

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 755**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C07F 9/6561 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2013 PCT/EP2013/054548**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13131985**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2013 E 13708142 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2822947**

54 Título: **Sales de arginina de un agonista de TLR7**

30 Prioridad:

07.03.2012 US 201261608011 P

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

20.01.2017

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)

Rue de l'Institut 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

DODD, STEPHANIE KAY y

JAIN, SIDDARTHA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 597 755 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

Sales de arginina de un agonista de TLR7

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. n.º 61/608.011, que se envió el 7 de marzo de 2012.

Campo técnico

La presente invención está en el campo de formas de sal de un compuesto inmunopotenciador y su formulación para uso *in vivo*. En particular la presente invención se refiere a sales de arginina.

Listado de secuencias

10 La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado a través de la Web EFS. La copia ASCII, creada el 4 de marzo de 2013 se llama 54848_SeqListing.TXT y tiene 24.989 bytes de tamaño.

Antecedentes de la invención

15 La detección temprana de clases específicas de patógenos se realiza por el sistema inmune innato con la ayuda de receptores de reconocimiento de patrón (PRR, por sus siglas en inglés). Los patógenos detectados incluyen virus, bacterias, protozoos y hongos y cada uno expresa constitutivamente un grupo de moléculas resistentes a mutación, específicas de clase llamadas patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP, por sus siglas en inglés).

20 Los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) son una familia importante de PRR y se expresan ampliamente en células del sistema inmune innato, incluyendo células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés), macrófagos, mastocitos, neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Los TLR tienen especificidad amplia para patrones moleculares conservados compartidos por bacterias, virus y parásitos.

Se ha caracterizado un número de TLR diferentes. Estos TLR enlazan y se tornan activados por diferentes ligandos, los cuales a su vez se ubican en diferentes organismos o estructuras. El desarrollo de compuestos inmunopotenciadores que son capaces de producir respuestas en TLR específicos tienen interés en la técnica.

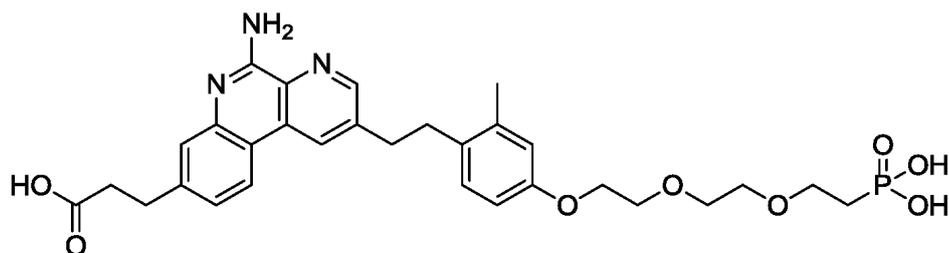
25 Por ejemplo, la referencia 1 describe una clase amplia de inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIP, por sus siglas en inglés) que son compuestos agonistas de TLR7. Composiciones inmunogénicas y las composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos son también se describen en la referencia.

Es un objeto de la presente invención proporcionar formas de sal de un compuesto TLR7 específico que tiene la fórmula (I) mostrada a continuación que tiene propiedades mejoradas, tales como solubilidad mejorada y fotoestabilidad y reduce la naturaleza gelificante de la sal cuando se compara con la base libre.

30 El documento WO 2011/049677 A1 se refiere a composiciones para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a los Receptores 7 tipo Toll. El documento WO2011027222 A2 se refiere a composiciones para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a los Receptores 7 tipo Toll. El documento WO2013030378 A1 se refiere a antígenos adyuvantes de *S. aureus* con una mezcla de un agonista de TLR y una sal metálica insoluble.

Divulgación de la invención

35 La presente invención se refiere a sales de un compuesto inmunopotenciador de fórmula (I) mostrada a continuación, siendo dicho compuesto un agonista de TLR7 humano, el ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo(f)(1,7) naftiridin-8-il)propanoico.



Fórmula (I)

40 En particular, la presente invención se refiere a sales de arginina del compuesto de fórmula (I). En estudios en diferentes formas de sal del compuesto anterior la sal de arginina se descubrió sorprendentemente que es la más favorable a través de un intervalo de criterios de ensayo como solubilidad, rendimiento, fotoestabilidad, estabilidad

del contraíón y termoestabilidad a pH fisiológico. En particular, las sales de arginina de la presente invención muestran una fotoestabilidad mejorada en solución cuando se comparan con el compuesto base libre de fórmula (I).

5 Debido a la naturaleza multibásica tanto del compuesto de fórmula (I) como de la arginina, las sales de la presente invención pueden existir en diversas estequiometrias con respecto al número de moles del compuesto de fórmula (I) y el contraíón de arginina. Por ejemplo, la estequiometría del compuesto de fórmula (I):arginina puede ser 1:1, 1:2 o 1:3. Preferentemente, la estequiometría es 1:1.

Las sales de la presente invención pueden ser solvatadas o no solvatadas. Por ejemplo, las sales pueden existir como formas hidratadas o anhidras. Las sales pueden existir como mono o di-hidratos (es decir que contienen 1 o 2 moles de agua). Preferentemente, la sal es un monohidrato.

10 Las sales de arginina de la presente invención pueden existir como sólidos amorfos o cristalinos. Alternativamente, las sales existen como sólidos parcialmente cristalinos que contienen tanto sólidos amorfos como cristalinos. En un aspecto de la presente invención, las sales son sustancialmente amorfas que contienen porciones del orden de intervalo corto. En una realización, la forma cristalina de la sal exhibe al menos los siguientes picos de difracción de polvo de rayos X, expresados en grados 2 θ ; 10, 14 y 18,5. La forma de sal puede tener un patrón de difracción de 15 polvo de rayos X substancialmente igual a aquel mostrado en la Figura 1. Los espectros de RMN de ¹³C y ¹⁵N de las sales de arginina de la presente invención en el estado sólido se muestran en las Figuras 1a y 1b respectivamente.

La presente invención también proporciona una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) para uso en terapia. La presente invención además proporciona el uso de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para uso en terapia. En cada caso, la terapia puede ser un procedimiento para aumentar una 20 respuesta inmune en un sujeto.

Se proporciona también un procedimiento para aumentar una respuesta inmune en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento.

25 El PK/PD de los inmunopotenciadores (y en particular agonistas de TLR) puede mejorarse adsorbiéndolos en sales de metal insolubles, tales como sales de aluminio (ver referencia 2). La adsorción estable de los compuestos tiene lugar idealmente por intercambio de ligando por medio de una porción adsortiva, tal como un grupo fosfonato, el cual puede mediar la adsorción. Los SMIP que tienen porciones adsortiva pueden retener su actividad inmunológica *in vivo* cuando se suministra en una forma adsorbida, y por lo tanto las propiedades mejoradas de PK/PD no son a costa de la actividad. La adsorción de los compuestos significa que tienen mayor tiempo de residencia en sitios de 30 inyección intramuscular, controlando de esta manera el nivel de exposición sistémica. Una alta exposición sistémica puede originar la producción de altos niveles de citocinas proinflamatorias en la sangre, por lo tanto mayor tiempo de residencia en un sitio de inyección puede minimizar la producción de citocinas proinflamatorias en la sangre, de esta forma mejorando la seguridad y/o tolerabilidad de los compuestos.

35 Este concepto de mejora de propiedades PK/PD de inmunopotenciadores por adsorción a sales de metales insolubles tiene aplicabilidad en la presente invención. De esta forma, la presente invención proporciona una composición que comprende una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento y una sal de metal insoluble. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) como se describe en la presente de la sal de arginina se adsorbe en la sal de metal insoluble. En una realización la composición incluye un tampón.

40 La presente invención también proporciona una composición que comprende una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento, una sal de metal insoluble y un antígeno. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento de la sal arginina de la composición se adsorbe en la sal de metal insoluble.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento, en el que el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto el compuesto de fórmula (I) con arginina en un disolvente, como metanol. El procedimiento puede además comprender cristalizar la sal de arginina, por ejemplo por medio de la adición de etanol al disolvente (por ejemplo a metanol). En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una forma cristalina de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente 50 documento, en el que el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto la sal de arginina de un compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento con un disolvente, tal como isopropanol o acetonitrilo. La arginina puede ser L- o D-arginina o una mezcla racémica. Preferentemente se usa L-arginina.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un complejo adyuvante, que comprende una etapa de mezclar una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) con una sal de metal insoluble de tal forma que el compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento de la sal de arginina se adsorbe a la sal de metal insoluble para formar el complejo. La presente invención también proporciona un complejo adyuvante obtenido u obtenible por este procedimiento. El complejo puede mezclarse con un inmunógeno para proporcionar una composición inmunogénica. En otro aspecto, la presente invención proporciona

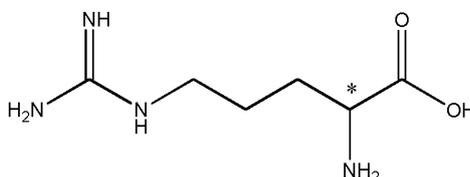
un procedimiento para preparar un complejo adyuvante estéril, que comprende las etapas de: (i) mezclar una sal de arginina del compuesto de la fórmula (I) con una sal de metal insoluble de tal forma que el compuesto de la fórmula (I) como se describe en el presente documento de la sal de arginina se adsorbe a la sal de metal insoluble para formar el complejo; y (ii) esterilizar el complejo. La presente invención también proporciona un complejo adyuvante estéril obtenido u obtenible por este procedimiento. El complejo estéril puede mezclarse con un antígeno para proporcionar una composición inmunogénica. La esterilización puede lograrse convenientemente por llevar a autoclave (o procedimientos similares [3]).

La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar un complejo adyuvante estéril, que comprende las etapas de: (i) esterilizar una solución o suspensión de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento; y (ii) combinar la solución o suspensión esterilizada con una sal de metal insoluble estéril. La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar un complejo adyuvante estéril, que comprende las etapas de: (i) esterilizar una sal de metal insoluble; y (ii) combinar la sal de metal insoluble esterilizada con una solución o suspensión estéril de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento. La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar un complejo adyuvante estéril, que comprende una etapa de combinar una solución o suspensión estéril de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento con una sal de metal insoluble estéril. La esterilización de la solución/suspensión de sal de arginina puede lograrse convenientemente por filtración estéril y este material puede prepararse en forma concentrada. La esterilización de la sal de metal insoluble puede lograrse convenientemente por llevar a autoclave. La sal de metal insoluble estéril puede ser típicamente una suspensión acuosa. La presente invención también proporciona un complejo adyuvante estéril obtenido u obtenible por cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica, en el que el procedimiento comprende mezclar una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento, una sal de metal insoluble y un inmunógeno, de esta manera proporcionando la composición inmunogénica. La presente invención también proporciona una composición inmunogénica obtenida u obtenible por este procedimiento.

Arginina

La arginina es un α -aminoácido que tiene la fórmula mostrada a continuación.



La arginina tiene un centro quiral (el átomo de carbono marcado con un asterisco) y puede existir en las denominadas formas L o D. La forma L de arginina tiene una estereoquímica absoluta de *S* en su centro quiral mientras que la forma D tiene una estereoquímica absoluta de *R* en su centro quiral.

Tanto L-arginina como D-arginina son capaces de formar sales con compuestos ácidos debido a sus propiedades básicas del grupo guanidinio. En algunas realizaciones, las sales de arginina de la presente invención se forman entre el compuesto de fórmula (I) descrito en el presente documento y L-arginina. En algunas realizaciones las sales de arginina de la presente invención se forman entre el compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento y D-arginina. Preferentemente, la sal de arginina del compuesto de fórmula (I) descrito en el presente documento es la sal de L-arginina.

Sales de metal insoluble

El compuesto inmunopotenciador descrito en el presente documento (es decir los compuestos de fórmula (I)) de las formas de sal de arginina puede adsorberse a sales de metal insoluble, de esta manera formando un complejo adsorbido. Por ejemplo, el compuesto inmunopotenciador descrito en el presente documento de las formas de sal de arginina puede adsorberse a sales de calcio insolubles (por ejemplo, fosfato de calcio) o preferentemente a sales de aluminio insolubles. Tales sales de aluminio tienen una larga historia de uso en vacunas, como adyuvantes, por ejemplo. Las sales de aluminio que incluyen iones hidróxido son las sales de metal insoluble preferidas para usar con la presente invención.

De esta forma la presente invención proporciona diversas realizaciones en las cuales el compuesto de la fórmula (I) de las sales de arginina descritas en el presente documento se adsorbe a tales sales de metal insolubles.

Las sales de aluminio útiles incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de aluminio, oxihidróxido de aluminio e hidroxifosfatos de aluminio (incluyendo sulfato de hidroxifosfato y aluminio). Las sales son descritas por ejemplo en los capítulos 8 y 9 de la referencia 4.

Las sales de metal insolubles preferidas son oxihidróxidos de aluminio y/o hidroxifosfato de aluminio. Estas tienen restos de hidroxilo superficiales que pueden fácilmente someterse a intercambio de ligando con el grupo fosfonato del compuesto inmunopotenciador para proporcionar adsorción estable.

5 Los adyuvantes comúnmente conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que son normalmente al menos parcialmente cristalinos. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse por la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, puede distinguirse de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, por espectroscopía infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción en 1070 cm^{-1} y una arista fuerte en $3090\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ (capítulo 9 de la referencia 4). Se refleja el grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio por el ancho de la banda de difracción en altura media (WHH por sus siglas en inglés) mostrando las partículas deficientemente cristalinas un ancho de línea mayor debido a tamaños de cristalito más pequeños. El área superficial se aumenta en cuanto se aumenta WHH y se ha visto que adyuvantes con mayores valores WHH para tener mayor capacidad para adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en micrografías de electrones de transmisión) es típica para adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de adyuvantes de hidróxido de aluminio está de forma típica aproximadamente en 11 es decir el adyuvante por sí mismo tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han informado capacidades adsorptivas de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{3+} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

10 Los adyuvantes comúnmente conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, frecuentemente también que contienen una cantidad pequeña de sulfato (es decir sulfato de aluminio e hidroxifosfato). Pueden obtenerse por precipitación y las condiciones de reacción y concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato para hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos generalmente tienen una relación molar $\text{PO}_4^{3-}/\text{Al}^{3+}$ entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse de AlPO_4 estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR en 3164 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta a $200 \text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la referencia 4).

