

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 269**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

A61K 31/7084 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2014** **PCT/US2014/038525**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014** **WO14189805**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2014** **E 14800848 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019** **EP 2996473**

54 Título: **Composiciones y métodos de activación de la señalización dependiente del "estimulador de los genes de interferón"**

30 Prioridad:

18.05.2013 US 201361825005 P
08.11.2013 US 201361902125 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2020

73 Titular/es:

ADURO BIOTECH, INC. (50.0%)
740 Heinz Avenue
Berkeley, CA 94710, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)

72 Inventor/es:

DUBENSKY, THOMAS W., JR.;
KANNE, DAVID B.;
LEONG, MEREDITH LAI LING;
GLICKMAN, LAURA HIX;
VANCE, RUSSELL E. y
LEMMENS, EDWARD EMILE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 754 269 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

Composiciones y métodos de activación de la señalización dependiente del "estimulador de los genes de interferón

5 **Antecedentes de la invención**

El sistema inmunitario humano se puede dividir, en general, en dos grupos, que se denominan "inmunidad innata" e "inmunidad adaptativa". El grupo innato del sistema inmunitario es predominantemente responsable de una respuesta inflamatoria inicial a través de una serie de factores solubles, incluyendo el sistema del complemento y el sistema de quimiocina/citocina; y varios tipos de células especializadas, entre los que se incluyen los mastocitos, los macrófagos, las células dendríticas (DC) y los linfocitos citolíticos naturales. Por el contrario, el grupo de inmunidad adaptativa implica una respuesta de anticuerpos retardada y de mayor duración, junto con respuestas de linfocitos T CD8+ y CD4+ que desempeñan un papel fundamental en la memoria inmunológica contra un antígeno. Se puede identificar un tercer grupo del sistema inmunitario que implica linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T con repertorios limitados de receptores de linfocitos T tales como linfocitos T NK y linfocitos T MAI.

Para una respuesta inmunitaria eficaz hacia un antígeno, las células presentadoras de antígeno (APC) deben procesar y mostrar el antígeno en un contexto MHC adecuado a un linfocito T, que luego dará lugar a la estimulación de los linfocitos T citotóxicos y auxiliares. Tras la presentación del antígeno, debe producirse una interacción correcta de las moléculas coestimuladoras tanto en las APC como en los linfocitos T, o se inhibirá la activación. GM-CSF e IL-12 sirven como moléculas proinflamatorias eficaces en muchos modelos tumorales. Por ejemplo, GM-CSF induce a las células precursoras mieloides a proliferar y diferenciarse en células dendríticas (DC), aunque se necesitan señales adicionales para activar su maduración a las células presentadoras de antígeno eficaces necesarias para la activación de los linfocitos T. Las barreras a las terapias inmunitarias eficaces incluyen la tolerancia al antígeno dirigido, que puede limitar la inducción de linfocitos T CD8 citotóxicos de magnitud y función apropiadas, el tráfico escaso de los linfocitos T generados hacia sitios de células malignas y la baja persistencia de la respuesta de los linfocitos T inducida.

Las DC que fagocitan los restos de células tumorales procesan el material para la presentación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), regulan positivamente la expresión de las moléculas coestimuladoras y migran a los ganglios linfáticos regionales para estimular los linfocitos específicos del tumor. Esta vía produce la proliferación y activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ que reaccionan a los antígenos asociados a tumores. De hecho, dichas células pueden detectarse con frecuencia en la sangre, en los tejidos linfoides y en las lesiones malignas de pacientes.

Los nuevos conocimientos acerca de los mecanismos que subyacen a la evasión inmunitaria, junto con los regímenes de tratamiento combinado que potencian la potencia de la vacunación terapéutica, bien directa o indirectamente, a través de la combinación con inhibidores del punto de control inmunitario u otras terapias, han servido de base para el desarrollo de vacunas que inducen una eficaz inmunidad antitumoral. Los CDN di-AMP cíclico (producido por *Listeria monocytogenes*) y su análogo di-GMP cíclico (producido por *Legionella pneumophila*) son reconocidos por la célula hospedadora como un PAMP (patrón molecular asociado al patógeno), que se une al PRR (receptor de reconocimiento de patógenos) conocido como STING. STING es una proteína adaptadora del citoplasma de las células hospedadoras de mamífero que activa el eje de señalización de la quinasa de unión a TANK (TBK1)-IRF3, dando lugar a la inducción de IFN- β y otros productos génicos dependientes de IRF-3 que activan enormemente la inmunidad innata. Ahora se reconoce que STING es un componente de la vía de vigilancia citosólica del hospedador, que detecta la infección con patógenos intracelulares y, como respuesta, induce la producción de IFN- β , conduciendo al desarrollo de una respuesta inmunitaria específica del patógeno protectora adaptativa que consiste en linfocitos T CD4 y CD8 específicos del antígeno, así como anticuerpos específicos del patógeno. Se describen ejemplos de dinucleótidos cíclicos de purina con cierto detalle en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 7.709.458 y 7.592.326; el documento WO2007/054279; y Yan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem Lett.* 18: 5631 (2008).

Sigue existiendo la necesidad de mejores composiciones y métodos para estrategias inmunológicas de tratamiento de enfermedades tales como el cáncer que pueden ser refractarias a los enfoques terapéuticos tradicionales.

Sumario de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones que modulen las respuestas inmunes a enfermedades.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona el dinucleótido cíclico de purina de la reivindicación 1 que induce la producción de interferón de tipo I dependiente del estimulador de los genes de interferón ("STING").

En su papel de adyuvantes, en ciertas realizaciones, las presentes composiciones pueden usarse como adyuvantes en una estrategia terapéutica o profiláctica empleando vacuna/s. Así pues, el CDN de la presente invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, puede usarse junto con una o más vacunas seleccionadas para estimular una respuesta inmunitaria hacia uno o más antígenos predeterminados. El CDN de la presente invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, puede proporcionarse junto con, o además de, dichas vacunas.

Dicha/s vacuna/s puede/n comprender bacterias o virus inactivados o atenuados que comprendan los antígenos de interés, antígenos purificados, vectores de administración víricos o bacterianos vivos diseñados de forma recombinante para expresar y/o secretar los antígenos, vectores de células presentadoras de antígeno (APC) que comprenden células que están cargadas con los antígenos o transfectadas con una composición que comprende un ácido nucleico que codifica los antígenos, vehículos de administración de antígenos liposomales o vectores de ácido nucleico desnudo que codifican los antígenos. Esta lista no pretende ser limitante. A modo de ejemplo, dicha/s vacuna/s también pueden comprender una célula tumoral inactivada que exprese y secrete uno o más de entre GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70, ligando FLT-3.

El CDN de la presente invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, puede administrarse a individuos que lo necesiten mediante varias vías parenterales y no parenterales en formulaciones que contengan portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Las vías preferidas son parenterales e incluyen, pero sin limitación, una o más de entre la administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, intratecal y epidural. También se prefieren las vías intratumorales. En particular, se prefiere la administración por vía subcutánea. Las composiciones farmacéuticas preferidas se formulan en forma de emulsiones acuosas o de aceite en agua.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender, o administrarse junto con, uno o más componentes farmacéuticamente activos adicionales tales como adyuvantes, lípidos, vesículas multilamelares reticuladas entre capas, nanopartículas o micropartículas biodegradables a base de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) [PLGA] o a base de poli-anhídrido, y bicapas lipídicas soportadas por partículas nanoporosas, antagonistas de la vía CTLA-4 y PD-1, agentes bloqueantes de la vía PD-1, bacterias inactivadas que inducen inmunidad innata (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* inactivada o atenuada), composiciones que median la activación inmunitaria innata a través de receptores de tipo Toll (TLR), receptores de tipo (NOD) (NLR), receptores de tipo I basados en genes inducibles por ácido retinoico (RIG) (RLR), receptores de lectina de tipo C (CLR), patrones moleculares asociados a patógenos ("PAMP"), agentes quimioterapéuticos, etc.

En un aspecto relacionado, la presente invención se refiere a métodos de inducción, estimulación o potenciación de una respuesta inmunitaria en un individuo. Estos métodos comprenden administrar el CDN de la presente invención, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, al individuo. Las vías de administración preferidas son parenterales.

En ciertas realizaciones, el método es un método de tratamiento del cáncer. A modo de ejemplo, el CDN de la presente invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, puede proporcionarse solo, o junto con o además de una o más composiciones de vacuna contra el cáncer que se conocen en la técnica. El paciente que recibe dicho tratamiento puede estar padeciendo un cáncer seleccionado del grupo que consiste en una célula de cáncer colorrectal, un cáncer escamoso aerodigestivo, un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer de hígado, un cáncer de estómago, un sarcoma, una leucemia, un linfoma, un mieloma múltiple, un cáncer de ovario, un cáncer uterino, un cáncer de mama, un melanoma, un cáncer de próstata, un carcinoma pancreático y un carcinoma renal. En otras realizaciones, el método es un método de inducción, estimulación o potenciación de una respuesta inmunitaria hacia un patógeno.

