuestos de cadena primaria modificados son sintetizados por una modificación de un método previamente descrito (B1 en Johnson et al., Patente de los Estados Unidos No. 6,355,251) utilizando un intermediario avanzado común que permite la producción de ácidos de aciloxilo enlazados con amida y éster cerca del final de la síntesis (Esquema I). El paso inicial en la síntesis es la glicosilación del aceptor 6 con el tetraacetato 5 conocido (preparado en 4 pasos desde la glucosamina) para dar β-glicósido 7 y la conversión de 7 a un intermediario conocido común (CAI) 8, el cual es optimizado para R<sub>1</sub>=CO<sub>2</sub>Bn. La 4-O-acilación selectiva y N-desprotección/acilación resulta en el derivado de hexaacilo 9, el cual es convertido en 3-4 pasos a 1a-c o 2a-c a través de fosforilación y desbloqueo.
- 35



NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION

Esquema I

5

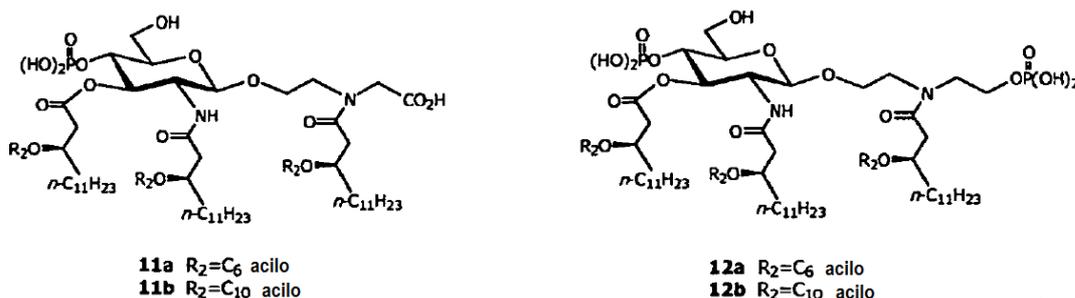
Los ácidos requisito (R)-3-n-alcanoiloxialcanoicos son preparados de acuerdo a Keegan et al., Tetrahedron: Asymmetry; 7(12):3559-3564, 1996, empezando con los ésteres de 3-oxo metilo apropiados. La alta pureza química y diastereomérica de los productos 1 y 2 es lograda por cromatografía de fase normal o gel de sílice o, alternativamente, a través de cromatografía en celulosa o cromatografía de partición líquido-líquido en gel Sephadex LH-20. La pureza de las sales de trietilamonio aisladas es establecida por espectroscopía (IR, <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN) y medios físicos (análisis de combustión, FAB-MS), como también por HPLC.

10

Ejemplo 2

15 Compuestos de Glicilo y fosfonooxietilo (PE)

El ejemplo describe la síntesis de los compuestos de glicilo 11a,b y compuestos de fosfonooxietilo (PE) 12a,b, los cuales son casi regioisoméricos con 3a,b y 4a,b.



20

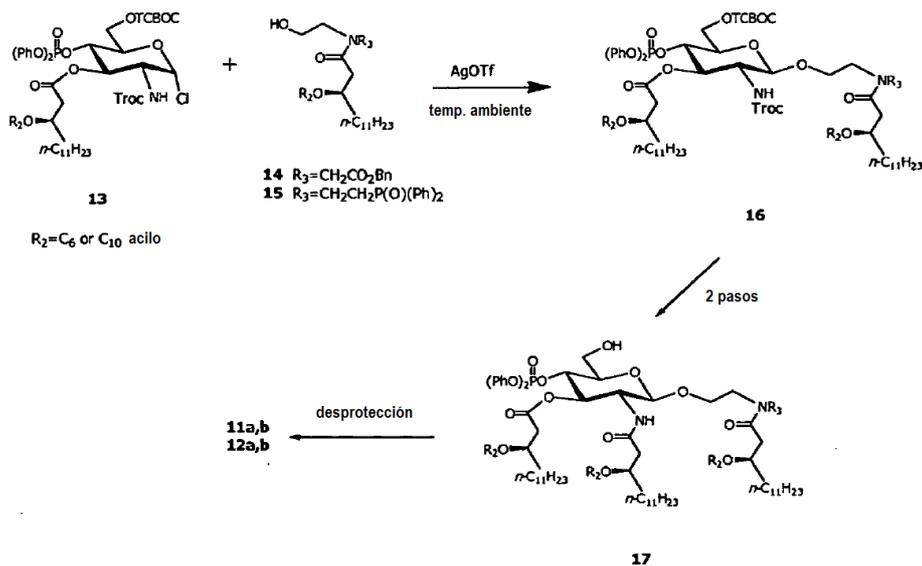
NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