15 La proporción molar $\text{PO}_4^{3-}/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio generalmente será entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2 y más preferentemente 0,95 + 0,2. El fosfato de aluminio generalmente será amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con proporción molar de $\text{PO}_4^{3-}/\text{Al}^{3+}$ entre 0,84 y 0,92, incluido en 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio generalmente será particulado (por ejemplo, morfología tipo plato como se observa en micrografías de electrones de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Las capacidades adsorptivas de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg Al^{3+} en pH 7,4 se han informado para adyuvantes de fosfato de aluminio.

20 El punto de carga cero (PZC, por sus siglas en inglés) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con grado de sustitución de fosfato para hidroxilo y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y concentración de reactivos usados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera por cambiar la concentración de iones de fosfato libres en solución (más fosfato = más PZC ácido) o por añadir un tampón como tampón de histidina (hace PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la presente invención generalmente tienen un PZC de entre 4,0 y 7,0 más preferentemente entre 5,0 y 6,5 por ejemplo aproximadamente 5,7.

25 En solución tanto el fosfato de aluminio como los adyuvantes de hidróxido tienden a formar agregados porosos estables de 1-10 μm de diámetro [5].

Una composición que incluye la forma de sal de la presente invención adsorbida a una sal de metal insoluble puede también incluir un tampón (por ejemplo un tampón fosfato o uno histidina o uno Tris).

30 Debido a la insolubilidad de las sales de metal adsorptivos las cuales son útiles con la presente invención, las composiciones que contienen la forma de sal adsorbida de la presente invención generalmente serán suspensiones que tienen una apariencia nebulosa. Esto puede enmascarar crecimiento bacteriano contaminante y por lo tanto una composición de la presente invención puede incluir un conservador como tiomersal o 2- fenoxietanol. Se prefiere que una composición deba ser sustancialmente libre de (por ejemplo $<10 \mu\text{g}/\text{ml}$) de material de mercurio por ejemplo libre de tiomersal. Se prefieren más vacunas que no contienen mercurio.

35 Una composición puede incluir una mezcla tanto de hidróxido de aluminio como sales de fosfato de aluminio, y la forma de sal de arginina del compuesto de fórmula (I) descrita en el presente documento puede adsorberse a una o ambas de estas sales de metal.

40 La concentración de Al^{3+} en una composición para administración a un paciente es preferentemente menos de 10 mg/ml por ejemplo $\leq 5 \text{ mg}/\text{ml}$, $\leq 4 \text{ mg}/\text{ml}$, $\leq 3 \text{ mg}/\text{ml}$, $\leq 2 \text{ mg}/\text{ml}$, $\leq 1 \text{ mg}/\text{ml}$, etc. Un intervalo preferido está entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de $< 0,85 \text{ mg}/\text{dosis}$. Ya que la inclusión de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) puede mejorar el efecto de adyuvante de sales de aluminio entonces la presente invención permite ventajosamente cantidades menores de Al^{3+} por dosis, y por lo tanto una composición de la presente invención puede incluir útilmente entre 10 y 250 μg de Al^{3+} por unidad de dosis. Las vacunas pediátricas actuales incluyen típicamente por lo menos 300 μg de Al^{3+} . En términos de concentración, una composición de la presente invención

puede tener una concentración de Al^{3+} entre 10 y 500 $\mu\text{g/ml}$ por ejemplo entre 10-300 $\mu\text{g/ml}$, entre 10-200 $\mu\text{g/ml}$, o entre 10-100 $\mu\text{g/ml}$.

En general, cuando una composición incluye tanto una sal de arginina de la presente invención como una sal de aluminio, la proporción en peso de agonista a Al^{3+} será menor de 5:1 por ejemplo menor de 4:1, menor de 3:1, menor de 2:1 o menor de 1:1. De esta forma, por ejemplo, con una concentración de Al^{3+} de 0,5 mg/ml la concentración máxima de una sal de arginina de la presente invención puede ser 2,5 mg/ml. Pero pueden usarse niveles superiores o inferiores; una masa menor de sal de arginina que de Al^{3+} es típica por ejemplo por dosis, 100 μg de sal de arginina con 0,2 mg de Al^{3+} . Un máximo de 2,5 mg del compuesto de fórmula 1 por unidad de dosis humana (por ejemplo por 0,5 ml de inyección) es preferido.

Donde una composición incluye una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento y una sal de metal insoluble, se prefiere que por lo menos 50 % (por masa) del inmunopotenciador en la composición sea adsorbido a la sal de metal por ejemplo $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, o incluso $\geq 100\%$. Un mínimo de 80 % de adsorción es típico, y por lo menos se prefiere 90 % o 95 %.

Como se analiza anteriormente, como un resultado de adsorción a una sal de metal insoluble el comportamiento in vivo de SMIP puede modificarse. De esta forma un SMIP adsorbido puede exhibir un tiempo de residencia mayor (por ejemplo por lo menos 2 veces más largo) en inyección muscular después de intramuscular, con relación al mismo SMIP inyectado en una forma no adsorbida. Puede ocurrir alguna eliminación, pero una porción detectable del SMIP inyectado estará todavía presente. De esta forma, por ejemplo, un SMIP adsorbido puede, cuando se inyecta intramuscularmente, todavía estar presente en el músculo inyectado por lo menos 12 horas después por ejemplo 24 horas más tarde.

En algunas realizaciones, una sal de arginina adsorbida puede exhibir una concentración de suero de pico menor, con relación a la forma no adsorbida. Este pico es usualmente expresado como un valor C_{max} . Por ejemplo, una forma adsorbida puede, cuando se inyecta intramuscularmente, tener un valor C_{max} sérico menor que cuando se inyecta intramuscularmente en una forma no adsorbida (por ejemplo $<95\%$ de la C_{max} no adsorbida, $<80\%$ de la C_{max} no adsorbida, $<50\%$ de la C_{max} no adsorbida, o incluso $<30\%$ de la C_{max} no adsorbida).

En algunas realizaciones, la sal de arginina adsorbida puede exhibir una exposición sistémica total inferior después de la inyección, con relación a la misma sal no inyectada en forma no adsorbida. Los niveles de exposición sistémica se expresan usualmente como valores AUC (área bajo la curva de tiempo - concentración) (por ejemplo en h-nM). Ventajosamente, por ejemplo, un SMIP adsorbido puede, cuando se inyecta intramuscularmente, tener un valor AUC sérico inferior en las 24 horas siguientes a la inyección que la misma sal de arginina cuando se inyecta intramuscularmente en forma no adsorbida (por ejemplo $<90\%$ de la AUC no adsorbida, $<80\%$ de la AUC no adsorbida o incluso $<50\%$ de la AUC no adsorbida, etc.).

Inmunógenos

Los complejos de formas de sal del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento adsorbidos a sales de metal insolubles son útiles durante la inmunización. Un complejo adsorbido de la presente invención puede de esta forma usarse junto con uno o más antígenos. Los complejos de antígeno pueden proporcionarse como una mezcla o pueden proporcionarse separadamente para uso después de mezclado. En algunas realizaciones, una forma de sal de la presente invención puede combinarse con un antígeno en la ausencia de una sal de metal insoluble y puede después de esto ser ya sea administrada a un mamífero o puede combinarse con una sal de metal insoluble para administración tardía a un mamífero.

La presente invención puede usarse con un intervalo amplio de antígenos, para tratar o proteger contra un intervalo amplio de enfermedades. El antígeno puede producir una respuesta inmunológica que protege contra una enfermedad viral (por ejemplo debido a un virus desarrollado o no desarrollado), una enfermedad bacteriana (por ejemplo debido a bacterias Gram negativas o Gram positivas), una enfermedad fúngica, una enfermedad parásita, una enfermedad autoinmunitaria, o cualquier otra enfermedad. El antígeno puede también ser útil en inmunoterapia por ejemplo para tratar un tumor/cáncer, enfermedad de Alzheimer o una adicción.

El antígeno puede tomar varias formas por ejemplo un organismo entero, una vesícula de membrana externa, un polipéptido, un sacárido, un liposacárido, un conjugado (por ejemplo de un portador y un hapteno, o de un portador y sacárido o liposacárido), etc. Donde el antígeno es un polipéptido será típicamente un polipéptido superficial por ejemplo una adhesina, hemaglutinina, glicoproteína de cubierta, glicoproteína pico, etc.

El antígeno puede producir una respuesta inmunológica contra un virus de gripe, incluyendo gripe de virus A y B. Varias formas de antígeno de virus de gripe están actualmente disponibles, típicamente en base ya sea en virus vivo o virus inactivado. Vacunas inactivadas pueden basarse en viriones enteros, viriones de división, o en antígenos superficiales purificados. Los antígenos de gripe pueden también presentarse en la forma de virosomas. La hemaglutinina es el antígeno principal en vacunas inactivadas actuales, y dosis de vacuna son estandarizadas por referencia a niveles de HA, típicamente medidas por SRID. Vacunas existentes contienen típica y aproximadamente 15 μg de HA por cadena, aunque dosis menores pueden usarse por ejemplo por niños o en situaciones pandémicas,

o cuando se usan como adyuvante. Dosis fraccionales como $\frac{1}{2}$ (es decir 7,5 μg de HA por cepa), $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{8}$ se han usado, como tener dosis superiores (por ejemplo, 3x o 9 x dosis (6,7)). De esta forma las composiciones pueden incluir entre 0,1 y 150 μg de HA por cepa de gripe, preferentemente entre 0,1 y 50 μg por ejemplo 0,10-20 μg , 0,1-15 μg , 0,1-10 μg , 0,1-7,5 μg , 0,5-5 μg , etc. Dosis particulares incluyen por ejemplo aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5 etc. por cepa. Es usual incluir substancialmente la misma masa de HA para cada cepa incluida en la vacuna por ejemplo de tal forma que la masa de HA para cada cepa está dentro de 10 % de la masa HA promedio por cepa y preferentemente dentro de 5% del promedio. Para vacunas vivas, la dosificación es medida por dosis infecciosa de cultivo de tejido medio (TCID₅₀ por sus siglas en inglés) más que el contenido de HA, y una TCID₅₀ de entre 10^6 y 10^8 (preferentemente entre $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$) por cepa es típico. Más que el uso de huevos SPF como el substrato para crecimiento viral, donde el virus es cosechado a partir de fluidos alantoicos infectados de huevos de gallina, pueden usarse líneas celulares que soportan replicación de virus de gripe. La línea celular será típicamente de origen mamífero por ejemplo MDCK. Antígenos de virus A de gripe pueden ser de cualesquiera cepa subtipo HA adecuada por ejemplo H1, H3, H5, H7, H9 etc., como cepa H1N1, H3N2 y/o H5N1.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra un hongo de cándida como *C. albicans*. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un β -glucano, el cual puede conjugarse a una proteína portadora. El glucano puede incluir enlaces β -1,3 y/o β -1,6. Los inmunógenos adecuados incluyen aquellos descritos en las referencias 8 y 9.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra una bacteria *Streptococcus*, incluyendo *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un sacárido capsular, el cual puede conjugarse a una proteína portadora. Para *S. agalactiae* el sacárido puede ser de uno o más de serotipos Ia, Ib, II, III y/o V. Para *S. pneumoniae* el sacárido puede ser de uno o más de serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y/o 23F. Además de (o en lugar de) inmunógeno o inmunógenos de sacárido capsular, pueden usarse inmunógenos de polipéptido para producir una respuesta inmunológica anti-estreptococos protectora por ejemplo que comprende RrgB, como se describe en la referencia 10.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmune contra una bacteria de *Staphylococcus*, incluyendo *S. aureus* o *S. epidermidis*. Por ejemplo, el inmunógeno puede comprender un antígeno IsdA, un antígeno IsdB, un antígeno ClfA, un antígeno ClfB, un antígeno SdrD, un antígeno Spa, un antígeno EsxA, un antígeno EsxB, un antígeno Sta006, una hemolisina, y/o un antígeno Sta011. Los inmunógenos de *S. aureus* y sus combinaciones se describen en la referencia 11.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra una bacteria de meningococo (*Neisseria meningitidis*). Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un sacárido capsular, el cual puede conjugarse a una proteína portadora. Los sacáridos capsulares son particularmente útiles para proteger contra serogrupos de meningococos A, C, W135 y/o Y. Además de (o en lugar de) antígenos de sacárido capsulares, antígenos de polipéptido y/o vesículas de membrana externa pueden usarse para producir una respuesta inmunológica antimeningococo protectora, particularmente para uso contra serogrupo B por ejemplo como se describe en la referencia 12. Una cantidad típica de sacárido capsular por dosis de unidad de una vacuna está entre 2.5-10 μg , aunque pueden usarse dosis menores con la presente invención debido a la naturaleza ahorro de antígeno de los adyuvantes.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra un virus de hepatitis, como virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C y/o virus de hepatitis E. Por ejemplo, el antígeno puede ser antígeno de superficie de virus de hepatitis B (HbsAg, por sus siglas en inglés). Una cantidad típica de HbsAg por dosis de unidad de una vacuna está entre 5-20 μg , pero dosis menores pueden usarse con la presente invención debido a la naturaleza ahorro de antígeno de los adyuvantes.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra un virus sincitial respiratorio. Los antígenos pueden ser de un grupo A RSV y/o un grupo B RSV. Los inmunógenos adecuados pueden comprender las glicoproteínas F y/o G o fragmentos de los mismos, por ejemplo como se describe en las referencias 13 y 14.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra la bacteria *Chlamydia* incluyendo *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. Los inmunógenos adecuados incluyen aquellos descritos en las referencias 15-21.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra la bacteria *Escherichia coli*, incluyendo cepas patógenas extraintestinales. Los inmunógenos adecuados incluyen aquellos descritos en las referencias 22-24.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra un coronavirus, como el coronavirus SARS humano. Los inmunógenos adecuados pueden comprender la glicoproteína pico.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra una bacteria *Helicobacteri pylori*. Antígenos adecuados incluyen CagA (25-28), VacA (29,30) y/o NAP (31-33).

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra una bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. Los inmunógenos adecuados incluyen el toxoide difteria ("DT"). Una cantidad típica de DT por dosis de unidad de una

vacuna pediátrica es entre 15-30 Lf ("dosis de floculación de cal", aunque dosis menores pueden usarse con la presente invención debido a la naturaleza ahorro de antígeno de los adyuvantes. Cantidades menores son también típicas en vacunas de refuerzo de adolescentes o adultos por ejemplo entre 1-10Lf/dosis.