Con respecto al tratamiento de un mamífero que padece cáncer, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender administrar al mamífero una cantidad eficaz del CDN de la presente invención, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, opcionalmente, antes o después de una terapia primaria administrada al mamífero para eliminar o destruir células cancerosas que expresan el antígeno de cáncer. Las composiciones de la presente invención pueden proporcionarse como una terapia neoadyuvante; sin embargo, en realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención se administran tras la terapia primaria. En diversas realizaciones, la terapia primaria comprende la cirugía para extirpar las células cancerosas del mamífero, radioterapia para destruir las células cancerosas del mamífero, o cirugía y radioterapia.

En otras realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la administración al mamífero de una cantidad eficaz del CDN de la presente invención para el tratamiento de trastornos en los que el cambio de la inmunidad Th1 a Th2 confiere un beneficio clínico. La inmunidad mediada por células (CMI) se asocia con los linfocitos T TH1 CD4+ que producen citocinas IL-2, interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α . Por el contrario, la inmunidad humoral se asocia con los linfocitos T TH2 CD4+, que producen IL-4, IL-6 y IL-10. La desviación inmunitaria hacia las respuestas TH1 normalmente produce la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos y monocitos. En general, las respuestas Th1 son más eficaces contra los patógenos intracelulares (virus y bacterias que están dentro de las células hospedadoras) y los tumores, mientras que las respuestas Th2 son más eficaces contra las bacterias extracelulares, los parásitos, incluyendo helmintos, y las toxinas. Además, se espera que la activación de la inmunidad innata normalice el equilibrio del sistema inmunitario auxiliar T de tipo 1 y 2 (Th1/Th2) y suprima la reacción excesiva de las respuestas de tipo Th2 que causan alergias dependientes de la inmunoglobulina (Ig) E y asma alérgica.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 representa la señalización mediada por dinucleótidos cíclicos de purina ("CDN"). Un CDN (por ejemplo, di-AMP cíclico o di-GMP cíclico) induce la producción de IFN- β uniéndose al receptor citosólico STING (estimulador

de genes de interferón) e induciendo la señalización a través de la vía TBK-1/IRF-3, dando lugar a la activación tanto autocrina como paracrina de las DC a través de la unión al receptor de IFN y la señalización posterior.

La Fig. 2A representa un esquema de síntesis para [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico y derivados ditio.

La Fig. 2B representa un esquema de síntesis para [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico y derivados ditio.

La Fig. 2C representa las estructuras de los compuestos 10, 20, 21, 22 y 23.

La Fig. 3A representa los resultados de RMN de ^1H para el compuesto 9a.

La Fig. 3B representa los resultados de COSY (eje de ^1H de 3,5-6,0 ppm) para el compuesto 9a.

La Fig. 3C representa los resultados de HMBC (eje de ^1H de 3,0-5,5 ppm) para el compuesto 9a.

La Fig. 3D representa los resultados de RMN de ^1H para el compuesto 21.

La Fig. 3E representa los resultados de COSY (eje de ^1H de 3,5-6,0 ppm) para el compuesto 21.

La Fig. 3F representa los resultados de HMBC (eje de ^1H de 0-9,5 ppm) para el compuesto 21.

La Fig. 3G representa los resultados de HMBC (eje de ^1H de 3,5-5,5 ppm) para el compuesto 21.

La Fig. 3H representa los resultados analíticos de HPLC (ACN al 2-20 %/tampón TEAA 10 mM-20 min) para el compuesto 19b.

La Fig. 4 representa [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico y derivados ditio ribosa O-sustituidos.

La Fig. 5 representa [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico y derivados ditio ribosa O-sustituidos.

La Fig. 6 representa [G(2',5')pA(3',5')p] cíclico y derivados ditio ribosa O-sustituidos.

La Fig. 7 representa la producción de interferón de tipo 1 en linfocitos THP-1 tras la estimulación con diversas moléculas de dinucleótidos cíclicos.

La Fig. 8 representa los niveles de expresión de ARN normalizados de interferones de tipo 1 e interferón gamma en PBMC humanas de donantes independientes tras la estimulación con diversas moléculas de dinucleótidos cíclicos.

La Fig. 9 (A-C) representa los niveles de proteína de interferón alfa y beta de tipo 1 y proteína de interferón gamma en PBMC humanas de donantes independientes tras la estimulación con diversas moléculas de dinucleótidos cíclicos.

La Fig. 10 representa la inducción de IFN- β en células humanas como un distintivo de la potencia adyuvante después del tratamiento con diversas moléculas de dinucleótidos cíclicos.

Las Fig. 11 (a)-(c) representan la regulación positiva de la expresión de CD69 de superficie en linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, respectivamente, como medida de activación inmunitaria después del tratamiento con diversas moléculas de dinucleótidos cíclicos.

La Fig. 12 representa la resistencia de diversos derivados de CDN al tratamiento con fosfodiesterasa.

La Fig. 13 representa varias variantes de STING conocidas.

La Fig. 14 representa la estimulación de estirpes celulares HEK293 que codifican alelos de variantes de STING humanos midiendo el factor de inducción del indicador IFN β -LUC.

La Fig. 15A representa la expresión superficial de MHC de clase I (HLA-ABC), CD80, CD83 y CD86 por células dendríticas humanas estimuladas.

La Fig. 15B son histogramas representativos de la expresión de CD80, CD86, CD83 y MHC de clase I (HLA-ABC) en DC humanas tras la estimulación con LPS o CDN.

La Figura 16 representa la inmunidad de linfocitos T CD8 específicos de OVA en PBMC en ratones C57BL/6 a los 7 días de la vacunación con proteína OVA adyuvada con dinucleótido cíclico.

La Figura 17 representa la inmunidad de linfocitos T CD8 específicos de OVA en PBMC en ratones C57BL/6 o goldentickt (STING -/-) a los 7 días de la vacunación con proteína OVA adyuvada con dinucleótido cíclico.

5 La Fig. 18 representa el volumen tumoral en un modelo de melanoma B 16 después del tratamiento con diversas moléculas de dinucleótidos cíclicos.

La Fig. 19 representa curvas de supervivencia en un modelo de tumor CT26 después del tratamiento con diversas moléculas de dinucleótidos cíclicos.

10 La Fig. 20A representa la inhibición tumoral en ratones C57BL/6 de tipo silvestre tras la administración de ML RR-CDN en comparación con los ratones de control que reciben HBSS y dinucleótido CpG.

La Fig. 20B representa los resultados obtenidos en ratones deficientes en STING.

15 La Fig. 21A representa el rechazo de carcinomas de colon CT26 establecidos tras la administración de ML RR-CDN.

La Fig. 21B representa la inducción de IFN- γ de ratones tratados con ML RR-CDA.

20 La Fig. 22A representa el rechazo de carcinomas mamarios 4T1 establecidos tras la administración de ML RR-CDN.

La Fig. 22B representa la protección contra la nueva exposición con células tumorales CT26.

25 La Fig. 23 representa la inhibición del tumor primario tratado en animales portadores tanto de tumores CT26 (A) como de tumores 4T1 (B) tras la administración de ML RR-CDA, en comparación con el control del vehículo HBSS.

La Fig. 24A representa la inhibición del tumor primario tratado en melanoma B 16 tras la administración de ML RR-CDA.

30 Las Fig. 24B y C representan la inhibición del crecimiento de ganglios tumorales pulmonares distales tras la administración de ML RR-CDA, en comparación con el control del vehículo HBSS en forma gráfica (B) y en el propio tejido pulmonar en forma fotográfica (C).