25

Estos compuestos son más fácilmente preparados por una síntesis más convergente que la que se describe en el Esquema I, en el cual un donante común glicosilo  $\text{C}_6$  o  $\text{C}_{10}$  13 es acoplado con una unidad aceptador N-acilada (o, alternativamente, N-Troc protegida- no mostrada) 14 o 15 en la presencia de un ión de plata para dar  $\beta$ -glicosidos 16 (Esquema II). El aceptador de glicina 14 es preparado de acuerdo con Bulusu et al., J Med Chem; 35(19):3463-3469, 1992 de etanolamina y bromoacetato de bencilo (o t-butilo) seguido por N-acilación o protección. El fosfato 15 es preparado por monofosforilación de dietanolamina N-acilada (o protegida). N-desprotección/acilación o N,N-diacilación en caso de aglucona Troc-protégida (Jiang et al., Tetrahedron; 58(43):8833-8842, 2002) de los  $\beta$ -glicosidos 16 y se espera que la ruptura de los grupos fenilo y otros grupos protectores de la derivada hexaacilada resultante 17 produzca los compuestos deseados 11a,b y 12a,b, los cuales son aislados y caracterizados como sus sales trietilamonio después de la purificación cromatográfica en sílice o gel LH-20 o celulosa DEAE.

30

El Esquema II se muestra abajo:



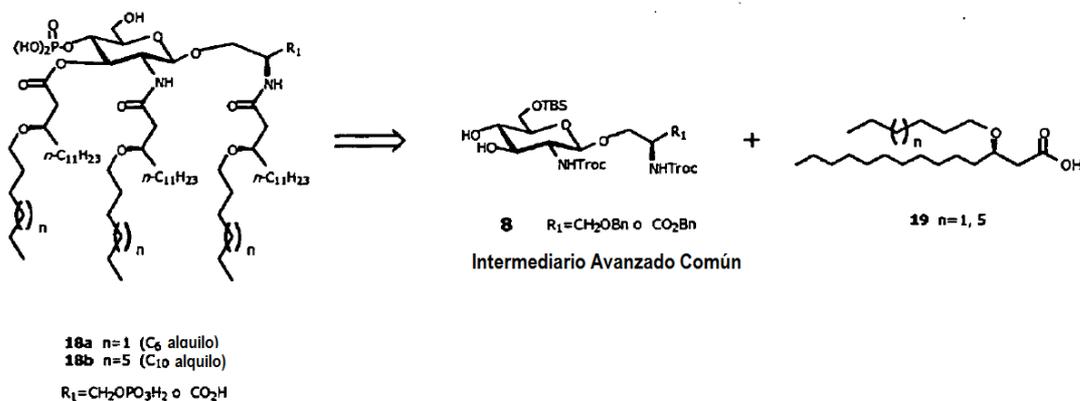
NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

5 Esquema II

Ejemplo 3

10 Lípidos de éter secundarios

15 Este ejemplo describe la síntesis de derivados de ácido (R)-3-alkiloxitetradecanoico (18a,b) los cuales son resistentes a metabolismo no favorable y/o hidrólisis acuosa. Para sintetizar los compuestos 18a,b los análogos de lípidos de éter de los compuestos de ácidos grasos secundarios 3a,b o los fosfatos de serinol correspondientes 5a,b deben hacerse inicialmente. Como se muestra retrosintéticamente en el Esquema III, la síntesis de las moléculas objetivo 18a,b puede ser lograda sustituyendo el ácido (R)-3-hexiloxitetradecanoico o el ácido (R)-3-deciloxitetradecanoico por los aciloxiácidos correspondientes empezando con la 3-O-acilación selectiva del intermediario común avanzado 8 en el Esquema I y procediendo a través del intermedio 9 ( $R_2 = C_6 \text{ o } C_{10}$  alquilo,  $n=9$ ). Los alkiloxiácidos requisito 19 son sintetizados a partir de ácido (R)-3-hidroxitetradecanoico o su éster de fenacilo, intermedios en las síntesis aciloxiácidas, por métodos conocidos con un rendimiento total >50% (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 de los Estados Unidos No: 5,530,113. 1996).

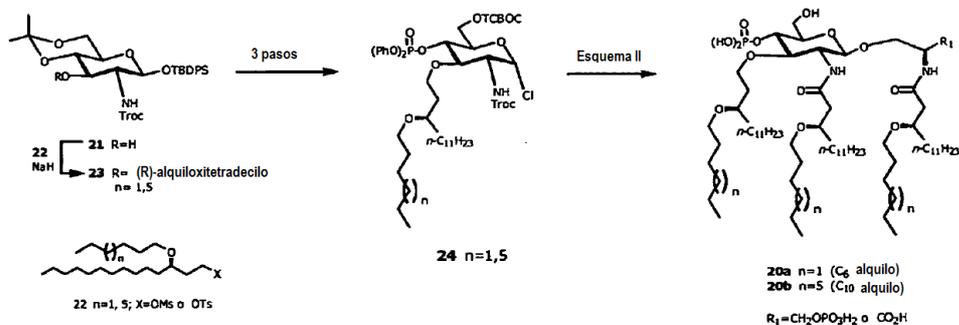


25 Esquema III

Ejemplo 4

30 Lípidos de éter primarios y secundarios

5 Este ejemplo describe los compuestos (20a,b) que contienen un lípido de éter primario en la posición de azúcar C-3 como también tres lípidos de éter secundarios. Estos compuestos son sintetizados por alquilación de acetinida 21, un intermedio en la síntesis del donante glicosilo 13 (Esquema II), con sulfonato 22, el cual a su vez es generado en un paso a partir del alcohol precursor de 19, para producir diéter 23 (Esquema IV). La funcionalización 4,6 y activación anomérica provee cloruro de glicosilo 24, el cual es entonces procesado como en el Esquema II usando los alquiloxiácidos correspondientes en los pasos de N- acilación. En un esquema alternativo, el derivado de 2-azido<sup>42</sup> o 2-trifluoroacetamida<sup>45</sup> puede ser utilizado en el paso de 3-O- alquilación.