5 El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra una bacteria *Clostridium tetani*. Los inmunógenos adecuados incluyen toxoide de tétanos ("TT"). Una cantidad típica de TT por dosis de unidad de una vacuna pediátrica está entre 5-15 Lf (dosis de floculación de cal) aunque dosis menores pueden usarse con la presente invención debido a la naturaleza ahorro de antígeno de los adyuvantes. Cantidades menores son también típicas en vacunas de refuerzo de adolescentes o adultos por ejemplo entre 1-5 Lf/dosis.

10 El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra una bacteria *Bordetella pertussis*. Antígenos de *Pertussis* son ya sea celulares (célula entera, en la forma de células *B. pertussis* inactivada "wP") o acelulares ("aP"). Donde se usan inmunógenos acelulares, uno, dos o (preferentemente) tres de los siguientes antígenos son incluidos: (1) toxina pertussis detoxificada (toxidoide pertussis, o "PT"), (2) hemaglutinina filamentosa ("FHA"), (3) pertactina (también conocida como la "proteína de membrana externa de 69 kilodaltons"). El PT puede detoxificarse químicamente o puede ser un PT mutante en el cual la actividad enzimática ha sido reducida por mutagénesis (34) por ejemplo el mutante doble 9k/129G (35). Así como también PT, FHA y pertactina, es también posible incluir fimbriae (por ejemplo aglutinógenos 2 y 3) en un componente de antígeno pertussis acelular. Una cantidad típica de Pt en una vacuna pediátrica es 10-30 μ g/dosis. Una cantidad típica de FHA en una vacuna pediátrica es 15-30 μ g/dosis. Una cantidad típica de pertactina en una vacuna pediátrica es 2-10 inmunógeno /dosis. Dosis menores pueden usarse con la presente invención debido a la naturaleza ahorro de antígeno de los adyuvantes. Cantidades menores son también típicas en vacunas de refuerzo por ejemplo ~3 veces menor.

15 El antígeno puede producir una respuesta inmunológica contra bacterias tipo B de *Haemophilus influenzae* (Hib, por sus siglas en inglés). Los inmunógenos adecuados incluyen conjugados del sacárido capsular Hib (PRP, por sus siglas en inglés) por ejemplo conjugado a toxoide tetánico, toxoide difteria, el derivado CRM197 de toxoide difteria, proteína *H.influenzae* y un complejo de proteína de membrana externa a partir de meningococo del serogrupo B. Una cantidad típica de conjugado Hib (medido como sacárido) está entre 2,5-15 μ g por dosis, aunque dosis menores pueden usarse con la presente invención debido a la naturaleza ahorro de antígeno de los adyuvantes.

20 El antígeno puede producir una respuesta inmunológica contra un poliovirus. Los inmunógenos adecuados incluyen virus inactivados. Una composición típica incluirá tres antígenos de poliovirus - poliovirus del tipo 1 (por ejemplo cepa Mahoney), poliovirus del tipo 2 (por ejemplo cepa MEF-1) y poliovirus tipo 3 (por ejemplo cepa Saukett). Una cantidad típica de poliovirus por dosis es 40 DU ("unidad de antígeno D") para tipo 1, 8 DU para tipo 2, y 32 DU para tipo 3, aunque dosis menores pueden usarse con la presente invención debido a la naturaleza de ahorro de antígeno de los adyuvantes.

25 El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra un citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés). Por ejemplo el antígeno puede ser una glicoproteína recombinante B, por ejemplo el antígeno soluble usado en la referencia 36.

30 El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra un virus de inmunodeficiencia humana por ejemplo contra VIH-1 o VIH-2. Por ejemplo, el antígeno puede ser una glicoproteína de cubierta de VIH. Por ejemplo, las glicoproteínas de cubierta modificadas son disponibles, como gp140, las cuales pueden formar oligómeros (referidos como "o-gp140"). El polipéptido gp140 incluye la secuencia gp120 y el ectodominio de gp41 (37) y ha sido reportado para ser un mejor antígeno que gp120 (38). De esta forma una glicoproteína de cubierta útil puede incluir una porción de gp41 pero no incluir su dominio transmembranal. La forma gp140 de la glicoproteína de cubierta puede tener su circuito V2 eliminado, para dar mutantes gp140AV2, y las eliminaciones han sido reportadas para mejorar inmunogenicidad. Los mutantes AV2 de gp140 han sido mostrados para formar trímeros (39).

35 El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra virus de rabia. Un antígeno adecuado es un virus de rabia inactivado (referencia 40, RabAvert™).

40 El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra un papilovirus humano. Los inmunógenos útiles son proteínas de cápside L1, los cuales pueden ensamblar para formar estructuras conocidas como partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés). Las VLP pueden producirse por expresión recombinante de L1 en células de levaduras (por ejemplo en *S. cerevisiae*) o en células de insectos (por ejemplo en células Spodoptera, como *S. frugiperda*, o en células de *Drosophila*). Para células de levaduras, los vectores de plásmido pueden portar el gen L1, para células de insectos, los vectores de baculovirus pueden portar el gen L1. Más preferentemente, la composición incluye VLP de L1 de tanto cepas HPV-16 y HPV-18. Esta combinación bivalente ha sido mostrada para ser altamente efectiva (41). Además de las cepas HPV-16 y HPV-18, es también posible incluir VLP de L1 a partir de cepas HPV-6 y HPV-11.

45 El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra un antígeno de tumor, como MAGE-1, MAGE- 2, MAGE-3, (MAGE-A3), MART-1/Melan A, tirosinasa, gp100, TRP-2, etc.) El antígeno puede producir una respuesta inmunoterapéutica contra cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, etc.

El inmunógeno puede producir una respuesta inmunológica contra un hapteno conjugado a una proteína portadora, donde el hapteno es un fármaco de abuso (42). Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, opiatos, marihuana, anfetaminas, cocaína, barbituratos, glutetimida, metiprilon, cloral hidratado, metaqualona, benzodiazepinas, LSD, nicotina, fármacos anticolinérgicos, fármacos antipsicóticos, triptamina, otros fármacos psicomiméticos, sedantes, fenciclidina, psilocibina, nitrito volátil y otros fármacos que inducen dependencia física y/o psicológica.

Pueden usarse diversos otros inmunógenos.

Composiciones para inmunización contra *Neisseria meningitidis*

La presente invención es particularmente útil para inmunizar contra meningococos por ejemplo contra serogrupo B.

Las composiciones inmunogénicas preferidas de la presente invención comprenden: (i) un adyuvante de hidróxido de aluminio; (ii) una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) descrita en el presente documento y (iii) un polipéptido que comprende SEQ ID NO:1, en la que el compuesto de fórmula (1) descrito en el presente documento de la sal de arginina de (ii) se adsorbe al hidróxido de aluminio.

Las composiciones inmunogénicas preferidas de la presente invención comprenden: (i) un adyuvante de hidróxido de aluminio; (ii) una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) descrita en el presente documento; y (iii) un polipéptido que comprende SEQ ID NO:2; en la que el compuesto de fórmula (I) descrito en el presente documento de la sal de arginina de (ii) se adsorbe al hidróxido de aluminio.

Las composiciones inmunogénicas preferidas de la presente invención comprenden: (i) un adyuvante de hidróxido de aluminio, (ii) una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) descrita en el presente documento; (iii) un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO:1 y (iv) un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO:2, en la que el compuesto de la fórmula (I) descrito en el presente documento de la sal de arginina de (ii) se adsorbe al hidróxido de aluminio. Esta composición puede incluir polipéptidos adicionales por ejemplo que comprende cualquiera de la SEQ ID NO: 3, 4 o 5.

Las composiciones inmunogénicas preferidas de la presente invención comprenden: (i) un adyuvante de hidróxido de aluminio; (ii) una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) descrita en el presente documento; (iii) un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO:1; (iv) un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO:2; y (v) un tercer polipéptido que comprende SEQ ID NO:3; en la que el compuesto de fórmula (I) descrito en el presente documento de la sal de arginina de (ii) se adsorbe al hidróxido de aluminio.

Las composiciones inmunogénicas preferidas de la presente invención comprenden: (i) un adyuvante de hidróxido de aluminio; (ii) una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) descrita en el presente documento; (iii) un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO:1, (iv) un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO:2 y (v) un tercer polipéptido que comprende SEQ ID NO:4; en la que la sal de arginina de (ii) se adsorbe al hidróxido de aluminio; SEQ ID NO:4 es SEQ ID NO:126 de la referencia 43.

Las composiciones inmunogénicas preferidas de la presente invención comprenden: (i) un adyuvante de hidróxido de aluminio; (ii) una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) descrita en el presente documento; (iii) un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO:1; (iv) un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO:2; y (v) un tercer polipéptido que comprende SEQ ID NO:5, en la que el compuesto de fórmula (I) descrito en el presente documento de la sal de arginina de (ii) se adsorbe al hidróxido de aluminio.

Cualquiera del primer, segundo y/o tercer polipéptidos puede diferir de la SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, o 5 relevante por hasta 3 aminoácidos, con la condición de que el polipéptido puede todavía producir anticuerpos los cuales enlazan a un polipéptido el cual consiste de SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 o 5 como sea apropiado.

Idealmente 1, 2 o 3 de los primeros segundos y/o tercer polipéptidos se adsorben también al hidróxido de aluminio. Estos polipéptidos se describen con más detalle en las referencias 12, 44 y 45. La composición puede incluir 5- 100 µg de cada polipéptido. La composición idealmente no incluye ninguna vesícula de membrana externa bacteriana.

La composición puede incluir de 5-100 µg de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I).

La composición puede incluir un tampón de histidina por ejemplo un tampón de histidina 10 mM. Puede incluir sacarosa y/o cloruro de sodio. Puede administrarse en un volumen de dosis de 0,5 ml por ejemplo para inyección intramuscular.

Las composiciones inmunogénicas adicionales de la presente invención pueden comprender: (i) un adyuvante de hidróxido de aluminio, (ii) una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) descrita en el presente documento; (iii) un antígeno de proteína de enlace al factor H de meningococo, con la condición de que este antígeno no sea una proteína de fusión que tiene una secuencia de aminoácido que comprende SEQ ID NO:8 a partir de la referencia 46. El antígeno de proteína de enlace de factor H puede adsorberse al hidróxido de aluminio también.

Composiciones con múltiples antígenos diferentes

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende un complejo adyuvante de la presente invención en combinación con por lo menos dos antígenos diferentes.

5 La presente invención también proporciona un kit que comprende (i) un complejo adyuvante en un primer recipiente y (ii) por lo menos un antígeno en un segundo recipiente. El primer recipiente puede incluir opcionalmente por lo menos un inmunógeno además del complejo.

El compuesto inmunogénico en el complejo adyuvante puede ser cualquier sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento.

10 Los "por lo menos dos antígenos diferentes" en algunas realizaciones no consiste en: (i) una combinación de un antígeno de virus de sarampión, un antígeno de virus de paperas y un antígeno de virus de rubeola; (ii) una combinación de un antígeno de virus de sarampión, un antígeno de virus de paperas, un antígeno de virus de rubeola, y un antígeno de virus de varicela, (iii) una vacuna contra difteria, una vacuna contra tétanos, y una vacuna contra pertussis; (iv) una combinación tetravalente de conjugados a partir de serogrupos A, C, W135 e Y de meningococo; (v) una combinación de antígenos bacterianos a partir de serogrupos A, B, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*; (vi) una combinación que incluye antígenos de dos o más cepas diferentes de virus de gripe, (vii) una combinación de vesículas de membrana externa de los serogrupos A, C, W135, Y, X y/o B de *N. meningitidis*; (viii) una combinación de sacáridos de diferentes serotipo de neumococo; (ix) una combinación de antígenos *Moraxella catarrhalis* (x) una combinación de holotoxina de *Bordetella pertussis*, hemaglutinina filamentosa, pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3; (xi) una combinación de diferentes antígenos de polipéptido múltiples a partir de *N. meningitidis*.

20 Los "por lo menos dos diferentes antígenos" en algunas realizaciones no consiste en una combinación de múltiples antígenos de polipéptido diferentes a partir de *N. meningitidis* como la combinación descrita en las referencias 12 y 46.

Los "por lo menos dos antígenos diferentes" puede incluir por lo menos un antígeno bacteriano y por lo menos un antígeno viral.

25 Si los "por lo menos dos antígenos diferentes" incluyen solamente antígenos bacterianos entonces incluyen idealmente antígenos para por lo menos dos especies diferentes de bacterias (de esta forma, por ejemplo, excluyendo una combinación de diferentes sacáridos capsulares de meningococos, ya que estos son todos de una sola especie).

30 El "por lo menos dos antígenos diferentes" no debe conjugarse entre sí. De esta forma un conjugado de un sacárido Hib y un toxoide tetánico no es "por lo menos dos diferentes antígenos" como se usa en el presente documento.

35 Las realizaciones preferidas de "por lo menos dos antígenos diferentes" incluyen composiciones, como: (i) un toxoide de difteria, un toxoide de tétanos, y un antígeno pertussis acelular por ejemplo que comprende un toxoide pertussis, hemaglutinina filamentosa y/o pertactina, (ii) un toxoide de difteria, un toxoide de tétanos, un antígeno de pertussis, y un conjugado de sacárido capsular del tipo B de *H. influenzae*; (iii) un toxoide de difteria, un toxoide de tétanos, un antígeno de pertussis y un antígeno de superficie de virus de hepatitis B, (iv) un toxoide de difteria, un toxoide de tétanos un antígeno de pertussis, un antígeno de superficie de virus de hepatitis B y un conjugado de sacárido capsular del tipo B de *H. influenzae*; (v) un toxoide de difteria, un toxoide de tétanos, un antígeno de pertussis y un antígeno de poliovirus inactivado; (vi) un toxoide de difteria, un toxoide de tétanos, un antígeno de pertussis, un conjugado de sacárido capsular del tipo B de *H. gripe*, un antígeno de superficie de virus de hepatitis B y un antígeno de poliovirus inactivo o (vii) un antígeno de virus de hepatitis A y un antígeno de virus de hepatitis B.

Donde una composición incluye un antígeno de poliovirus inactivado preferentemente este incluye antígenos de cada uno del tipo 1 de poliovirus (por ejemplo cepa Mahoney), tipo 2 de poliovirus (por ejemplo cepa MEF-1) y tipo 3 de poliovirus (por ejemplo cepa Saukett).