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de un nuevo estimulador inmunitario de dinucleótido cíclico (CDN) altamente activo que activa las CD a través de un receptor citoplasmático recientemente descubierto conocido como STING (estimulador de genes de interferón). En particular, el CDN 2',5',3',5' de la presente invención induce la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

Los conocimientos recientes sobre el diseño y desarrollo de adyuvantes se basan en una comprensión fundamental de que las estructuras microbianas conservadas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) son detectadas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de las células hospedadoras, generando una cascada de señalización cadena abajo que da lugar a la inducción de citocinas y quimiocinas, y al inicio de una respuesta inmunitaria adaptativa específica. La forma en que el sistema inmunitario innato se ve comprometido por el complemento PAMP de un microbio conforma el desarrollo de una respuesta adaptativa que sea apropiada para combatir el patógeno invasor causante de la enfermedad. Un objetivo del diseño de adyuvantes es seleccionar los PAMP definidos o moléculas sintéticas específicas de los PRR designados para iniciar una respuesta deseada. Los adyuvantes tales como el monofosforil lípido A (MPL) y CpG son PAMP reconocidos por los receptores de tipo Toll (TLR), una clase de PRR transmembrana que señalizan a través de moléculas adaptadoras MyD88 y Trif, y median la inducción de citocinas proinflamatorias dependientes de NF- κ B. MPL (agonista de TLR-4) y CpG (agonista de TLR-9) son adyuvantes clínicamente avanzados, y son componentes de vacunas aprobadas o pendientes de aprobación por la FDA. Mientras que los TLR presentes en la superficie celular (por ejemplo, TLR-4) y los endosomas (por ejemplo, CpG) detectan patógenos extracelulares y vacuolares, el ciclo de crecimiento productivo de múltiples patógenos, incluyendo virus y bacterias intracelulares, se produce en el citosol. La compartimentación de PRR extracelulares, vacuolares y citosólicos han conducido a la hipótesis de que el sistema inmunitario innato distingue entre microbios patógenos y no patógenos mediante el control del citosol. Debería ser evidente para un experto en la materia que los agonistas específicos de los PRR que comprenden la vía de vigilancia citosólica inician el desarrollo de la inmunidad protectora contra patógenos intracelulares, y esto es relevante para el diseño de vacunas. Estos mismos ligandos de dirección también serán esenciales en el desarrollo de vacunas eficaces dirigidas a tumores malignos, lo que se sabe que requiere linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos del tumor.

65 La activación de la vía de vigilancia citosólica (CSP) es una parte integrante del desarrollo de la inmunidad protectora hacia los patógenos intracelulares. La CSP detecta bacterias, virus y patógenos protozoarios, conduciendo a la activación del eje de señalización de la quinasa de unión a TANK (TBK-1)/IRF-3 y a la inducción de IFN- β y otros

genes regulados simultáneamente. Los ácidos nucleicos víricos y bacterianos activan esta vía, y la inducción de IFN- β es independiente de MyD88 y Trif. Si bien el interferón de tipo I se suele considerar principalmente como una respuesta antivírica del hospedador, la inducción de IFN- β es un distintivo del crecimiento citosólico en macrófagos infectados con la bacteria intracelular *Listeria monocytogenes* (Lm). Una dicotomía bien conocida en el modelo de listeriosis de ratón es que, considerando que Lm de tipo silvestre estimula la potente inmunidad de los linfocitos T CD4 y CD8 que protege a los ratones contra la exposición bacteriana, la vacunación con Lm con eliminación de listeriolisina O (LLO) no genera linfocitos T funcionales ni induce inmunidad protectora. Esta diferencia es una prueba de la necesidad de la expresión de genes de la célula hospedadora y del acceso citosólico por Lm de generar inmunidad protectora mediada por linfocitos T funcionales. El nivel de IFN- β en las células hospedadoras infectadas está regulado por las bombas de evacuación de múltiples fármacos (MDR) de Lm, que segregan moléculas pequeñas no relacionadas estructuralmente, incluyendo antibióticos. El IFN- β no se induce en las células hospedadoras infectadas con mutantes LLO de Lm que están confinados al fagolisosoma. Los niveles normales de IFN- β son inducidos en macrófagos *MyD88*^{-/-} *Trif*^{-/-} infectados deficientes en toda señalización mediada por TLR. Estos datos demuestran que aunque Lm implica a los TLR, en respuesta a la infección con Lm de tipo silvestre, se requiere la CSP de la célula hospedadora para el desarrollo de inmunidad protectora, correlacionado con la inducción de IFN- β .

Los dinucleótidos cíclicos (CDN) activan la vía de vigilancia citosólica a través de la unión directa al PRR citosólico, STING. La respuesta del interferón de tipo I a la infección por Lm y otras bacterias intracelulares se debe a la secreción de di-AMP cíclico o su dinucleótido cíclico relacionado (CDN), di-GMP cíclico, y su unión directa a DDX41 y helicasa de caja DEAD (aspartato-glutamato-alanina-aspartato) y STING (estimulador de genes de interferón), un receptor recientemente definido de la vía de vigilancia citosólica. Los CDN son segundos mensajeros expresados por la mayoría de las bacterias, y regulan diversos procesos, incluyendo la motilidad y formación de biopelículas. Además de activar la vía de señalización TBK-1/IRF-3, en respuesta a la unión a los CDN, STING también activa la quinasa I κ B, dando lugar a la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo, activando la expresión de múltiples genes proinflamatorios.

Hasta hace poco, se desconocía cómo STING detecta el ADN citoplasmático. A diferencia de AIM2, que se une directamente al ADNbc, STING carece de dominios evidentes de unión al ADN. Se desconocía si otros ADN candidatos, tales como DDX41, DNA-PK y DAI quinasa, eran mediadores esenciales de la señalización de ADNbc a través de STING. Este enigma se resolvió con el descubrimiento de la GMP-AMP cíclico sintasa (cGAS), una nucleotidil transferasa de la célula hospedadora que, en respuesta a la unión del ADNbc, sintetiza un segundo mensajero, di-GMP-AMP cíclico, que se une directamente a STING e inicia una cascada de señalización a través del eje TBK-1/IRF-3, dando lugar a la inducción de IFN. Además, el detector de ADN inmunitario innato de cGAS produce un dinucleótido cíclico no canónico que activa la señalización de STING. A diferencia del segundo mensajero de dinucleótido cíclico producido por las bacterias, en el que el puente internucleotídico de fosfato está unido por enlaces bis-(3', 5'), el puente internucleotídico de fosfato de GMP-AMP cíclico sintetizado por cGAS está unido por enlaces 2', 5' y 3', 5' no canónicos, representado por c[G(2',5')pA(3',5')p]-. Así pues, STING (estimulador de genes de interferón) se ha convertido en una vía central para detectar los ácidos nucleicos patógenos citosólicos, ya sea a través de la unión directa de dinucleótidos cíclicos (CDN) secretados por la bacteria intracelular⁶ o mediante la unión de un segundo mensajero de c-GMP-AMP, sintetizado por la GMP-AMP sintasa cíclico (cGAS) de la célula hospedadora en respuesta a la unión de ácidos nucleicos patógenos citosólicos.

Las moléculas de CDN nativas son sensibles a la degradación por las fosfodiesterasas que están presentes en las células hospedadoras, por ejemplo en células presentadoras de antígeno, que toman formulaciones de vacunas que contienen dichas moléculas de CDN nativas. La potencia de un adyuvante definido puede verse disminuida por dicha degradación, ya que el adyuvante no podría unirse y activar su diana de PRR definida. Se podría medir una potencia adyuvante más baja, por ejemplo, por una menor cantidad de expresión inducida de una molécula característica de la inmunidad innata (por ejemplo, IFN- β), correlacionado con una potencia de vacuna más débil, como se define por la magnitud de una respuesta inmunitaria específica del antígeno medida.

En la presente invención, se proporciona un derivado ditio-difosfato de 2',5',3',5'-c-di-AMP. El proceso de síntesis para dicho derivado ditio-difosfato produce una mezcla de diastereómeros, incluyendo Rp,Rp, Sp,Sp, SpRp y Rp,Sp. Estas especies individuales pueden separarse y presentar diferencias sustanciales en sus características farmacéuticas. El compuesto de la presente invención es Rp,Rp.

Definiciones

"Administración", como se usa en el presente documento con respecto a un ser humano, mamífero, sujeto mamífero, animal, sujeto veterinario, sujeto placebo, sujeto de investigación, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere, sin limitación, al contacto de un ligando exógeno, reactivo, placebo, molécula pequeña, agente farmacéutico, agente terapéutico, agente de diagnóstico o composición con el sujeto, la célula, el tejido, el órgano o el fluido biológico, y similares. "Administración" puede referirse, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación, placebo y experimentales. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. La "administración" también abarca tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, mediante un reactivo, un diagnóstico, una composición de unión u otra célula. Por "administrados juntos" no se entiende que dos o más

agentes se administren como una sola composición. Aunque la presente invención contempla la administración como una sola composición única, dichos agentes pueden ser administrados a un solo sujeto como administraciones separadas, que pueden ser al mismo tiempo o en diferentes momentos, y que puede ser por la misma vía o diferentes vías de administración.

5 Un "agonista" en lo que se refiere a un ligando y a un receptor, comprende una molécula, una combinación de moléculas, un complejo o una combinación de reactivos, que estimula el receptor. Por ejemplo, un agonista del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) puede abarcar GM-CSF, una muteína o un derivado de GM-CSF, un péptido mimético de GMCSF, Una molécula pequeña que imita la función biológica de GM-CSF o un anticuerpo que estimula el receptor de GM-CSF.