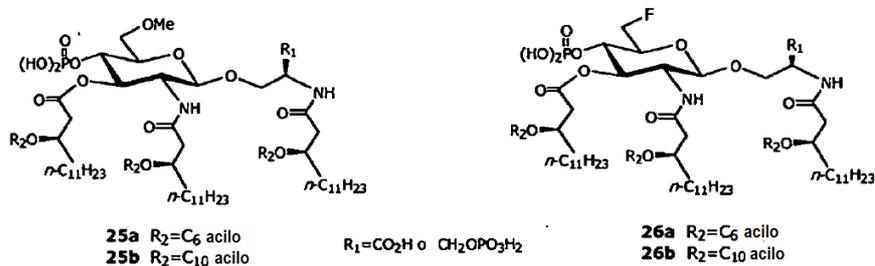
10 Esquema IV

Ejemplo 5

Compuestos modificados C-6

15

Este ejemplo describe los compuestos que tienen un 6-hidroxilo bloqueado. En este ejemplo un éter de metilo o un grupo fluoro es usado en conjunción con compuestos serilo o serinol de fosfato 25a,b y 26a,b.

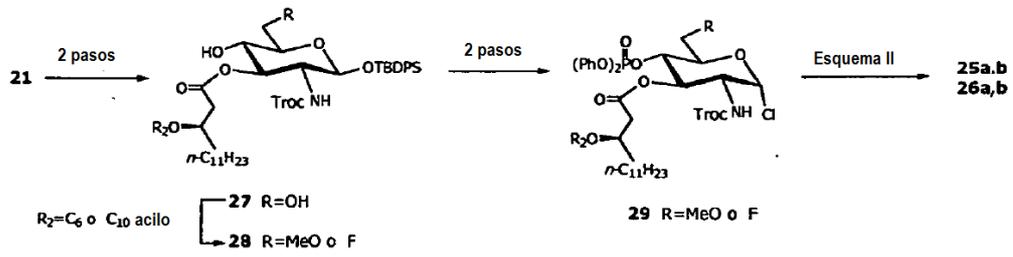


NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

20

Los compuestos son preparados de diol 27 como se muestra en el Esquema V. El intermedio 27, obtenido en dos pasos de acetinida 21, es funcionalizado en la posición 6 por métodos conocidos (Christ et al., Patente US No: 5,530,113, 1996; Watanabe et al., Carbohydr Res; 333(3):203-231, 2001) para producir alcohol 28. La conversión de 28 a los cloruros 29 en dos pasos y la elaboración de acuerdo al Esquema II provee las moléculas objetivo 25a,b y 26a,b. Compuestos con enlaces de éter primarios y/o secundarios como se describen en el Ejemplo 4 arriba pueden ser modificados como se describe en este ejemplo para adicionalmente proteger las moléculas contra la degradación química y enzimática.

25



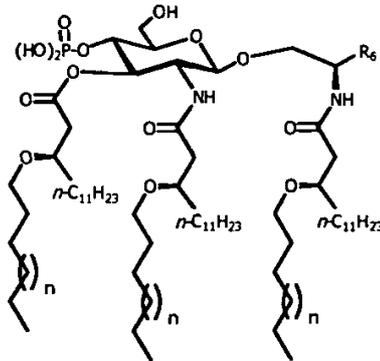
NO SON COMPUESTOS DE LA INVENCION REIVINDICADA

Esquema V

5 Se entiende que los anteriores ejemplos son simplemente ilustrativos de la presente invención.

Reivindicaciones

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



5

donde  $n$  es 1 o 5 y  $R_6$  es  $COOH$  o  $CH_2OP_3H_2$ .

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde  $n$  es 1.

10

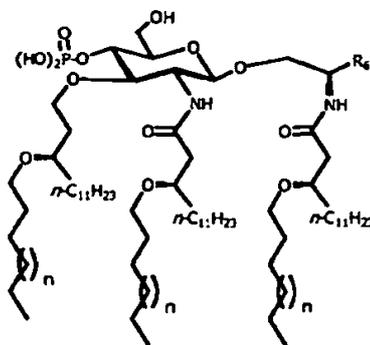
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde  $n$  es 5.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 donde  $R_6 = COOH$ .

15

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 donde  $R_6 = COOH$ .

6. Un compuesto que tiene la fórmula:



20

donde  $n$  es 1 o 5 y  $R_6$  es  $COOH$  o  $CH_2OPO_3$ .