45 Donde una composición incluye un antígeno pertussis este idealmente no incluye células *B. pertussis* inactivadas enteras es decir es idealmente una vacuna acelular.

50 Así como que también incluye D, T, Pa, HBsAg, Hib y/o antígenos de poliovirus, una composición de la presente invención puede incluir además antígenos por ejemplo de patógenos adicionales. Por ejemplo, estos antígenos pueden ser de *N. meningitidis* (uno o más de serogrupos A, B, C, W135 y/o Y) o *S. pneumoniae*. De esta forma una composición puede incluir dos o tres de: (i) uno o más de D, T, Pa, HBsAg, antígenos de poliovirus y/o Hib, (ii) un sacárido capsular conjugado a partir de uno o más serogrupos de meningococos A, C, W135 y/o; (iii) un antígeno de polipéptido a partir de meningococos, como fHbp.

Las composiciones de la presente invención las cuales incluyen antígenos múltiples preferentemente no incluyen ninguna vesícula de membrana externa bacteriana.

Procedimientos de precipitación in situ

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un complejo adyuvante, que comprende etapas de (i) preparar una mezcla acuosa de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento y una sal de aluminio soluble; después (ii) añadir una sal no de aluminio a la mezcla acuosa con el fin de formar una sal de aluminio precipitada a la cual se adsorbe el compuesto de la fórmula (I) como se describe en el presente documento.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar (i) una mezcla acuosa una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento y una sal de aluminio soluble con (ii) una mezcla acuosa tamponada de un antígeno, en donde la etapa de mezclado provoca precipitación de una sal de aluminio a la cual se adsorben el compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento y el antígeno.

La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar (i) una solución acuosa de una sal de aluminio soluble con (ii) una mezcla acuosa tamponada de un antígeno y una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento, en donde la etapa de mezclado provoca precipitación de una sal de aluminio a la cual se adsorben el compuesto de la fórmula (I) como se describe en el presente documento y el antígeno.

La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar (i) una solución acuosa de una sal de aluminio soluble y un antígeno con (ii) una mezcla acuosa tamponada de una sal de arginina del compuesto de la fórmula (I) como se describe en el presente documento, en donde la etapa de mezclado provoca precipitación de una sal de aluminio a la cual se adsorbe el compuesto de la fórmula (I) como se describe en el presente documento y el antígeno.

La presente invención también proporciona composiciones inmunogénicas obtenidas u obtenibles por estos procedimientos.

En estos procedimientos la sal de aluminio soluble será típicamente el aluminio ($KAl(SO_4)_2$, típicamente como $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) o cloruro de aluminio. Añadir un anión alternativo a esta sal soluble puede provocar que una sal de aluminio precipite *in situ*.

El anión alternativo se añade típicamente como parte de un tampón. De esta forma, por ejemplo, si se añade un tampón de fosfato a la sal de aluminio soluble entonces puede precipitar un adyuvante de fosfato de aluminio. El tampón típicamente será un tampón de acetato, carbonato o fosfato. Además del tampón a una solución de aluminio lleva a precipitación de un hidroxisulfato (anión tampón) de aluminio amorfo por ejemplo hidroxifosfatosulfato de aluminio (ver capítulo 9 de referencia 4).

Composiciones y Productos Farmacéuticos

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento. Esta composición puede también incluir una sal de metal insoluble y/o un inmunógeno.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento y una sal de metal insoluble. Esta composición puede también incluir un inmunógeno.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica inmunogénica que comprende una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento y un inmunógeno. Esta composición puede también incluir una sal de metal insoluble.

La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende una etapa de combinar una sal de arginina del compuesto de la fórmula (I) como se describe en el presente documento con uno o más excipientes aceptables farmacéuticamente.

Las composiciones farmacéuticas usualmente incluyen componentes además de la sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento, la sal de metal insoluble y/o el inmunógeno por ejemplo incluyen típicamente uno o más vehículo o vehículos o excipiente o excipientes farmacéuticos. Una discusión total de los componentes es disponible en la referencia 47.

Las composiciones farmacéuticas están preferentemente en forma acuosa, particularmente en el punto de administración, pero pueden también presentarse en formas líquidas no acuosas o en formas secas, por ejemplo como cápsulas de gelatina o como liofilizados, etc.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más conservantes, como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefieren composiciones libres de mercurio y pueden prepararse vacunas libres de conservadores.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una sal fisiológica, como una sal de sodio por ejemplo para controlar tonicidad. El cloruro de sodio (NaCl) es típico, que puede estar presente en entre 1 y 20 mg/ml por ejemplo 10 +2 mg/ml o 9 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, fosfato dihidrógeno de potasio, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

- 5 Las composiciones farmacéuticas pueden tener una osmolaridad de entre 200 mOsm/kg y 400mOsm/kg, por ejemplo entre 240-360 mOsm/kg o entre 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir compuestos (con o sin una sal de metal insoluble) en agua corriente (por ejemplo w.f.i.) pero usualmente incluirá uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato (excepto en el decimoquinto aspecto); un tampón de Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio) o un tampón de citrato. Las sales de tampón se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20 mM.

Las composiciones farmacéuticas tienen típicamente un pH entre 5,0 y 9,5 por ejemplo entre 6,0 y 8,0.

Las composiciones farmacéuticas son preferentemente estériles.

- 15 Las composiciones farmacéuticas preferentemente no pirogénicas por ejemplo que contienen <IEU (unidad de endotoxina, una medición estándar) por dosis y preferentemente <0,1 EU por dosis.

Las composiciones farmacéuticas son preferentemente libres de gluten.

Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para administración a pacientes animales (y, en particular, humanos) y de esta forma incluyen tanto usos humanos como veterinarios. Pueden usarse en un procedimiento para aumentar una respuesta inmunológica en un paciente, que comprende la etapa de administrar la composición al paciente. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en una forma de dosis de unidad. En algunas realizaciones una dosis de unidad puede tener un volumen de entre 0.1-1,0 ml por ejemplo aproximadamente 0,5 ml.

25 La presente invención proporciona también un dispositivo de suministro (por ejemplo jeringa, nebulizador, dispersor, inhalador, parche dérmico, etc.) que contiene una composición farmacéutica de la presente invención por ejemplo que contiene una dosis unitaria. Este dispositivo puede usarse para administrar la composición a un sujeto vertebrado.

La presente invención también proporciona un contenedor estéril (por ejemplo un vial) que contiene una composición farmacéutica de la presente invención por ejemplo que contiene una dosis unitaria.

La presente invención también proporciona una dosis unitaria de una composición farmacéutica de la presente invención.

- 30 La presente invención también proporciona un contenedor sellado herméticamente que contiene una composición farmacéutica de la presente invención. Los contenedores adecuados incluyen por ejemplo un vial.

La presente invención también desvela un kit que comprende un primer y segundo componentes de kit, en el que: (i) el primer componente de kit comprende una sal de metal insoluble y un inmunógeno, y(ii) el segundo componente de kit comprende una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento. El segundo componente idealmente no incluye una sal de metal insoluble y/o no incluye un inmunógeno. El primer y segundo componentes pueden combinarse para proporcionar una composición adecuada para administración a un sujeto.

40 La presente invención también desvela un kit que comprende primero y segundos componentes de kit, en el que: (i) el primer componente de kit comprende una sal de metal insoluble y una sal de arginina del compuesto de la fórmula (I) como se describe en el presente documento; y (ii) el segundo componente de kit comprende un inmunógeno. El segundo componente idealmente no incluye una sal de metal insoluble y/o un agonista de TLR. En algunas realizaciones, el segundo componente está liofilizado. El primer y segundo componentes pueden combinarse para proporcionar una composición farmacéutica adecuada para administración a un sujeto.

45 La presente invención también desvela un kit que comprende primer y segundos componentes de kit, en el que: (i) el primer componente de kit comprende un antígeno y una sal de arginina del compuesto de la fórmula (I) como se describe en el presente documento; y (ii) el segundo componente de kit comprende una sal de metal insoluble. El segundo componente idealmente no incluye un antígeno y/o un agonista de TLR. El primer y segundo componentes pueden combinarse para proporcionar una composición farmacéutica para administración a un sujeto.

50 En algunas realizaciones estos kits comprenden dos viales. En otras realizaciones comprenden una jeringa de llenado fácil y un vial, con los contenidos de la jeringa que se mezclan con los contenidos del vial antes a inyección. Una disposición de jeringa/vial es útil donde los contenidos del vial están liofilizados. Usualmente, el primer y segundo componentes de kit estarán ambos en forma líquida acuosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de varias formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes a la inyección pueden prepararse también (por ejemplo una composición liofilizada o una composición secada de congelamiento por aspersión). La composición puede prepararse por administración tópica como por ejemplo un ungüento, crema o polvo. La composición puede prepararse por administración oral por ejemplo como un comprimido o una cápsula, como una aspersión o como un jarabe (opcionalmente saborizada). La composición puede prepararse por administración pulmonar por ejemplo por un inhalador, usando un polvo fino o una dispersión. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular por ejemplo como una aspersión o gotas. La composición puede estar en la forma de un kit, diseñado de tal forma que una composición combinada se reconstituye justo antes a la administración a un paciente. Los kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados. Son típicos inyectables para administración intramuscular.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) es decir una cantidad que, cuando se administra a un individuo, ya sea en una dosis simple o como parte de una serie, es eficaz para aumentar la respuesta inmunológica a un antígeno co-administrado. Esta cantidad puede variar dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratarse, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratarse (por ejemplo un primate no humano, primate, etc.) la capacidad del sistema inmunológico del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica del doctor que trata y otros factores relevantes. La cantidad caerá en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de pruebas de rutina. Puede usarse una cantidad de hasta 2,5 mg por dosis, por ejemplo de 1-1000 µg/dosis o de 10-100 µg por dosis.

Procedimientos de tratamiento y administración de composiciones inmunogénicas

La presente invención es para usar en un procedimiento para aumentar una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento, complejo y/o composición de la presente invención.

La presente invención también proporciona una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento, complejo y/o composición de la presente invención, para usar en un procedimiento para aumentar una respuesta inmunológica en un sujeto.

La presente invención también proporciona el uso de una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento o complejo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para aumentar una respuesta inmunológica en un sujeto.

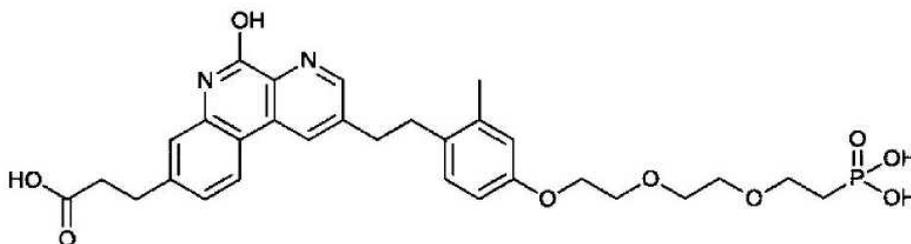
La presente invención también proporciona el uso de (i) una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento y (ii) una sal de metal insoluble en la fabricación de un medicamento para aumentar una respuesta inmunológica en un sujeto. Similarmente, la presente invención también proporciona el uso de (i) una sal de arginina del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento (ii) una sal de metal insoluble y (iii) un antígeno en la fabricación de un medicamento (por ejemplo una vacuna) para aumentar una respuesta inmunológica en un sujeto.

La presente invención es adecuada para aumentar respuestas inmunológicas en sujetos animales humanos o no humanos (en particular mamíferos). Las composiciones preparadas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos.

La respuesta inmunológica estimulada por estos procedimientos y usos generalmente incluirá una respuesta de anticuerpo, preferentemente una respuesta de anticuerpo protectora. Los procedimientos para evaluar respuestas de anticuerpo después de la inmunización son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la respuesta inmunológica puede incluir un incremento en IFN-gamma, IL-10, IL-12, MCP-1 y mKC y/o TNF-α.

El tratamiento puede ser un esquema de dosis simple o un esquema de dosis múltiple. Dosis múltiples pueden usarse en un esquema de inmunización primaria y/o en un esquema de inmunización de refuerzo. Administración de más de una dosis (típicamente más de dosis) es particularmente útil en pacientes ingenuos inmunológicamente. Se administrarán dosis múltiples típicamente por lo menos 1 semana aparte (por ejemplo aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, etc.).

También se describen en el presente documento a compuestos de fórmula (Ia) mostrada a continuación.



Fórmula (Ia)

y sales o solvatos de los mismos. Las sales de los compuestos de fórmula (Ia) incluyen sales de arginina, y sales de L-arginina en particular.

General

- 5 El término "que comprende" abarca "que incluye" así como también "que consiste" y "que consiste esencialmente en" por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional por ejemplo X + Y.

10 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo una composición que es "sustancialmente libre" de Y y puede ser completamente libre de Y. Donde sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la presente invención.

El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo $x \pm 10\%$.

15 A menos que se establezca específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclado. De esta forma pueden mezclarse componentes en cualquier orden. Donde hay tres componentes entonces dos componentes pueden combinarse entre sí y entonces la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

Donde se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que son libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE por sus siglas en inglés) y en particular libres de encefalopatía espongiforme bovina (BSE por sus siglas en inglés). Sobre todo, se prefiere cultivar células en la ausencia total de materiales derivados de animales.

- 20 Donde un compuesto se administra al cuerpo como parte de una composición entonces ese compuesto puede reemplazarse alternativamente por un fármaco adecuado.

25 El experto en la materia apreciará que los compuestos de fórmula I pueden existir como tautómeros (por ejemplo el anillo de benzonaftiridina puede tautomerizar). La presente invención comprende las diferentes formas tautoméricas en aislamiento entre sí así como también otras mezclas de estos tautómeros. La preparación de formas de sal de la base libre puede cambiar el equilibrio de tautómeros con relación a la base libre.

30 Los grupos que contienen fósforo empleados con la presente invención pueden existir en un número de formas protonadas y desprotonadas dependiendo del pH del ambiente que rodea, por ejemplo el pH del disolvente en el cual se disuelven. Por lo tanto, aunque puede ilustrarse una forma particular se entiende, a menos que se mencione de otra forma, para estas ilustraciones simplemente son representativas y no se limitan a una forma protonada o desprotonada específica. Por ejemplo, en el caso de un grupo fosfato, esto se ha ilustrado como $-OP(O)(OH)_2$ pero la definición incluye las formas protonadas $-[OP(O)(OH_2)(OH)]^+$ y $-[OP(O)(OH_2)_2]^{2+}$, y las formas desprotonadas $-[OP(O)(OH)(O)]$ y $[OP(O)(O)_2]^{2-}$ por ejemplo que pueden existir a diferentes valores de pH.