10 Un "antagonista", en lo que se refiere a un ligando y a un receptor, comprende una molécula, una combinación de moléculas o un complejo, que inhibe, contrarresta, regula negativamente y/o desensibiliza el receptor. "Antagonista" abarca cualquier reactivo que inhibe una actividad constitutiva del receptor. Una actividad constitutiva es aquella que se manifiesta en ausencia de una interacción entre ligando y receptor. "Antagonista" también abarca cualquier reactivo que inhiba o prevenga una actividad estimulada (o regulada) de un receptor. A modo de ejemplo, un antagonista del receptor de GM-CSF incluye, sin implicar ninguna limitación, un anticuerpo que se une al ligando (GM-CSF) y evita que se una al receptor, o un anticuerpo que se une al receptor y evita que el ligando se una al receptor, o donde el anticuerpo bloquea el receptor en una configuración inactiva.

20 Por "sustancialmente purificados" con respecto a los CDN se entiende que una especie específica representa al menos el 50 %, más a menudo representa al menos el 60 %, normalmente, representa al menos el 70 %, más normalmente, representa al menos el 75 %, lo más normalmente representa al menos el 80 %, por lo general, representa al menos el 85 %, más generalmente representa al menos el 90 %, lo más generalmente representa al menos el 95 % y convencionalmente representa al menos el 98 % en peso, o más, de la actividad de CDN presente en una composición. Los pesos del agua, tampones, sales, detergentes, reductores, inhibidores de proteasa, estabilizadores (incluyendo una proteína añadida tal como la albúmina) y los excipientes, en general, no se usan en la determinación de la pureza.

30 Que se une "específicamente" o "selectivamente", en referencia a un ligando/receptor, ácido nucleico/ácido nucleico complementario, anticuerpo/antígeno u otro par de unión (por ejemplo, una citocina a un receptor de citocinas) (denominándose, en general, cada uno "biomolécula diana" o "diana") indica una reacción de unión relacionada con la presencia de la diana en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. La unión específica puede significar, por ejemplo, que el compuesto de unión, el ligando de ácido nucleico, el anticuerpo, o la composición de unión derivada del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, del método contemplado se une a su diana con una afinidad que suele ser al menos un 25 % superior, más normalmente de al menos un 50 % superior, lo más normalmente de al menos un 100 % (2 veces) superior, normalmente, al menos diez veces superior, más normalmente al menos 20 veces superior y más normalmente al menos 100 veces superior que la afinidad con una molécula no diana.

40 "Ligando" se refiere a una molécula pequeña, ácido nucleico, péptido, polipéptido, sacárido, polisacárido, glicano, glucoproteína, glicolípido o combinaciones de los mismos que se unen a una biomolécula diana. Si bien dichos ligandos pueden ser agonistas o antagonistas de un receptor, un ligando también abarca un agente de unión que no es un agonista o antagonista, y no tiene propiedades agonistas o antagonistas. La unión específica de un ligando con su diana afín se suele expresar en términos de una "afinidad". En realizaciones preferidas, los ligandos de la presente invención se unen con afinidades de entre aproximadamente 10^4 M^{-1} y aproximadamente 10^8 M^{-1} . La afinidad se calcula como $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_{off} es la constante de velocidad de disociación, k_{on} es la constante de velocidad de asociación y K_d es la constante de equilibrio).

50 La afinidad se puede determinar en equilibrio midiendo la fracción unida (r) del ligando marcado a diversas concentraciones (c). Los datos se representan usando la ecuación de Scatchard: $r/c = K(n-r)$: en la que r = moles de ligando unido/mol de receptor en equilibrio; c = concentración de ligando libre en equilibrio; K = constante de asociación de equilibrio; y n = número de sitios de unión al ligando por molécula receptora. Mediante el análisis gráfico, r/c se representa en el eje Y frente a r en el eje X, produciendo así un diagrama de Scatchard. La medición de la afinidad mediante el análisis de Scatchard es bien conocida en la técnica. Véanse, por ejemplo, van Erp *et al.*, *J. Immunoassay* 12: 425-43, 1991; Nelson y Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.* 27: 65-8, 1988. En una alternativa, la afinidad se puede medir por calorimetría de valoración isotérmica (ITC). En un experimento típico de ITC, se valora una solución de ligando en una solución de su diana afín. Se controla a lo largo del tiempo el calor liberado tras su interacción (ΔH). A medida que se van valorando cantidades sucesivas del ligando en la celda de ITC, la cantidad de calor absorbido o liberado es directamente proporcional a la cantidad de unión. A medida que el sistema alcanza la saturación, la señal de calor disminuye hasta que solo se observan calores de dilución. Luego se obtiene una curva de unión a partir de un diagrama de los calores de cada inyección frente a la proporción de ligando y pareja de unión en la célula. La curva de unión se analiza con el modelo de unión apropiado para determinar K_B , n y ΔH . Cabe señalar que $K_B = 1/K_d$.

65 El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a un organismo humano o no humano. Así pues, los métodos y las composiciones que se describen en el presente documento son aplicables tanto a enfermedades

humanas como veterinarias. En ciertas realizaciones, los sujetos son "pacientes", es decir, seres humanos vivos que reciben atención médica por una enfermedad o afección. Esto incluye a personas sin enfermedad definida que están siendo investigadas en busca de signos de patología. Se prefieren los sujetos que tienen un diagnóstico existente de un determinado cáncer al que se dirigen las composiciones y los métodos de la presente invención. Los cánceres preferidos para el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, cáncer de próstata, carcinoma renal, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y de mama.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad de un reactivo o de una composición farmacéutica que es suficiente para mostrar un beneficio para el paciente, es decir, para causar una disminución, prevención o mejora de los síntomas de la afección que se está tratando. Cuando el agente o la composición farmacéutica comprende un agente de diagnóstico, una "cantidad eficaz para el diagnóstico" se define como una cantidad que es suficiente para producir una señal, una imagen u otro parámetro de diagnóstico. Las cantidades eficaces de la formulación farmacéutica variarán de acuerdo con factores tales como el grado de susceptibilidad del individuo, la edad, el género y el peso del individuo, y respuestas idiosincrásicas del individuo. "Cantidad eficaz" abarca, sin limitación, una cantidad que puede mejorar, invertir, mitigar, prevenir o diagnosticar un síntoma o signo de una afección o trastorno médico, o un proceso causal del mismo. A menos que se indique lo contrario, explícitamente o por el contexto, una "cantidad eficaz" no se limita a una cantidad mínima suficiente para mejorar una afección.

"Tratamiento" o "tratar" (con respecto a una afección o enfermedad) es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen preferentemente resultados clínicos. Para los fines de la presente invención, los resultados beneficiosos o deseados con respecto a una enfermedad incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: prevención de una enfermedad, mejora de una afección asociada con una enfermedad, curación de una enfermedad, disminución de la gravedad de una enfermedad, retraso de la progresión de una enfermedad, alivio de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, aumento de la calidad de vida de una persona que padece una enfermedad y/o prolongación de la supervivencia. De manera análoga, para los fines de la presente invención, los resultados beneficiosos o deseados con respecto a una afección incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: prevención de una afección, mejora de una afección, curación de una afección, disminución de la gravedad de una afección, retraso de la progresión de una afección, alivio de uno o más síntomas asociados con una afección, aumento de la calidad de vida de una persona que padece una afección y/o prolongación de la supervivencia. Por ejemplo, en realizaciones en las que las composiciones descritas en el presente documento se usan para el tratamiento del cáncer, los resultados beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: reducción de la proliferación (o destrucción) de las células neoplásicas o cancerosas, reducción de la metástasis de las células neoplásicas encontradas en los cánceres, reducción del tamaño de un tumor, disminución de los síntomas resultantes del cáncer, aumento de la calidad de vida de quienes padecen el cáncer, reducción de la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, retraso de la progresión del cáncer y/o prolongación de la supervivencia de pacientes con cáncer. Dependiendo del contexto, el "tratamiento" de un sujeto puede implicar que el sujeto necesita tratamiento, por ejemplo, en la situación en la que el sujeto comprende un trastorno que se espera mejorar mediante la administración de un reactivo.

"Vacuna" abarca vacunas preventivas. La vacuna también abarca vacunas terapéuticas, por ejemplo, una vacuna administrada a un mamífero que comprende una afección o un trastorno asociado con el antígeno o epítipo proporcionado por la vacuna.

Dinucleótidos cíclicos de purina

Las células procariotas y las células eucariotas usan diferentes moléculas pequeñas para la señalización celular y la comunicación intracelular e intercelular. Los nucleótidos cíclicos tales como cGMP, cAMP, etc. se sabe que tienen actividad reguladora e iniciadora en las células procariotas y eucariotas. A diferencia de las células eucariotas, las células procariotas también usan dinucleótidos cíclicos de purina como moléculas reguladoras. En las células procariotas, la condensación de dos moléculas de GTP es catalizada por la enzima diguanilato ciclasa (DGC), dando diGMP cíclico, que representa un regulador importante en las bacterias.

Un trabajo reciente sugiere que el diGMP cíclico o sus análogos también pueden estimular o mejorar la respuesta inmunitaria o inflamatoria en un paciente, o pueden mejorar la respuesta inmunitaria hacia una vacuna al servir como adyuvante en mamíferos. La detección citosólica de ADN derivado de patógenos requiere la señalización a través de la quinasa de unión TANK 1 (TBK1) y su factor de transcripción cadena abajo, factor 3 regulador de IFN (IRF3). Una proteína transmembrana denominada STING (estimulador de genes de IFN; también conocida como MITA, ERIS, MPYS y TMEM173) funcionan como el receptor de señalización para estos dinucleótidos cíclicos de purina, generando la estimulación del eje de señalización TBK1-IRF3 y una respuesta de interferón de tipo I dependiente de STING. Véase, por ejemplo, la Fig. 1. Burdette *et al.*, *Nature* 478: 515-18, 2011 demostraron que STING se une directamente al monofosfato de diguanilato cíclico, pero no a otros nucleótidos o ácidos nucleicos no relacionados.

Los dinucleótidos cíclicos de purina para su uso como precursores a fin de obtener el CDN de la presente invención se describen con cierto detalle en, por ejemplo, Gao *et al.*, *Cell* (2013) 153: 1094-1107, doi: 10.1016/j.cell.2013.04.046; las patentes de EE.UU. n.º 7.709.458 y 7.592.326; el documento WO2007/054279; y Yan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem*

Lett. 18: 5631 (2008). Estos CDN pueden modificarse usando técnicas convencionales de química orgánica para producir el CDN de la presente invención. El CDN de la presente invención es un fosforotioato. Los fosforotioatos son una variante de los nucleótidos normales en los que uno de los oxígenos sueltos es reemplazado por un azufre. La sulfuración del enlace internucleotídico reduce drásticamente la acción de las endonucleasas y de las exonucleasas, incluyendo la exonucleasa de ADN POL 1 de 5' a 3' y de 3' a 5', nucleasas S1 y PI, RNasas, nucleasas séricas y fosfodiesterasa de veneno de serpiente. Además, aumenta el potencial para atravesar la bicapa lipídica.

Un enlace de fosforotioato es inherentemente quiral. El experto en la materia reconocerá que los fosfatos de esta estructura pueden existir en forma *R* o *S*. Así pues, son posibles las formas *Rp,Rp*, *Sp,Sp*, *Sp,Rp* y *Rp,Sp*.

Las composiciones de CDN descritas en el presente documento pueden administrarse a un hospedador, ya sea solas o en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para inducir, modificar o estimular una respuesta inmunitaria apropiada. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, respuesta inmunitaria específica, respuesta inmunitaria no específica, respuesta específica y no específica, respuesta innata, respuesta inmunitaria primaria, inmunidad adaptativa, respuesta inmunitaria secundaria, respuesta inmunitaria de memoria, activación de células inmunitarias, proliferación de células inmunitarias, diferenciación de células inmunitarias y expresión de citocinas. En ciertas realizaciones, las composiciones de CDN se administran junto con una o más composiciones adicionales que incluyen vacunas destinadas a estimular una respuesta inmunitaria hacia uno o más antígenos predeterminados; adyuvantes; antagonistas de la vía CTLA-4 y PD-1, lípidos, liposomas, agentes quimioterapéuticos, estirpes celulares inmunomoduladoras, etc.

Las composiciones de CDN pueden administrarse antes, después y/o junto con una composición o modalidad terapéutica o profiláctica adicional. Estas incluyen, sin limitación, molécula coestimuladora B7, interleucina-2, interferón y, GM-CSF, antagonistas de CTLA-4, ligando OX-40/OX-40, ligando CD40/CD40, sargramostim, levamisol, virus vacuna, Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), liposomas, alumbre, adyuvante completo o incompleto de Freund, endotoxinas desintoxicadas, aceites minerales, sustancias tensioactivas tales como la lipolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos y emulsiones de aceite o hidrocarburos. Se prefieren los vehículos de inducción de una respuesta inmunitaria de linfocitos T que estimulan preferentemente una respuesta de linfocitos T citolíticos frente a una respuesta de anticuerpos, aunque también se pueden usar los que estimulan ambos tipos de respuesta. En los casos en los que el agente es un polipéptido, se puede administrar el propio polipéptido o un polinucleótido que codifica el polipéptido. El vehículo puede ser una célula, tal como una célula presentadora de antígeno (APC) o una célula dendrítica. Las células presentadoras de antígeno incluyen tipos de células tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Otras células profesionales presentadoras de antígeno incluyen monocitos, células de Kupffer de zona marginal, microglia, células de Langerhans, células dendríticas interdigitantes, células dendríticas foliculares y linfocitos T. También se pueden usar células facultativas presentadoras de antígeno. Los ejemplos de células facultativas presentadoras de antígeno incluyen astrocitos, células foliculares, endotelio y fibroblastos. El vehículo puede ser una célula bacteriana que se transforme para expresar el polipéptido o para administrar un polinucleótido que se exprese posteriormente en células del individuo vacunado. Se pueden añadir adyuvantes, tales como el hidróxido de aluminio o el fosfato de aluminio, para aumentar la capacidad de la vacuna para generar, mejorar o prolongar una respuesta inmunitaria. Otros materiales adicionales, tales como citocinas, quimiocinas y secuencias de ácido nucleico bacteriano, como CpG, un agonista del receptor de tipo Toll (TLR) 9, así como agonistas adicionales para TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 8, TLR9, incluyendo lipoproteína, LPS, monofosforil lípido A, ácido lipoteicoico, imiquimod, resiquimod, y además, agonistas del gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) tales como poli I:C, usados por separado o en combinación con las composiciones descritas también son posibles adyuvantes. Otros ejemplos representativos de adyuvantes incluyen el adyuvante sintético QS-21 que comprende una saponina homogénea purificada de la corteza de *Quillaja saponaria* y *Corynebacterium parvum* (McCune *et al.*, *Cancer*, 1979; 43:1619). Se entenderá que el adyuvante está sujeto a optimización. En otras palabras, el experto en la materia puede participar en experimentos de rutina para determinar el mejor adyuvante que se pueda usar.

Los métodos para la administración conjunta con un agente terapéutico adicional son bien conocidos en la técnica (Hardman, *et al.* (eds.), (2001) "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) "Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach", Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) "Cancer Chemotherapy and Biotherapy", Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA).

Debido a las propiedades adyuvantes del compuesto de la presente invención, su uso también puede combinarse con otras modalidades terapéuticas, incluyendo otras vacunas, adyuvantes, antígeno, anticuerpos y moduladores inmunitarios. Los ejemplos se proporcionan a continuación.

Adyuvantes

Además del dinucleótido cíclico de purina descrito anteriormente, las composiciones de la presente invención pueden comprender además una o más sustancias adicionales que, por su naturaleza, pueden actuar para estimular o utilizar de otro modo el sistema inmunitario para responder a los antígenos de cáncer presentes en la/s célula/s tumoral/es inactivada/s. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, lípidos, liposomas, bacterias inactivadas que inducen inmunidad innata (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* inactivada o atenuada), composiciones que median la

activación inmunitaria innata a través de receptores de tipo Toll (TLR), receptores de tipo (NOD) (NLR), receptores de tipo I basados en genes inducibles por el ácido retinoico (RIG) (RLR) y/o receptores de lectina de tipo C (CLR). Los ejemplos de PAMP incluyen lipoproteínas, lipopolipéptidos, peptidoglicanos, zimosano, lipopolisacárido, porinas de *Neisseria*, flagelina, profilina, galactoceramida, dipéptido de muramilo. Los peptidoglicanos, las lipoproteínas y los ácidos lipoteicoicos son componentes de la pared celular de los organismos Gram-positivos. Los lipopolisacáridos son expresados por la mayoría de las bacterias, siendo el MPL un ejemplo. La flagelina se refiere al componente estructural de los flagelos bacterianos que es secretado por bacterias patógenas y comensales. La α -galactosilceramida (α -GalCer) es un activador de los linfocitos T citolíticos naturales (NKT). El dipéptido de muramilo es un motivo de peptidoglucano bioactivo común a todas las bacterias. Esta lista no pretende ser limitante. A continuación, se describen las composiciones adyuvantes preferidas.