Breve descripción de las figuras

- 35 La Figura 1 muestra un análisis de TGA y DSC para una sal de L-arginina del compuesto de fórmula (I).
- La Figura 1a muestra el espectro de RMN ^{13}C para una sal de L-arginina del compuesto de fórmula (I).
- La Figura 1b muestra el espectro de RMN ^{15}N para una sal de L-arginina del compuesto de la fórmula (I).
- La Figura 2 muestra patrones XRPD para una sal de L-arginina y la base libre.
- La Figura 3 muestra patrones XRPD para una sal de L-arginina del compuesto de la fórmula (I) antes y después de tratamiento DVS.
- 40 La Figura 3a muestra patrones XRPD para una muestra de 4 g de una sal de L-arginina del compuesto de fórmula (I) antes y después del tratamiento de DVS.

La Figura 4 muestra un análisis de DSC para una sal de L-arginina del compuesto de fórmula (I) antes y después de análisis DVS.

- 5 La Figura 5 muestra títulos anti-RSV \log_{10} para 10 grupos: (A) A1-H solo; (B) 50 μg de SMIP, base libre; (C) 50 μg de SMIP, sal de arginina; (D) 5 μg de SMIP, base libre; (E) 5 μg de SMIP, sal de arginina, (F) 1 μg de SMIP, base libre, (G) 1 μg de SMIP, sal de arginina; (H) IC31; (I) sin adyuvante, (J) tampón solo.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

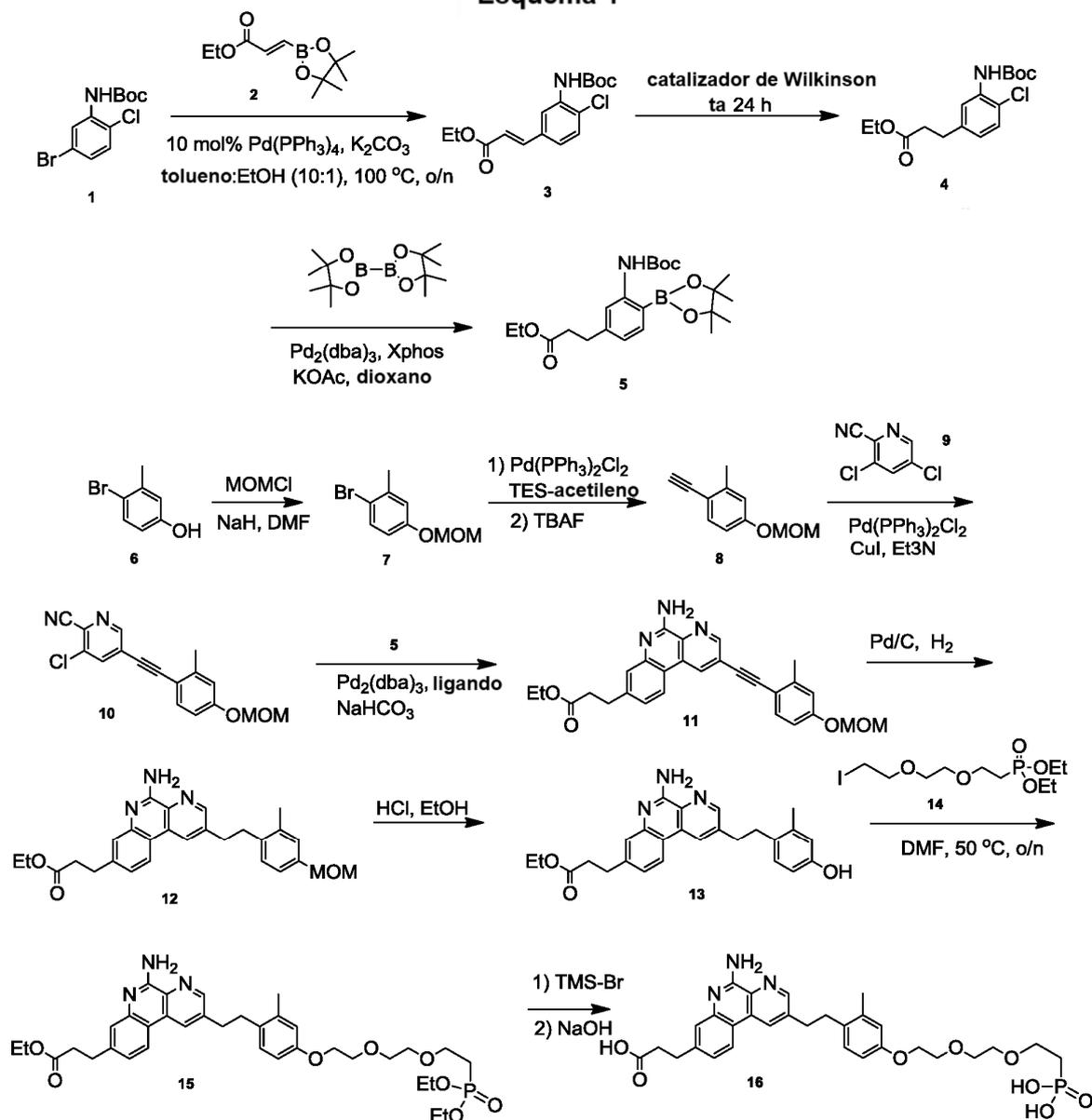
Síntesis de base libre

La síntesis de ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoico base libre se describe posteriormente, con referencia al esquema 1.

10 Etapa 1: 3-(3-terc-butoxicarbonilamino)-4-clorofenil)acrilato de (E)-etilo (3)

- 15 A una solución de 5-bromo-2-clorofenilcarbamato de terc-butilo (1) (1,0 equivalentes) en acetonitrilo (0,3 M) y EtOH (0,5 M) se añade K_2CO_3 (2,0 equivalentes). Se elimina el gas de la reacción y se hace fluir con N_2 , después se añade 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)acrilato de (E)-etilo (2) (1,2 equivalentes) y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,1 equivalentes). Se hace fluir la reacción otra vez con N_2 y se agita a 100 °C durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añade hexano, y se filtra la mezcla a través de una almohadilla de sílice, eluyendo con EA/Hex (1:1) hasta que se eluye completamente el producto. Se concentra el filtrado y se purifica en Combiflash, eluyendo con 0-15 % de EA en Hex para dar 3-(3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-clorofenil)acrilato de (E)-etilo (3) como un sólido blanco.

Esquema 1

Etapas 2: 3-(3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-clorofenil)propanoato de etilo (4)

- 5 Se añade a una solución de 3-(3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-clorofenil)acrilato de (E)-etilo (3) (1,0 equivalentes) en acetato de etilo/etanol (1:1, 0,3 M) catalizador de Wilkinson (0,10 equivalentes). Se introduce gas hidrógeno por medio de un balón y se agita la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Se filtra la mezcla a través de una almohadilla de celita, se lava con diclorometano. Se concentra el filtrado al vacío y se purifica por Combiflash usando 0-10 % de acetato de etilo en hexano para dar el 3-(3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-clorofenil)propanoato de etilo (4) como un sólido.

Etapas 3: 3-(3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)propanoato de etilo (5)

- 10 Se elimina el gas de una solución de 3-(3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-clorofenil)propanoato de etilo (4) (1,0 equivalentes), 4,4,4',4',5,5,5'-octametil-2,2'-i(1,3,2-dioxaborolano) (2,0 eq), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) (0,05 equivalentes), 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-trisisopropilbifenilo (0,20 equivalentes) y acetato de potasio (2,0 equivalentes) en 1,4-dioxano (0,2 M) y se agita a 100 °C durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, se concentra el contenido de reacción al vacío. Se purifica el material sin purificar por Combiflash usando 0-50 % de acetato de etilo en hexano para producir 3-(3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propanoato de etilo (5) como un aceite marrón. Se almacena el producto a -20°C y se usa después de un mes de síntesis.
- 15

Etapa 4: 1-bromo-4-(metoximetoxi)-2-metilbenceno (7)

Se añade a una solución de 4-bromo-3-metilfenol (**6**) (1,0 equivalentes) en DMF (0,5 M) a 0 °C en forma de porciones del 60 % en peso de NaH (1,5 equivalentes). Se controla la adición de tal forma que la temperatura de reacción interna nunca superase los 10 °C. Se agita la reacción a temperatura ambiente durante 45 minutos, entonces se añade en forma de gotas una solución de cloro(metoxi)metano (1,2 equivalentes) en DMF (3M) por medio de embudo adicional. Se agita la reacción en temperatura ambiente durante 3,5 horas, y entonces se detiene por vaciar en hielo. Se agita la mezcla resultante en temperatura ambiente durante 3,5 horas. Se agita la mezcla resultante en temperatura ambiente durante 1 hora. Se añade éter y se separan las dos capas. Se extrae la capa acuosa (1x) con agua. Se lavan las capas orgánicas combinadas con agua (2x), salmuera, se seca en MgSO₄ y se concentra para dar 1-bromo-4-(metoximetoxi)-2-metilbenceno (**7**) como un aceite incoloro. Se usa el material sin purificar en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 5: trietil((4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)etil)silano

Se elimina el gas de una solución de 1-bromo-4-(metoximetoxi)-2-metilbenceno (1,0 equivalentes), trietilamina (5,0 equivalentes) en DMF (0,5 M) y se hace fluir nitrógeno. Se añade a la reacción TES-acetileno (1,0 equivalentes), CuI (0,098 equivalentes) y Pd (PPh₃)₂Cl₂ (0,098 equivalentes). Se calienta la reacción a 60 °C y se agita durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añade agua y éter. Se separan las capas y se lava la capa orgánica con agua (2x). Se separa la capa orgánica y se pasa a través de una almohadilla de sílice (envasada con hexano). Se eluye la sílice con 10 % de EA en Hexano. Se combinan las fracciones y se concentran para dar trietil((4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)etil)silano como un aceite negro. Se usa el material bruto en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 6: 1-etinil-4-(metoximetoxi)-2-metilbenceno (8)

Se añade lentamente a una solución de trietil((4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)etil)silano (1,0 equivalentes) a 0 °C fluoruro de tetrabutilamonio (solución 1 M en THF, 0,20 equivalentes). En este punto, se retira el baño de hielo y se permite agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se pasa entonces la mezcla de reacción a través de una almohadilla de sílice (envasada con hexano) y se eluye con 20 % de EtOAc en hexanos para retirar sales insolubles. Se purifica entonces el producto bruto por Combiflash usando 0-10 % de EtOAc en hexanos para dar 1-etinil-4-(metoximetoxi)-2-metilbenceno (**8**) como un líquido ligeramente marrón.

Etapa 7: 3-cloro-3-((4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)picolinonitrilo (10)

Se elimina el gas de una solución de 1-etinil-4-(metoximetoxi)-2-metilbenceno (**8**) (1,0 equivalentes), 3,5-dicloropicolinonitrilo (**9**) (0,90 equivalentes), CuI (0,10 equivalentes) y Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,10 equivalentes) y trietilamina (5,0 equivalentes) en DMF (0,25 M) y se hace fluir con nitrógeno. Se calienta entonces la mezcla de reacción a 60 °C y se agita durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añade agua. Se extrae la mezcla con EA (2x). Se lavan las capas orgánicas combinadas con 10 % de NH₄OH acuoso (2x), salmuera y se concentra. Se filtra el material bruto a través de una almohadilla de sílice (humedecida con hexano). Se eluye la sílice con 10 % de EA en hexano. Se combinan las fracciones y se concentran. Se lavan los sólidos resultantes en éter caliente y se filtran para dar un sólido amarillo, el cual se usa en la etapa siguiente sin purificación adicional. Se concentra y purifica el filtrado por Combiflash usando 0-10 % de EtOAc en hexanos para dar 3-cloro-5-((4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)picolinonitrilo (**10**) como un sólido amarillo.

Etapa 8: 3-(5-amino-2-((4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)-benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoato de etilo (11)

Se elimina el gas de una solución de 3-cloro-5-((4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)picolinonitrilo (**10**) (1,0 equivalentes), 3-(3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)propanoato de etilo (**5**) (1,25 equivalentes), tris(dibencilideno)acetona)dipaladio(0) (0,10 equivalentes), dicitohexil(2',6'-dimetoxibifenil-2-il)fosfina (0,20 equivalentes) y bicarbonato de sodio (3,0 equivalentes) en n-butanol/H₂O (5:1, 0,2 M) y se agita a 100 °C durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, se diluye el contenido de reacción con acetato de etilo y agua. Se separan las dos fases y se extrae la capa acuosa dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavan con salmuera, se secan con MgSO₄ anhidro y se concentran al vacío. Se purifica el material bruto por cromatografía rápida en un sistema COMBIFLASH® (ISCO) usando 0-40 % de acetato de etilo en DCM primero para retirar la impureza, después 0-4 % de MeOH en DCM para dar 3-(5-amino-2-((4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)-benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoato de etilo (**11**). Se realiza purificación adicional por precipitar y lavar en éter caliente.

Etapa 9: 3-(5-amino-2-(4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoato de etilo (12)

Se hace fluir con nitrógeno una solución de 3-(5-amino-2-((4-(metoximetoxi)-2-metilfenil)etil)-benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoato de etilo (**11**) (1,0 equivalentes) en EtOH/THF (3:1, 0,16 M). Entonces se añade 10 % en peso de Pd/C (0,20 equivalentes). Se hace fluir la reacción con hidrógeno (2x) y se agita bajo un balón de hidrógeno. Después de 24 horas, se filtra la reacción a través de un cojincillo de celita, lavando con MeOH al 5 % en DCM. Se comprueba el filtrado para la presencia de material de partida usando LCMS. Se repite la reacción de hidrogenación hasta que no se detecta más del material de partida alquino o intermediario de alqueno. Se purifica el producto sin

purificar por Combiflash usando 0-4 % de MeOH en DCM para dar 3-(5-amino-2-(4-metoximetoxi)-2-metilfenetil)benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoato de etilo (12) como un sólido blanco.