Antagonistas de la vía CTLA-4 y PD-1

Se cree que CTLA-4 es un importante regulador negativo de la respuesta inmunitaria adaptativa. Los linfocitos T activados regulan positivamente CTLA-4, que se une a CD80 y CD86 en las células presentadoras de antígeno con mayor afinidad que CD28, inhibiendo así la estimulación de los linfocitos T, la expresión del gen de IL-2 y la proliferación de los linfocitos T. Se han observado efectos antitumorales del bloqueo de CTLA4 en modelos murinos de carcinoma de colon, cáncer de próstata metastásico y melanoma metastásico.

El ipilimumab (Yervoy™) y el tremelimumab son anticuerpos monoclonales humanizados que se unen al CTLA4 humano y evitan su interacción con CD80 y CD86. Los estudios de fase I y II con ipilimumab y tremelimumab han demostrado actividad clínica en pacientes con cáncer. Otros reguladores inmunitarios negativos que pueden ser objeto de una estrategia similar incluyen la muerte celular programada 1, el atenuador de linfocitos B y T, el factor de crecimiento transformante beta β , la interleucina-10 y el factor de crecimiento endotelial vascular.

PD-1 es otro regulador negativo de la respuesta inmunitaria adaptativa que se expresa en los linfocitos T activados. PD-1 se une a B7-H1 y B7-DC, y la unión de PD-1 suprime la activación de los linfocitos T. Se han demostrado efectos antitumorales con el bloqueo de la vía PD-1. BMS-936558, MK3475, CT-011, AMP-224 y MDX-1106 se han presentado en la bibliografía como ejemplos de bloqueadores de la vía PD-1 que pueden encontrar uso en la presente invención.

Agonistas de TLR

La expresión "receptor de tipo Toll" (o "TLR"), como se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de la familia de proteínas receptoras de tipo Toll o un fragmento de las mismas que detecta un producto microbiano y/o inicia una respuesta inmunitaria adaptativa. En una realización, un TLR activa una célula dendrítica (DC). Los receptores de tipo Toll (TLR) son una familia de receptores de reconocimiento de patrones que inicialmente se identificaron como detectores del sistema inmunitario innato que reconocen los patógenos microbianos. Los TLR comprenden una familia de moléculas que abarcan membranas conservadas que contienen un ectodominio de repeticiones ricas en leucina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular TIR (Toll/IL-1R). Los TLR reconocen estructuras distintas en los microbios, que se suelen denominar "PAMP" (patrones moleculares asociados a patógenos). La unión del ligando a los TLR genera una cascada de vías de señalización intracelular que inducen la producción de factores implicados en la inflamación y la inmunidad.

En los seres humanos, se han identificado diez TLR. Los TLR que se expresan en la superficie de las células incluyen TLR-1, -2, -4, -5 y -6, mientras que TLR-3, -7/8 y -9 se expresan con el compartimento del RE. Se pueden identificar subconjuntos de células dendríticas humanas basándose en distintos patrones de expresión de TLR. A modo de ejemplo, el subconjunto mielóide o "convencional" de las DC (mDC) expresa TLR 1-8 cuando se estimula, y se produce una cascada de marcadores de activación (por ejemplo, CD80, CD86, MHC de clase I y II, CCR7), citocinas proinflamatorias y quimiocinas. Un resultado de esta estimulación y la expresión resultante es la estimulación de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos del antígeno. Estas DC adquieren una mayor capacidad para captar antígenos y presentarlos de forma adecuada a los linfocitos T. Por el contrario, el subconjunto plasmacitoide de DC (pDC) solo expresa TLR7 y TLR9 tras la activación, con una activación resultante de linfocitos NK, así como de linfocitos T. Como las células tumorales moribundas pueden afectar negativamente a la función de DC, se ha sugerido que la activación de las DC con agonistas de TLR puede ser beneficiosa para estimular la inmunidad antitumoral en un enfoque de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer. También se ha sugerido que el tratamiento exitoso del cáncer de mama usando radiación y quimioterapia requiere la activación de TLR4.

Los agonistas de TLR conocidos en la técnica y que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los siguientes:

- Pam3Cys, un agonista de TLR-1/2;
- CFA, un agonista de TLR-2;
- MALP2, un agonista de TLR-2;
- Pam2Cys, un agonista de TLR-2;
- FSL-1, un agonista de TLR-2;
- Hib-OMPC, un agonista de TLR-2;

ácido polirribosínico:polirribocitídico (Poli I:C), un agonista de TLR-3;
 poliadenosina-ácido poliuridílico (poli AU), un agonista de TLR-3;
 ácido policosínico-policitídico estabilizado con poli-L-lisina y carboximetilcelulosa (Hiltonol®), un agonista de TLR-3;
 5 monofosforil lípido A (MPL), un agonista de TLR-4;
 LPS, un agonista de TLR-4; flagelina bacteriana, un agonista de TLR-5;
 sialil-Tn (STn), un carbohidrato asociado con la mucina MUC1 en una serie de células cancerosas humanas y un agonista de TLR-4;
 imiquimod, un agonista de TLR-7;
 10 resiquimod, un agonista de TLR-7/8;
 loxoribina, un agonista de TLR-7/8; y
 dinucleótido CpG no metilado (CpG-ODN), un agonista de TLR-9.

Debido a sus cualidades adyuvantes, los agonistas de TLR se usan preferentemente en combinaciones con otras vacunas, adyuvantes y/o moduladores inmunitarios, y se pueden combinar en diferentes combinaciones. Así pues, en determinadas realizaciones, el dinucleótido cíclico de purina que se une a STING e induce la activación de TBK1 dependiente de STING y una célula tumoral inactivada que expresa y secreta una o más citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de las células dendríticas, como se describe en el presente documento, puede administrarse junto con uno o más agonistas de TLR con fines terapéuticos.

Agentes terapéuticos de anticuerpos

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo de defensa inmunitario mediado por células mediante el que una célula efectora del sistema inmunitario lisa activamente una célula diana, cuyos antígenos de superficie de membrana han sido unidos por anticuerpos específicos. Es uno de los mecanismos a través del que los anticuerpos, como parte de la respuesta inmunitaria humoral, pueden actuar para limitar y contener la infección. La ADCC clásica está mediada por los linfocitos citolíticos naturales (NK); los macrófagos, los neutrófilos y los eosinófilos también pueden mediar la ADCC. La ADCC es un importante mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales terapéuticos, incluyendo trastuzumab y rituximab, contra los tumores. Los compuestos de la presente invención pueden actuar para potenciar ADCC.

Lo siguiente es una lista ilustrativa de anticuerpos que se pueden usar junto con el compuesto de la presente invención.

Muromonab-CD3: usado para prevenir el rechazo agudo del órgano, por ejemplo, riñón, trasplantes. Las versiones humanizadas son prometedoras para inhibir la destrucción autoinmunitaria de las células beta en la diabetes mellitus de tipo 1.

Infliximab (Remicade®) y adalimumab (Humira®): se unen al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Se usan en algunas enfermedades inflamatorias tales como la artritis reumatoide, la soriasis, la enfermedad de Crohn.

Omalizumab (Xolair®). Se une a la IgE evitando así que la IgE se una a los mastocitos. Se usa contra el asma alérgico.

Daclizumab (Zenapax®). Se une a parte del receptor de IL-2 expuesto en la superficie de los linfocitos T activados. Se usa para prevenir el rechazo agudo de los riñones trasplantados.

Rituximab (nombre comercial = Rituxan®). Se une a la molécula CD20 que se encuentra en la mayoría de los linfocitos B y se usa para tratar los linfomas de linfocitos B.

Ibritumomab (nombre comercial = Zevalin®). Este es un anticuerpo monoclonal contra la molécula CD20 en linfocitos B (y linfomas) conjugados con isótopos. Se administra al paciente con linfoma complementado con Rituxan.

Tositumomab (Bexxar®). Se trata de un conjugado de un anticuerpo monoclonal contra CD20 y el isótopo radioactivo yodo-131 (¹³¹I).

Cetuximab (Erbix®). Bloquea a HER1, un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que se encuentra en algunas células tumorales (algunos cánceres de mama, linfomas).

Trastuzumab (Herceptin®). Bloquea a HER2, un receptor del factor de crecimiento sobreexpresado en aproximadamente el 20 % de los cánceres de mama.

Adcetris®. Un conjugado de un anticuerpo monoclonal que se une a CD30, una molécula de la superficie celular expresada por las células de algunos linfomas, pero que no se encuentra en las células madre normales necesarias para repoblar la médula ósea.

Alemtuzumab (Campath-1H®). Se une a CD52, una molécula que se encuentra en los linfocitos y agota los linfocitos T y los linfocitos B. Ha producido una remisión completa de la leucemia linfocítica crónica y es prometedor para prevenir

el rechazo de los trasplantes de riñón.

Lym-1 (Oncolym®). Se une al antígeno de histocompatibilidad codificado por HLA-DR que puede expresarse a altos niveles en las células de linfoma.

5

Ipilimumab (Yervoy®) que actúa para potenciar la respuesta inmunitaria del organismo a los tumores.

Vitaxin. Se une a una integrina vascular (alfa-v/beta-3) que se encuentra en los vasos sanguíneos de los tumores, pero no en los vasos sanguíneos que abastecen a los tejidos normales. En ensayos clínicos de fase II, Vitaxin ha demostrado ser prometedor en la reducción de tumores sólidos sin efectos secundarios dañinos.

10

Bevacizumab (Avastin®). Se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) evitando que se una a su receptor. Se usa para el tratamiento de los cánceres colorrectales.

15

Abciximab (ReoPro®). Inhibe la aglomeración de las plaquetas al unirse a los receptores en su superficie que normalmente son unidos por fibrinógeno. Útil en la prevención de la reobstrucción de las arterias coronarias en pacientes sometidos a angioplastia.

Agentes de administración

20

Los liposomas son vesículas formadas a partir de una ("unilamelares") o más ("multilamelares") capas de fosfolípidos. Debido al carácter anfipático de los componentes básicos fosfolipídicos, los liposomas normalmente comprenden una capa hidrófila que presenta una cara externa hidrófila y que encierra un núcleo hidrófobo. La versatilidad de los liposomas en la incorporación de componentes hidrófilos/hidrófobos, su naturaleza no tóxica, la biodegradabilidad, la biocompatibilidad, la adyuvancia, la inducción de inmunidad celular, la propiedad de liberación sostenida y pronta absorción por los macrófagos, los hace candidatos atractivos para la administración de antígenos.

25

El documento WO2010/104833 describe preparados liposomales adecuados. Dichas formulaciones liposomales, denominadas en el presente documento VesiVax® (Molecular Express, Inc.), con o sin el/los "polipéptido/s o carbohidrato/s inmunogénico/s" mencionados anteriormente, pueden contener uno o más componentes adicionales tales como peptidoglicano, lipopéptido, lipopolisacárido, monofosforil lípido A, ácido lipoteicoico, resiquimod, imiquimod, flagelina, oligonucleótidos que contienen motivos CpG no metilados, beta-galactosilceramida, dipéptido de muramilo, ácido todo-*trans*-retinoico, ARN vírico bicatenario, proteínas de choque térmico, bromuro de dioctadecildimetilamonio, tensioactivos catiónicos, agonistas de los receptores de tipo Toll, dimiristoiltrimetilamoniopropano y agonistas de los receptores de tipo Nod. De manera ventajosa, estas formulaciones liposomales pueden usarse para administrar el CDN de acuerdo con la presente invención.

30

35

Además, mientras que las formulaciones liposomales analizadas anteriormente emplean un "derivado de esteroides" como anclaje para unir un polipéptido o carbohidrato inmunogénico a un liposoma, el esteroide se puede proporcionar simplemente como un esteroide no conjugado tal como el colesterol.

40

Los métodos adecuados para preparar liposomas a partir de mezclas de lípidos son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Basu y Basu, "Liposome Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)", Humana Press, 2002; Gregoriadis, "Liposome Technology", 3ª Edición, Informa HealthCare, 2006. Los métodos preferidos incluyen métodos de extrusión, Homogeneización y sonicación descritos en dichas referencias. Un método ilustrativo para preparar liposomas de uso en la presente invención, que comprende secar una mezcla de lípidos, seguido de la hidratación en un vehículo acuoso y la sonicación para formar liposomas, se describe en el documento WO2010/104833.

45

En ciertas realizaciones, los liposomas se proporcionan dentro de un intervalo de tamaño medio en particular. Se puede seleccionar el tamaño de los liposomas, por ejemplo, mediante la extrusión de un vehículo acuoso que comprende liposomas a través de membranas que tienen un tamaño de poro preseleccionado y la recogida del material que fluye a través de la membrana. En realizaciones preferidas, los liposomas se seleccionan para que tengan esencialmente entre 50 y 500 nm de diámetro, más preferentemente, esencialmente entre 50 y 200 nm de diámetro, y lo más preferentemente, esencialmente entre 50 y 150 nm de diámetro. El término "esencialmente", como se usa en el presente documento en este contexto, significa que al menos el 75 %, más preferentemente, el 80 %, y lo más preferentemente, al menos el 90 % de los liposomas está dentro del intervalo designado.

50

55

Otros lípidos y adyuvantes de tipo lipídico que pueden encontrar uso en la presente invención incluyen emulsiones de aceite en agua (o/w) (véase, por ejemplo, Muderhwa *et al.*, *J. Pharmaceut. Sci.* 88: 1332-9, 1999), TLR VesiVax® (Molecular Express, Inc.), digitonina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.698.432) y lípidos de glucopiranosilo (véase, por ejemplo, La solicitud de patente de EE.UU. n.º 20100310602).

60

Las nanopartículas también representan sistemas de administración de fármacos adecuados para la mayoría de las vías de administración. Con los años, se ha explorado varios polímeros naturales y sintéticos para la preparación de nanopartículas, de los cuales el poli(ácido láctico) (PLA), el poli(ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros (PLGA) han

65

sido ampliamente investigados debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Las nanopartículas y otros nanovehículos actúan como posibles vehículos de varias clases de fármacos, tales como agentes anticancerígenos, agentes antihipertensivos, inmunomoduladores y hormonas; y macromoléculas tales como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos y anticuerpos. Véase, por ejemplo, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 21:387-422, 2004; "Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine" 1:22-30, 2005.

Agentes quimioterapéuticos

En realizaciones adicionales, los métodos implican además administrar al sujeto una cantidad eficaz de uno o más agentes quimioterapéuticos como tratamiento adicional. En ciertas realizaciones, el uno o más agentes quimioterapéuticos se seleccionan entre acetato de abiraterona, altretamina, anhidrovinblastina, auristatina, bexaroteno, bicalutamida, BMS 184476, sulfonamida de 2,3,4,5,6-pentafluoro-*N*-(3-fluoro-4-metoxifenil)benceno, bleomicina, *N,N*-dimetil-*L*-valil-*L*-valil-*N*-metil-*L*-valil-*L*-proli-1-*L*-prolina-*t*-butilamida, caquectina, cemadotina, clorambucilo, ciclofosfamida, 3',4'-dideshidro-4'-desoxi-8'-norvin-calcucoblastina, docetaxol, docetaxel, ciclofosfamida, carboplatino, carmustina, cisplatino, criptoficina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, daunorrubicina, decitabina, dolastatina, doxorubicina (adriamicina), etopósido, 5-fluorouracilo, finasterida, flutamida, hidroxurea e hidroxureataxanos, ifosfamida, liarozol, lonidamina, lomustina (CCNU), MDV3100, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), melfalán, isetionato de mivobulina, rizoxina, sertenef, estreptozocina, mitomicina, metotrexato, taxanos, nilutamida, onapristona, paclitaxel, prednimustina, procarbazona, RPR109881, fosfato de estramustina, tamoxifeno, tasonermina, taxol, tretinoína, vinblastina, vincristina, sulfato de vindesina y vinflunina.

Estirpes celulares inmunomoduladoras

Por "célula tumoral inactivada" se entiende una célula tumoral (bien "autóloga" o "allogénica" para el paciente) que ha sido tratada para evitar la división celular. Para los fines de la presente invención, dichas células preservan su inmunogenicidad y su actividad metabólica. Dichas células tumorales se modifican genéticamente para expresar un transgén que se expresa dentro de un paciente como parte de la terapia contra el cáncer. Así pues, una composición o vacuna de la invención comprende células neoplásicas (por ejemplo, tumorales) que son autólogas o allogénicas para el paciente sometido a tratamiento, tratándose, lo más preferentemente, del mismo tipo general de célula tumoral que afecta al paciente. Por ejemplo, a un paciente que padece melanoma se le administrará normalmente una célula modificada genéticamente derivada de un melanoma. Los métodos de inactivación de células tumorales para su uso en la presente invención, tal como el uso de irradiación, son bien conocidos en la técnica.

Las células tumorales inactivadas de la presente invención se administran al paciente junto con una o más moléculas o agentes coestimuladores. Un agente coestimulador preferido comprende una o más citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas. Los métodos de evaluación de dichos agentes coestimuladores son bien conocidos en la bibliografía. La inducción y maduración de DC normalmente se evalúa mediante el aumento de la expresión de ciertas moléculas de membrana tales como CD80 y CD86, y/o la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-12 y los interferones de tipo I tras la estimulación.