Etapa 10 3-(5-amino-2-(4-hidroxi-2- metilfenetil)benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoato de etilo (13)

5 Se disuelve 3-(5-amino-2-(4-metoximetoxi)-2-metilfenetil)benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoato de etilo (12) (1,0 equivalentes) en EtOH (0,2 M), después se añade una solución de HCl 4 M en dioxano (0,2 M). El producto precipita como una sal amarilla. Después de agitar durante 3 horas, se vierte la reacción en una solución de agitación de éter. Se agita la mezcla durante 10 minutos, después se filtra y se lava con éter. Se obtiene 3-(5-amino-2-(4-hidroxi-2-metilfenetil)benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoato de etilo (13) como un sólido amarillo el cual se seca al vacío durante la noche (sal bis-HCl). Alternativamente, se purifica el producto bruto por Combiflash usando 0-5 % de MeOH en DCM para dar la base libre.

Etapa 11 2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo

15 Se carga un tubo de microondas con una barra de agitación, 1,2-bis(2-yodoetoxi)etano disponible en el mercado (1,0 equivalentes) y trietilfosfita (1,0 equivalentes). Se tapa el tubo de microondas y entonces se irradia a 160 °C durante 40 minutos con agitación. Se enfría la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se purifica por Combiflash usando 0-75 % de EtOAc en hexanos o alternativamente por RP-HPLC (0,035 % TFA en ACN:0,05 % de TFA en H₂O, columna C18) para dar 2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo como un aceite amarillo pálido.

Etapa 12 3-(5-amino-2-(2-(4-(2-(2-(2-(dietoxifosforil)etoxi)etoxi)-2-metilfenil)etil)benzo(f)1,7-naftiridin-8-il)propanoato de etilo (15)

20 Se añade a una solución de 3-(5-amino-2-(4-hidroxi-2-metilfenetil)benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoato de etilo (13) (1,0 equivalentes) disuelto en DMF (0,14 M) una solución de 2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo (14): a partir de la etapa 11 anterior (1,3 equivalentes) en DMF (0,7 M) y carbonato de cesio (4 equivalentes). Se agita la reacción a 60 °C. Después de 1,5 horas (o hasta que la reacción se completa por LCMS) se añade DCM (2 volúmenes equivalentes) a la reacción. Los sólidos (inorgánicos) se filtran y el filtrado se concentra. Se purifica el producto bruto por Combiflash usando 0-5 % de MeOH en DCM para dar 3-(5-amino-2-(2-(4-(2-(2-(2-(dietoxifosforil)etoxi)etoxi)etoxi)-2-metilfenil)etil)benzo(f)1,7-naftiridin-8-il)propanoato de etilo (15).

Etapa 13: ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoico (16)

30 Se añade lentamente a una solución de 3-(5-amino-2-(2-(4-(2-(2-(2-(dietoxifosforil)etoxi)etoxi)etoxi)-2-metilfenil)etil)benzo(f)1,7-naftiridin-8-il)propanoato de etilo (15) (1,0 equivalentes) en DCM (0,16M) a 0 °C TMSBr (10 equivalentes). Se agita la reacción en temperatura ambiente durante la noche. Se añade TMSBr adicional (5,0 equivalentes) a 0 °C y se agita otra vez la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se retira el disolvente por evaporación y se secan los sólidos anaranjados sin purificar en alto vacío brevemente. Se suspenden los sólidos en EtOH (0,5 M) y se añade NaOH 2,5 N (10,0 equivalentes). Se agita la reacción a 80 °C durante 3 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se ajusta la mezcla a pH 9 a 10 y directamente se purifica en RP-HPLC usando una columna C18, eluyendo con 10-40 % 95:5 (MeCN/5 mM NH₄CAC) en gradiente de NH₄CAC 10 mM (pH 9). Las fracciones que contienen el producto se combinan y concentran al vacío. Se disuelve el gel blanco resultante llevando a reflujo 1:1 EtCH/agua (0,04 M) añadiendo unas pocas gotas de hidróxido de amonio. Mientras está caliente, se vierte lentamente la mezcla en una solución caliente en agitación de acetona (0,009M) precalentada a 50 °C. La suspensión de acetona se enfría lentamente a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación continua, y entonces se asienta en un baño de hielo por 10 minutos. Se filtran los sólidos y se lavan sucesivamente con acetona (2x) y éter (2x). Se secan los sólidos en alto vacío durante la noche para dar el compuesto (16) como un sólido. La RMN ¹H (dimetilsulfóxido-d₆) obtenida para ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo(f) (1,7)naftiridin-8-il)propanoico es: 5 9,02 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,55 (d, 1H, J=8,0 Hz), 7,58 (s, 1H), 7,49 (d, 1H, J=8,4 Hz), 7,06 (d, 1H, J=8,0 Hz), 6,76 (s, 1H), 6,68 (d, 1H, J=8,0 Hz), 4,03-4,00 (m, 2H), 3,71-3,69 (m, 2H), 3,60-3,54 (m, 4H), 3,51-3,49 (m, 2H), 3,16-3,12 (m, 2H), 3,03-2,96 (m, 4H), 2,67-2,66 (m, 2H), 2,33- 2,32 (m, 2H), 2,26 (s, 3H). LRMS [M+H] = 598,2.

Formación de sal de Arginina

50 Se pesan 98,025 mg de ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo(f)(1,7) naftiridin-8-il)propanoico en un vial de vidrio y se añade 1,7 ml de 0,1 M de arginina en 80/20 metanol/agua para dar una solución de 57 mg/ml. Se lleva a suspensión la solución durante 60 minutos a 50 °C. Se añade entonces 7 ml de etanol lo cual da como resultado un precipitado esponjoso blanco después de agitación durante varias horas. Se filtran los sólidos y se secan en un horno de vacío durante 3 días a 40 °C para producir 110 mg de sal de arginina de ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi) etoxi)etoxi)fenetil)benzo(f)(1,7)naftiridin-8-il)propanoico.

Datos de RMN

55 Las Figuras 1a y 1b muestran espectros de RMN para la sal de L-arginina de la presente invención comparada con la base libre. La sal de arginina del compuesto de fórmula (I) (■); base libre (•) y arginina libre (◆).

Datos de XRPD

La Figura 2 muestra los datos de XRPD para la sal de L-arginina obtenida comparados con los de la base libre. Sal de arginina (100 mg) (♦) y 1000 mg (■) del compuesto de fórmula (I); base libre (•).

Estudios de Estabilidad

5 Se ensayó la sal de L-arginina formada por medio del procedimiento anterior para termo- y fotoestabilidad. Para propósitos comparativos, la base libre y la sal de amonio también se ensayaron.

10 Las sales de amonio y arginina de volumen y la base libre a granel del compuesto de fórmula (I) se ensayaron para fotoestabilidad irradiándose (1,2 millones de horas lux), a 40 °C durante un periodo de 36 horas. La base libre mostró un 12,36 % de degradación, la sal de arginina mostró un 9,7 % de degradación y la sal de amonio mostró un 4,6 % de degradación.

La sal de arginina y la base libre a granel del compuesto de fórmula (I) también se ensayaron para fotoestabilidad en una solución de tampón fosfato 50 mM (pH 6,8) irradiándose (1,2 millones de horas lux), a 40 °C durante un periodo de 36 horas. La base libre mostró un 23,1 % de degradación, la sal de arginina mostró un 9,8 % de degradación. La sal de amonio no se ensayó.

15 Las sales de amonio y de arginina y la base libre a granel del compuesto de fórmula (I) también se ensayaron para termoestabilidad a pH fisiológico (7,4) calentando a 80 °C durante 7 días. Después de calentar la base libre mostró un 18,1 % de degradación comparada con un 0,1 % de degradación de la sal de arginina.

20 De esta forma, la sal de arginina muestra termoestabilidad en pH fisiológico y fotoestabilidad mejoradas en comparación con la base libre. Mientras que la sal de amonio muestra ligeramente mejor fotoestabilidad que la sal de arginina, la sal de amonio presenta otras desventajas, en particular que los productos de degradación son gas de amoníaco tóxico. Esto lleva a la sal de amonio a ser inadecuada para uso en formulación farmacéutica y almacenamiento a largo plazo. Adicionalmente, a altas temperaturas (80 °C), como aquellas usadas durante los procedimientos de esterilización comprendidas por la presente invención (por ejemplo llevar a autoclave) la sal de arginina es más estable que la sal de amonio. La sal de arginina es también más estable que la base libre a altas temperaturas (80 °C) usadas en autoclave.

Confirmación Estequiométrica

Se llevó a cabo un análisis elemental en la sal de arginina producida anteriormente. Se muestra el análisis en la tabla a continuación.

% C	Objetivo	% de dif.	% H	Objetivo	% de dif.	% N	Objetivo	% de dif.	% P	Objetivo	% de dif.	% H ₂ O
53,93	53,52	-0,77	6,74	6,74	0,00	12,14	12,70	4,41	3,59	3,83	6,27	3,81

30 Este análisis confirma una estequiometría 1:1 entre el compuesto de la fórmula (I) y L-arginina. El objetivo es la sal monohidrato teórica del compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento.

Análisis Térmico

35 Se analizó la sal de L-arginina producida anteriormente por medio de análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) y calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Se muestran los resultados en la Figura 1.

Absorción de agua

40 Se realizan experimentos de absorción de vapor dinámico (DVS, por sus siglas en inglés) en la sal de L-arginina obtenida por medio del procedimiento anterior. El análisis DVS muestra otra vez que la sal de arginina es higroscópica, tomando aproximadamente 18 % de agua en 90 % de humedad relativa. XRPD para la sal pre (♦) y post-DVS (■) se muestran en la Figura 3. La base libre también se muestra para comparación (•). El análisis DSC de la sal de arginina después del tratamiento DVS también se realiza y los resultados pre (♦) y post-DVS (■) tratamiento se muestran en la Figura 4. La base libre también se muestra para comparación (•).

45 También se realizó DVS en una muestra de 4 g de sal de L-arginina del compuesto de fórmula (I) descrito anteriormente. El análisis de DVS muestra otra vez que la sal de arginina es higroscópica, tomando aproximadamente 13,71 % de agua en 90 % de humedad relativa. Después de dos ciclos, la misma cantidad de agua se muestra a adsorberse y desadsorberse, lo cual indica que no se forman hidratos adicionales (los cuales pueden tener un impacto negativo en la solubilidad). No se nota cambio de forma por XRPD. El XRPD para la sal pre (♦) y post-DVS (■) se muestra en la Figura 3ª.

Estudios de Adsorción – fosfato de aluminio

La adsorción de una sal de L-arginina del compuesto de fórmula (I) a un adyuvante de fosfato de aluminio disponible en el mercado produce una eficiencia de adsorción del 97 % (como se encuentra por recuperar el compuesto de la fórmula (I) en desorción). El pretratamiento del adyuvante de fosfato de aluminio con fosfato inorgánico (fosfato de potasio) tiene un impacto en la capacidad de adsorción y la adsorción se inhibe de una forma dependiente de la concentración. Sin embargo, la adsorción permanece >90 % cuando se trata el adyuvante de fosfato de aluminio con 10 mM de fosfato de potasio.

Se preparó una formulación con 0,4 mg/ml del compuesto de fórmula (I) de la sal de L-arginina y 3 mg/ml de fosfato de aluminio (expresado como concentración de Al³⁺), 10 mM de tampón histidina (pH 6,5). Se trató el fosfato de aluminio durante la noche con varias concentraciones de fosfato de potasio (10 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM y 500 mM) antes de que se incubara el compuesto de fórmula (I) de la sal de arginina con el fosfato de aluminio.

Pretratamiento con fosfato de potasio (mM)	0	10	50	100	250	500
% de adsorción	97±1	93±1	81,6±0,1	60±2	52±0,1	65±4

Estudios de adsorción- Hidróxido de Aluminio

La sal de L-arginina del compuesto de fórmula (I) se ensayó para adsorción en 1 mg/ml de concentración en 3 mg/ml de hidróxido de aluminio ("Al-H"). La eficiencia de adsorción del compuesto se determinó por RP-HPLC como siendo el 99 %.

Estudios de Adsorción- Fosfato de calcio

Se estudió adsorción de una sal de L-arginina del compuesto de fórmula (I) a un adyuvante de fosfato de calcio disponible en el mercado a pH 6,4, sin tampón de histidina. Se preparan dos formulaciones, ambas con 1,12 mg/ml de Ca²⁺ pero con 0,25 mg/ml o bien 0,125 mg/ml de la sal de arginina. La adsorción es alrededor del 90 % para ambas formulaciones.

Exposición sistémica después de suministro in vivo

La adsorción del compuesto de fórmula (I) en Al-H redujo sus concentraciones séricas pico y aumentó los tiempos de residencia en sitios de inyección intramuscular, como se descubrió para las especies preclínicas ratones y ratas. Esto contribuye bastante en modificar y controlar el nivel de exposición sistémica evitando el problema potencial de las citocinas proinflamatorias en la sangre, mejorando la seguridad y/o la capacidad de tolerancia de los compuestos de fórmula (I).

Una dosis única de dos formulaciones diferentes (una que contiene la base libre y la otra la sal de L-arginina del compuesto de fórmula (I)) adsorbida a Al-H en 10 mM de tampón de histidina y en presencia de 3 MenB de antígenos se administra intramuscularmente a ratones en una dosis de 4 mg/kg. La formulación de fase libre tiene una T_½ de 9,5 horas, T_{max} de 0,83 horas, C_{max} de 465 nM y AUC₀₋₂₄ de 4552 h*nM. El compuesto de fórmula (I) tiene una T_½ de 8,48 horas, T_{max} de 0,67 horas, C_{max} de 453 nM y AUC₀₋₂₄ de 4538h*nM.

Meningococos B

La referencia 12 describe una vacuna para meningococos ("MenB") del serogrupo B producida a partir de tres polipéptidos separados (véase también la referencia 46). Estos tres polipéptidos pueden adsorberse a hidróxido de aluminio ("Al-H") y esta adsorción ocurrirá aún después de que se pre-adsorba la sal de arginina del compuesto (I) al Al-H.

Se ensayó una versión modificada de esta vacuna MenB 3-valente en la cual la proteína de fusión GNA2091-1870 se reemplazó por "936-10A-10A" como se describe en la referencia 43. Esta mezcla de proteínas se ensayó con el compuesto de fórmula (I) como base libre o como la sal de arginina, en dos concentraciones diferentes. Se ensayaron suero de ratones inmunizados con la vacuna intraperitonealmente (IP) o intramuscularmente (IM) en un ensayo bactericida (SBA, por sus siglas en inglés) contra 5 cepas diferentes. Los títulos bactericidas fueron como sigue:

		MC58	NZ	961-5945	UK355	5-99
Al-H	IP	4096	2048	≥8192	512	≥8192
Al-H/50 µg de base libre	IP	≥8192	≥8192	≥8192	≥8192	≥8192
Al-H/50 µg de sal de Arg	IP	≥8192	≥8192	≥8192	≥8192	≥8192
Al-H/25 µg de base libre	IP	≥8192	≥8192	≥8192	≥8192	≥8192
Al-H/25 µg de sal de Arg	IP	≥8192	≥8192	≥8192	≥8192	≥8192
Al-H	IM	4096	1024	≥8192	256	≥8192
Al-H/50 µg de base libre	IM	≥8192	≥8192	≥8192	4096	≥8192

(continuación)

		MC58	NZ	961-5945	UK355	5-99
Al-H 50 µg de sal de Arg	IM	≥8192	≥8192	≥8192	2048	≥8192

De esta manera la base libre y la sal de Arg mejora ambas respuestas con relación a Al-H solas y puede proporcionar títulos altos contra todas las cepas en el panel, logrando un título de ≥8192 contra todas las cepas cuando se administran por la ruta IP, de esta manera mejorando el cubrimiento de cepa de la vacuna.

Además, los resultados indican que la adsorción del compuesto como una base libre o como la sal de L-arginina no cambia bioequivalencia por el ensayo de SBA.

RSV

Se formula glicoproteína trimérica F (3 µg) de virus sincitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés) con el compuesto de fórmula (I) como una base libre o como la sal de arginina (1 µg, 5 µg, 50 µg) adsorbida a Al-H. Para comparación también se ensaya el adyuvante IC31TM. Se inmunizan ratones Balb/C (6 por grupo) en los días 0 y 21 y se evalúan las respuestas inmunes. Se muestran títulos 3 semanas después de la primera dosis en la Figura 5. En todas las 3 dosis de SMIP la sal de arginina (Figura 5, grupos C, E, G) da títulos ligeramente superiores que la base libre (grupos B, D, F) y los títulos se aumentan en comparación con Al-H solo (grupo A).

15 REFERENCIAS

- [1] WO2011/027222.
 [2] PCT/US2011/050231.
 [3] Burrell y col. (1999) *Vaccine* 17:2599-603.
 [4] *Vaccine Design...*(1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 [5] Clausi y col. (2008) *J Pharm Sci* DOI 10.1002/jps.21390.
 [6] Treanor y col. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.
 [7] Keitel y col. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-67.
 [8] WO03/097091.
 [9] Cassone & Torosantucci (2006) *Expert Rev Vaccines* 5:859- 67.
 [10] WO2010/140119.
 [11] WO2010/119343.
 [12] Giuliani y col. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:10834-9.
 [13] WO95/27787.
 [14] WO03/010317.
 [15] WO2007/110700.
 [16] WO2006/138004.
 [17] WO2005/084306.
 [18] WO2005/002619.
 [19] WO03/049762.
 [20] WO02/02606.
 [21] WO00/37494.
 [22] WO2008/020330.
 [23] WO2006/091517.
 [24] WO2006/089264.
 [25] Covacci & Rappouli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
 [26] WO93/18150.
 [27] Covacci y col. (1993) *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 90:5791- 5795.
 [28] Tummuru y col. (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
 [29] Marchetti y col. (1998) *Vaccine* 16:33-37.
 [30] Telford y col. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
 [31] Evans y col. (1995) *Gene* 153:123-127.
 [32] WO 96/01272 & WO96/01273, especially SEQ ID NO: 6.
 [33] WO 97/25429.
 [34] Rappouli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 [35] Nencioni y col. (1991) *Infect. Immun.* 59(2):625-30.
 [36] Dasarai y col. (2011) *J Gen Virol* PMID: 21307228.
 [37] Zhang y col. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:39577-85.
 [38] Earl y col. (2001) *J Virol* 75:645-53.
 [39] Barnett y col. (2001) *J Virol* 75:5526-40.
 [40] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
 [41] Harper y col. (2004) *Lancet* 364(9447):1757-65.
 [42] US 6,699,474.
 [43] WO2011/024072.
 [44] WO2007/060548.

[45] WO2009/050586.

[46] WO2004/032958.

[47] Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 2000; 20th edition, ISBN: 0683306472).

LISTADO DE SECUENCIAS

5 SEQ ID NO: 1

ATNDDDDVKKAAATVAIAAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVVNTLTKTVNEN
KQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATNALNKLGENITTFAEETKTNI VKIDEKLEAVADTVDK
HAEAFNDIADSLDETNKKADEAVKTAANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEVAKAVTD
IKADIATNKDNI AKKANSADVITREESDSKFVRI DGLNATTEKLDTRLASAEKS IADHDTRLNGLDKTVSDLRKETR
QGLAEQAALSGLFQPYNVG

SEQ ID NO: 2

MASPDVKSADTLSKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQGAPSAQGGQDMAAVSEENTGNGGAAATDKPKNEDEGAQ
NDMPQNAADTDSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMANTADGMQGGDDPSAGGENAGNTAAQGTNQA
ENNQTAGSQNPASSTNPSATNSGGDFGRNTVGNVSVV IDGPSQNI TLTCKGDCSCGNNFLDEEVQLKSEFEKLSAD
KISNYKKDGKNDGKNDKFKVGLVADSVQMKGINQYI IFYKPKPTSFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDG
EAVSLTGHSGNIFAPEGNRYRLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPSPSRGRFAA
KVDFGSKSVLDGI IDSGDGLHMGTKFKAAIDGNGFKGTTWENGGGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGFGV
FAGKKEQDGSGGGATYKVVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQHFT
DHLKSADIFDAAQYPIRQFVSTKFNFNKGLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAKEKFCYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDR
TKWGVLDLVNVMGTMKSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID NO: 3

MVSAVIGSAAVGAKS AVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYDRHLLLLGQVATEGEK
QFVQGIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATRARVKIVTYGNVTVYVMGILTPEEQ
AQITQKVSTTVGVQKVIITLYQNYVQRSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQ
AEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKRQF
RIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHA
VISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 4

MVSAVIGSAAVGAKS AVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYDRHLLLLGQVATEGEK
QFVQGIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATRARVKIVTYGNVTVYVMGILTPEEQ
AQITQKVSTTVGVQKVIITLYQNYVQRSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQ
AEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKRQF
RIGDLGGEHTAFNQLPDGKAEYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFTKKQNGKIEHLKSPELNVELASAEIKADGKSHAV
ILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKG
LQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALT
AFQTEQIQDSEHSGKMAKRQFRIGDLGGEHTAFNQLPDGKAEYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFTKKQNGKIEHLK
SPELNVELASAEIKADGKSHAVILGDVRYGSEEKGSYSLGIFGGRAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 5

MGPDSDRLQORRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDK
VSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNPDKIDS LINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKA
EYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQGHGKIEHLKTPQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALF
GDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLA
QGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKR
QFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKR
HAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQSGSPDSDRLQORRVAADIGTGLADAL
TAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQAETFKAGDKNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLQSG
EFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHLYSIDF
TKKQGYGRIEHLKTLQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEI
GIAGKQ

15

REIVINDICACIONES

1. Una sal de arginina del ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi) fenetil) benzo(f)[1,7]naftiridin-8-il)propanoico.
- 5 2. La sal de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la sal tiene una estequiometría 1:1 de arginina a ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2- fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo(f)[1,7]naftiridin-8-il)propanoico.
3. La sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la sal de arginina es una sal de L-arginina.
4. La sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la sal está hidratada.
5. La sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sal es un monohidrato.
- 10 6. La sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la sal es un sólido sustancialmente amorfo.
7. La sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en terapia.
8. Uso de la sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la fabricación de un medicamento para su uso en terapia.
- 15 9. La sal para su uso o el uso de una sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en la que la terapia es un procedimiento para aumentar una respuesta inmune en un sujeto.
10. Un procedimiento para la preparación de la sal de arginina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la etapa de poner en contacto ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo(f)[1,7]naftiridin-8-il)propanoico con arginina en un disolvente.
- 20 11. Una composición que comprende una sal de arginina del ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo(f)[1,7]naftiridin- 8-il)propanoico y una sal de metal insoluble.
12. La composición de la reivindicación 11, que comprende además un inmunógeno.
13. La composición de la reivindicación 12, en la que dicho inmunógeno es un polipéptido de superficie
14. La composición de la reivindicación 12, en la que dicho inmunógeno provoca una respuesta inmune que protege contra una enfermedad vírica, una enfermedad bacteriana, una enfermedad fúngica, una enfermedad parásita, una enfermedad autoinmune o un tumor.
- 25 15. Un procedimiento para preparar un complejo adyuvante, que comprende una etapa de mezclar una sal de arginina de ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo[f] [1,7]naptiridin-8-il)propanoico con una sal de metal insoluble de tal forma que el ácido adsorbe a la sal de metal insoluble para formar el complejo.
- 30

FIG. 1

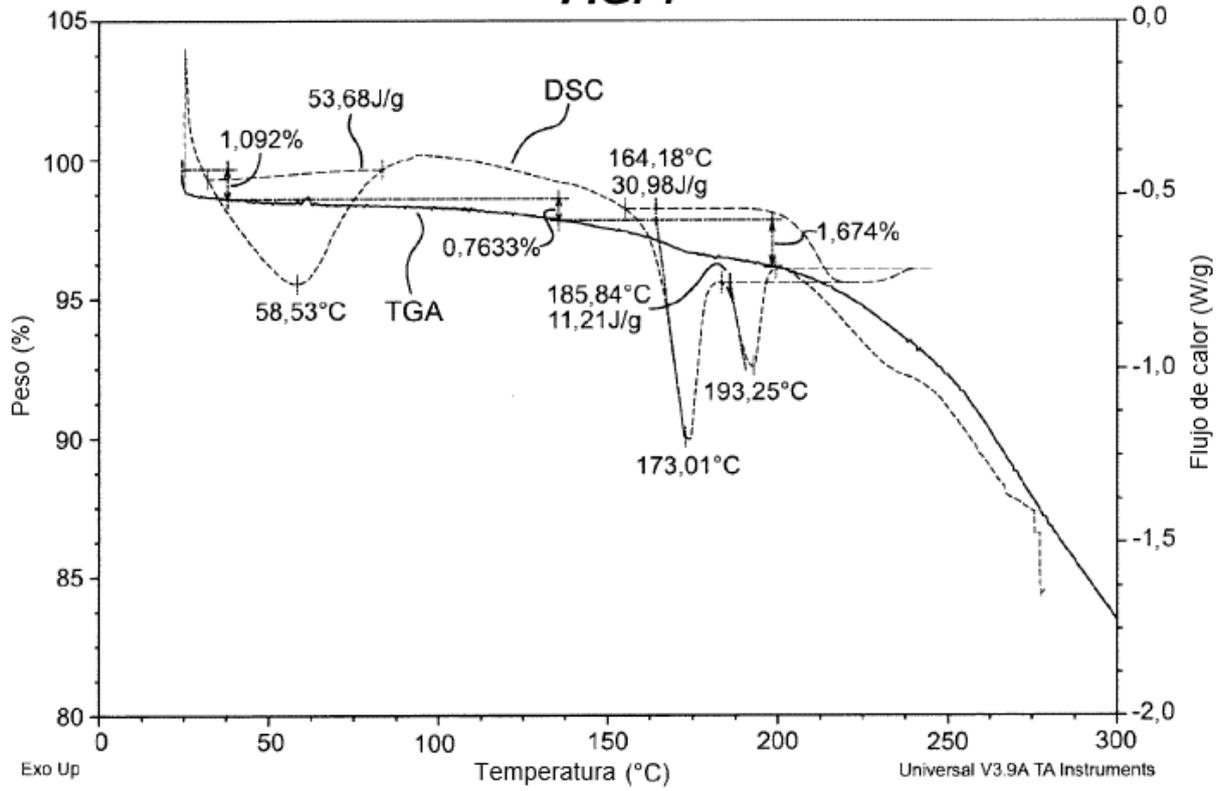


FIG. 1a

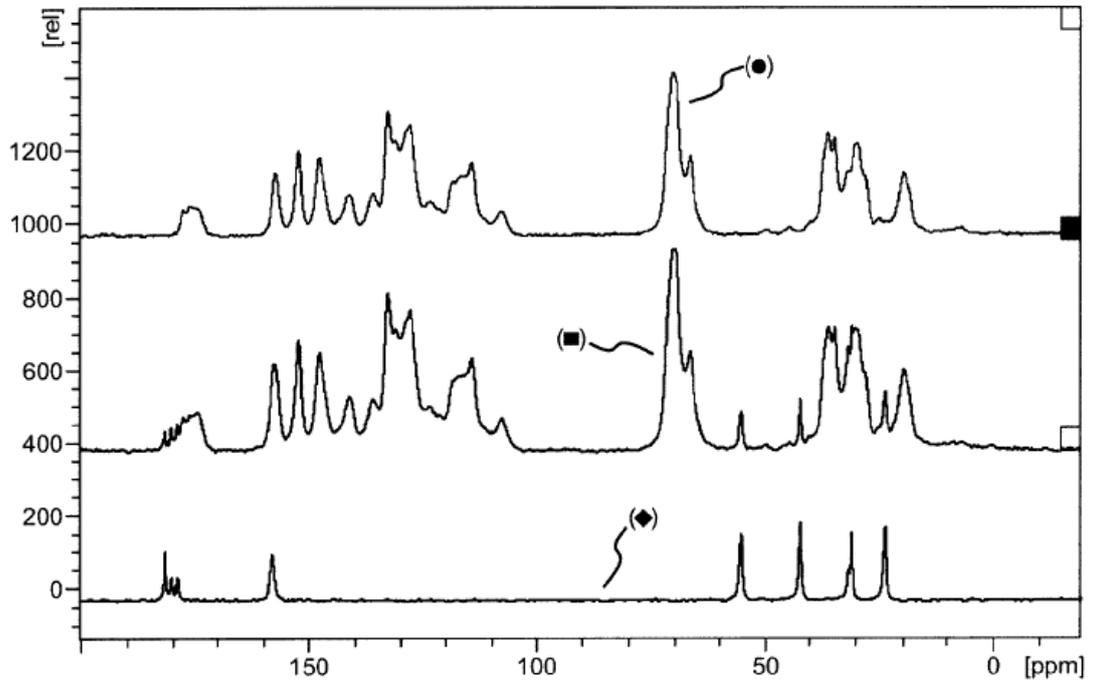


FIG. 1b

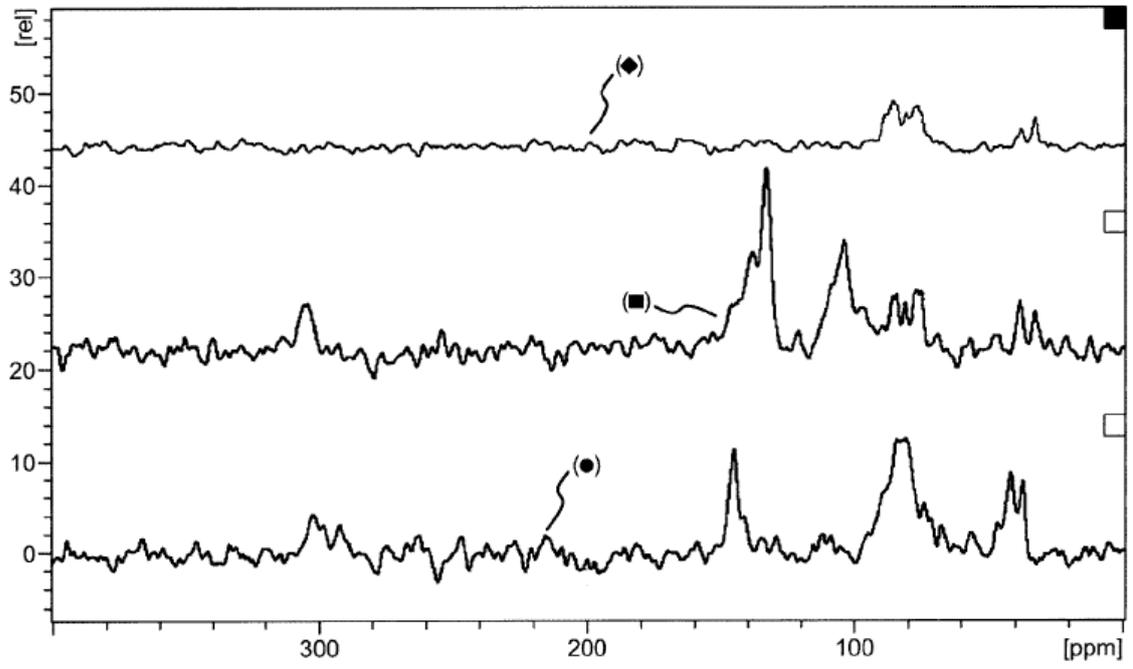


FIG. 2

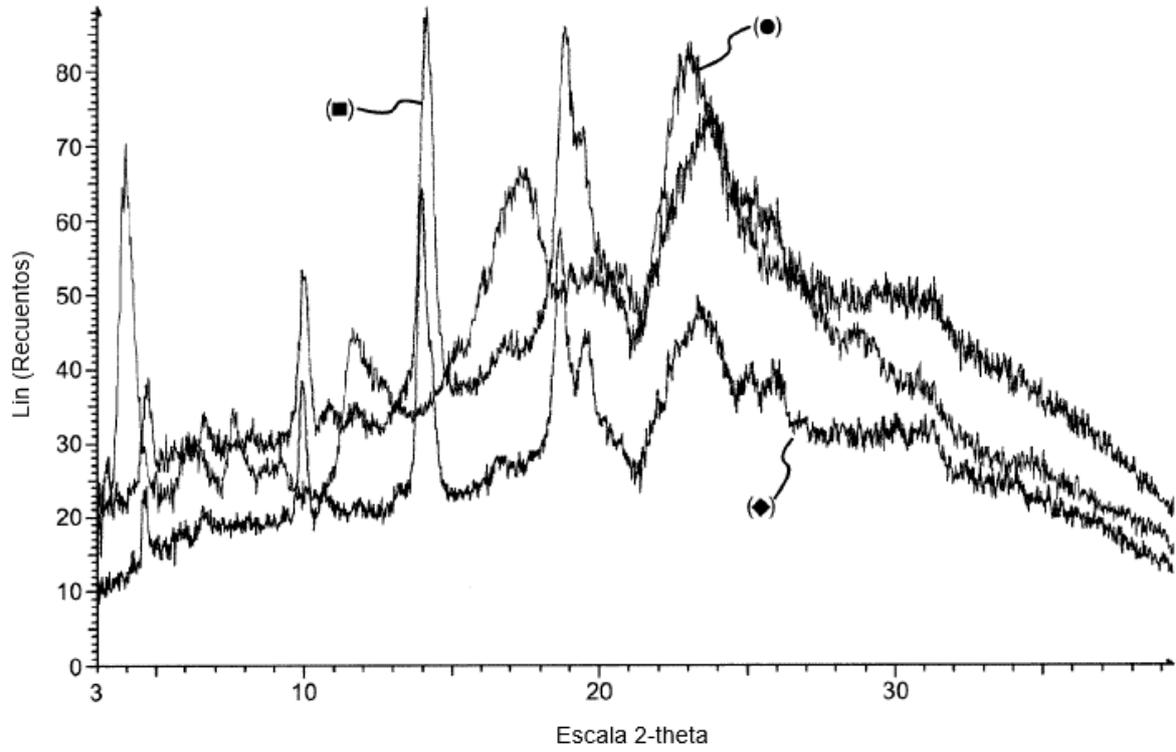


FIG. 3

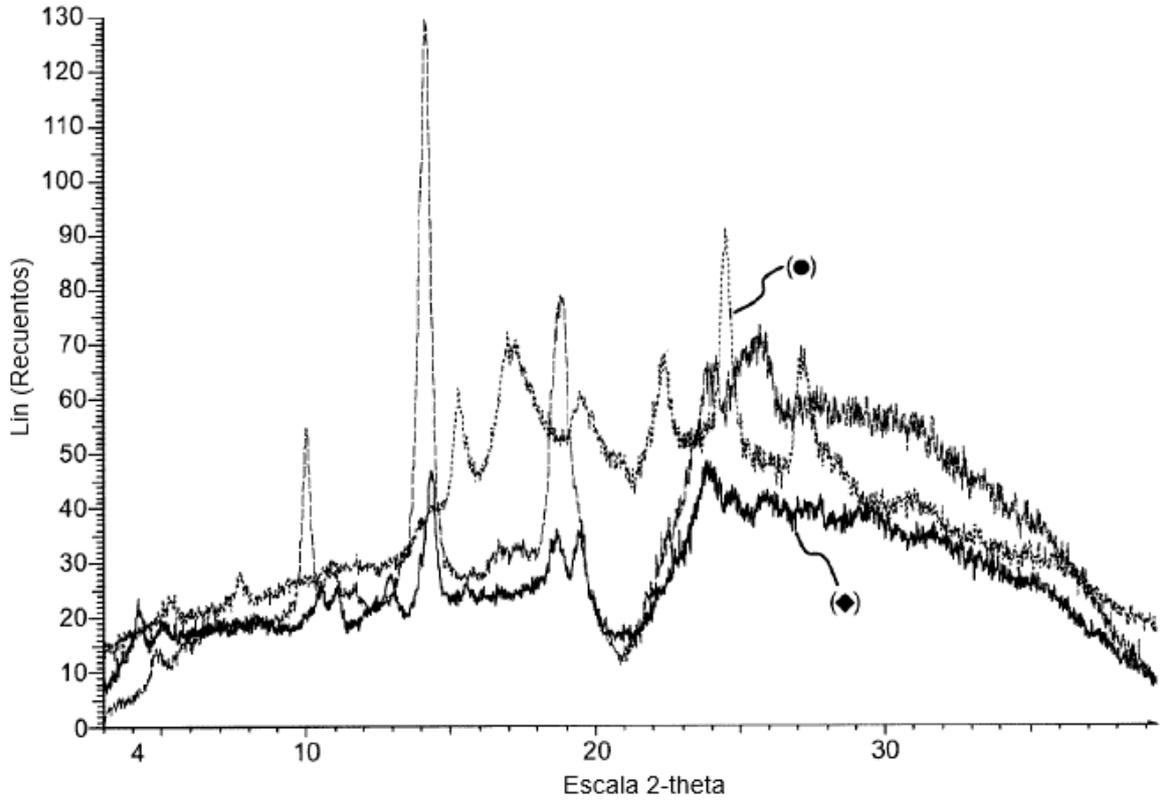


FIG. 3a

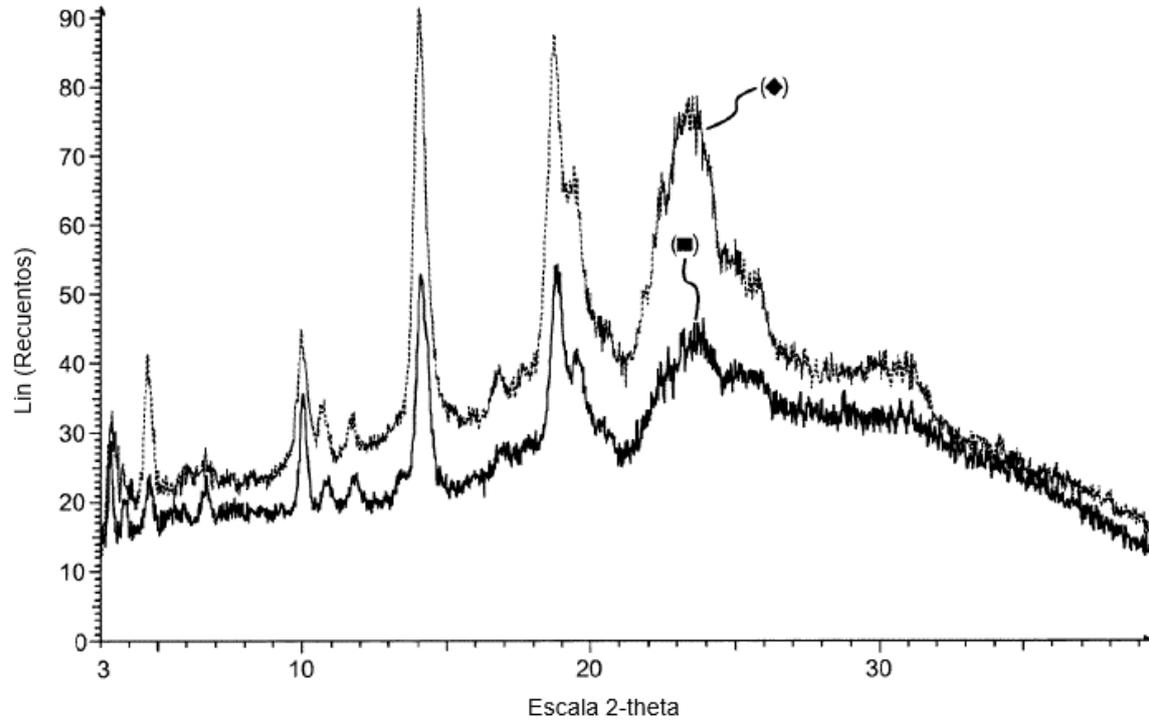


FIG. 4

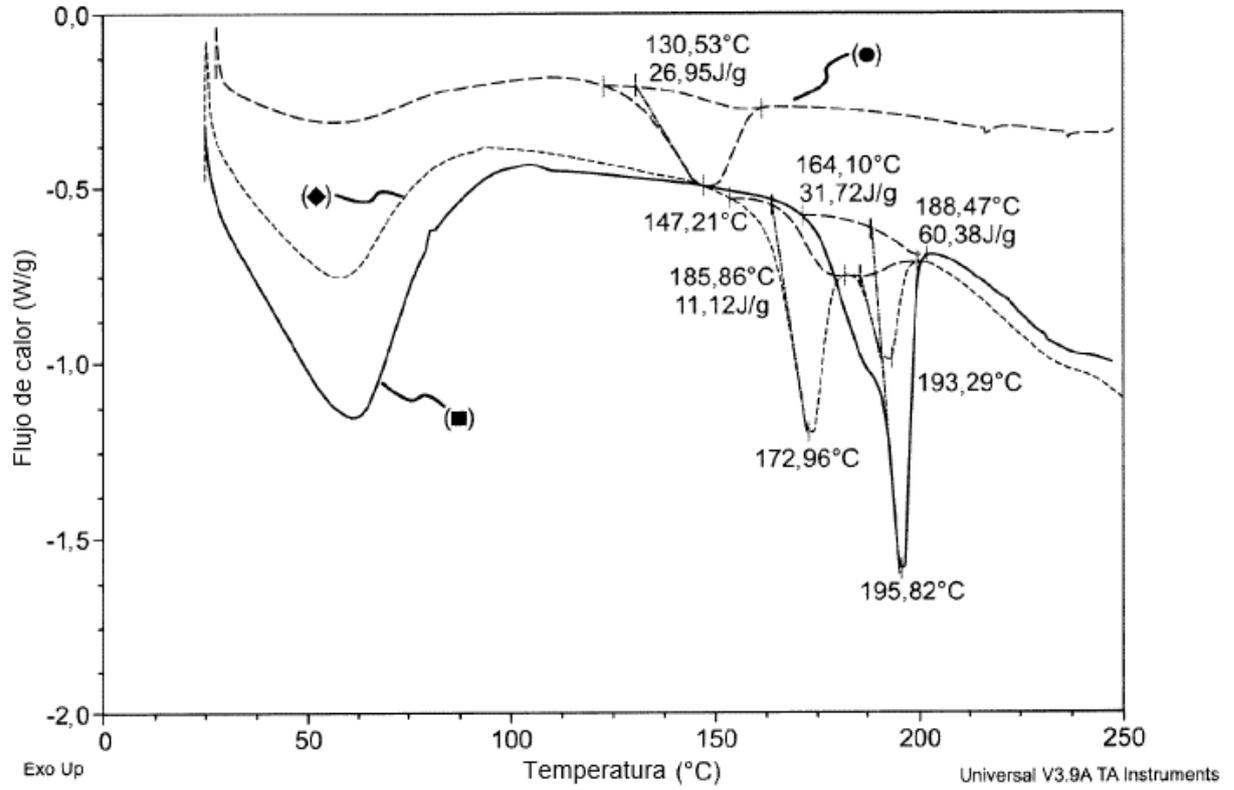


FIG. 5