En realizaciones preferidas, las células tumorales inactivadas se modifican para expresar y secretar una o más citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de las células dendríticas. La presente invención se describe en términos ilustrativos con respecto al uso de GM-CSF. Así pues, a modo de ejemplo, la célula tumoral puede expresar un transgén que codifica GM-CSF como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 5.637.483, 5.904.920, 6.277.368 y 6.350.445, así como en la publicación de patente de EE.UU. n.º 20100150946. En las patentes de EE. UU. n.º 6.033.674 y 5.985.290, se describe una forma de células cancerosas modificadas genéticamente que expresan GM-CSF o una "vacuna celular que expresa citocinas" para el tratamiento del cáncer de páncreas.

Otras citocinas adecuadas que pueden ser expresadas por dichas células tumorales inactivadas y/o células testigo en lugar de, o junto con, GM-CSF incluyen, pero sin limitación, uno o más de entre ligando CD40, IL-12, CCL3, CCL20 y CCL21. Esta lista no pretende ser limitante.

Si bien se prefiere que las células tumorales inactivadas administradas al sujeto expresen una o más citocinas de interés, la estirpe celular tumoral puede estar acompañada por una estirpe celular testigo inactivada que exprese y secrete una o más citocinas que estimulen la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas. La estirpe celular testigo puede proporcionar todas las citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas, o puede complementar las citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas expresadas y secretadas por las células tumorales inactivadas. A modo de ejemplo, Las estirpes celulares testigo que expresan citocinas inmunomoduladoras se describen en las patentes de EE.UU. n.º 6.464.973 y 8.012.469, Dessureault *et al.*, *Ann. Surg. Oncol.* 14: 869-84, 2007, y Eager y Nemunaitis, *Mol. Ther.* 12: 18-27, 2005.

Por "polipéptido de factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)" se entiende una citocina o un fragmento de la misma que tiene actividad inmunomoduladora y que tiene al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el n.º de registro del GenBank AAA52122.1.

Vacunas

- 5 En ciertas realizaciones, las composiciones de CDN se administran junto con una o más vacunas destinadas a estimular una respuesta inmunitaria hacia uno o más antígenos predeterminados. En la siguiente tabla se enumeran ejemplos de antígenos diana que pueden encontrar uso en la invención. El antígeno diana también puede ser un fragmento o un polipéptido de fusión que comprenda una parte inmunológicamente activa de los antígenos enumerados en la tabla. Esta lista no pretende ser limitante.

10

Tabla 1. Antígenos.

Antígeno	Referencia
Antígenos tumorales	
Mesotelina	N.º de registro del GenBank NM_005823; U40434; NM_013404; BC003512 (véase también, por ejemplo, Hassan, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:3937-3942; Muminova, <i>et al.</i> (2004) <i>BMC Cancer</i> 4:19; Iacobuzio-Donahue, <i>et al.</i> (2003) <i>Cancer Res.</i> 63:8614-8622).
Proteína asociada al tumor 1 de Wilms(Wt-1), incluyendo la isoforma A; isoforma B; isoforma C; isoforma D.	Isoforma A de WT-1 (N.º de registro del GenBank NM_000378; NP_000369). Isoforma B de WT-1 (N.º de registro del GenBank NM_024424; NP_077742). Isoforma C de WT-1 (N.º de registro del GenBank NM_024425; NP_077743). Isoforma D de WT-1 (N.º de registro del GenBank NM_024426; NP_077744).
Enzima quimiotróptica del estrato córneo (SCCE) y sus variantes.	N.º de registro del GenBank NM_005046; NM_139277; AF332583. Véase también, por ejemplo, Bondurant, <i>et al.</i> (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:3446-3454; Santin, <i>et al.</i> (2004) <i>Gynecol. Oncol.</i> 94:283-288; Shigemasa, <i>et al.</i> (2001) <i>Int. J. Gynecol. Cancer</i> 11:454-461; Sepehr, <i>et al.</i> (2001) <i>Oncogene</i> 20:7368-7374.
Proteína A relacionada con la cadena de MHC de clase I (MICA); proteína A relacionada con la cadena de MHC de clase I (MICB).	Véase, por ejemplo, Groh, <i>et al.</i> (2005) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.</i> 102: 6461-6466; N.º de registro del GenBank NM_000247; BC_016929; AY750850; NM_005931.
Gastrina y péptidos derivados de gastrina; receptor de gastrina/CCK-2 (también conocido como CCK-B).	Harris, <i>et al.</i> (2004) <i>Cancer Res.</i> 64:5624-5631; Gilliam, <i>et al.</i> (2004) <i>Eur. J. Surg. Oncol.</i> 30:536-543; Laheru y Jaffee (2005) <i>Nature Reviews Cancer</i> 5:459-467.
Glipicano 3 (un antígeno de, por ejemplo, el carcinoma hepatocelular y el melanoma).	N.º de registro del GenBank NM_004484. Nakatsura, <i>et al.</i> (2003) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 306:16-25; Capurro, <i>et al.</i> (2003) <i>Gastroenterol.</i> 125:89-97; Nakatsura, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:6612-6621).
Proteína de tipo Coactosina.	Nakatsura, <i>et al.</i> (2002) <i>Eur. J. Immunol.</i> 32:826-836; Laheru y Jaffee (2005) <i>Nature Reviews Cancer</i> 5:459-467.
Antígeno de células madre prostáticas (PSCA).	N.º de registro del GenBank AF043498; AR026974; AR302232 (véase también, por ejemplo, Argani, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Res.</i> 61:4320-4324; Christiansen, <i>et al.</i> (2003) <i>Prostate</i> 55:9-19; Fuessel, <i>et al.</i> (2003) 23:221-228).
Fosfatasa ácida prostática (PAP); antígeno específico de la próstata (PSA); PSM; PSMA.	Small, <i>et al.</i> (2000) <i>J. Clin. Oncol.</i> 18:3894-3903; Altwein y Luboldt (1999) <i>Urol. Int.</i> 63:62-71; Chan, <i>et al.</i> (1999) <i>Prostate</i> 41:99-109; Ito, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer</i> 103:242-250; Schmittgen, <i>et al.</i> (2003) <i>Int. J. Cancer</i> 107:323-329; Millon, <i>et al.</i> (1999) <i>Eur. Urol.</i> 36:278-285.
Antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata (STEAP).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442; N.º de registro del GenBank NM_018234; NM_001008410; NM_182915; NM_024636; NM_012449; BC011802.
Antígeno 1 de tumor de carcinoma de la próstata (PCTA-1).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442; N.º de registro del GenBank L78132.
Gen 1 inductor de tumores de la próstata (PTI-1).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442).
Gen específico de la próstata con homología con el receptor acoplado a la proteína G.	Véase, por ejemplo, Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442).

(continuación)

Antígeno	Referencia
Prostasa (una serina proteasa regulada por antrógenos).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442; N.º de registro del GenBank BC096178; BC096176; BC096175.
Proteinasa 3.	N.º de registro del GenBank X55668.
Antígenos de cáncer de testículo, por ejemplo, NY-ESO-1; SCP-1; SSX-1; SSX-2; SSX-4; GAGE, CT7; CT8; CT10; MAGE-1; MAGE-2; MAGE-3; MAGE-4; MAGE-6; LAGE-1.	N.º de registro del GenBank NM_001327 (NY-ESO-1) (véase también, por ejemplo, Li, <i>et al.</i> (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:1809-1814; Chen, <i>et al.</i> (2004) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.</i> 101(25):9363-9368; Kubuschok, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Cancer.</i> 109:568-575; Scanlan, <i>et al.</i> (2004) <i>Cancer Immun.</i> 4:1; Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047; Scanlan, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164; Dalerba, <i>et al.</i> (2001) <i>Int. J. Cancer</i> 93:85-90; Ries, <i>et al.</i> (2005) <i>Int. J. Oncol.</i> 26:817-824.
MAGE-A1; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-A10; MAGE-A12; GAGE-3/6; NT-SAR-35; BAGE; CA125.	Otte, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Res.</i> 61:6682-6687; Lee, <i>et al.</i> (2003) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.</i> 100:2651-2656; Sarcevic, <i>et al.</i> (2003) <i>Oncology</i> 64:443-449; Lin, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10: 5708-5716.
GAGE-1; GAGE-2; GAGE-3; GAGE-4; GAGE-5; GAGE-6; GAGE-7; GAGE-8; GAGE-65; GAGE-11; GAGE-13; GAGE-7B.	De Backer, <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:3157-3165; Scarcella, <i>et al.</i> (1999) <i>Clin. Cancer Res.</i> 5:335-341.
HIP1R; LMNA; KIAA1416; Seb4D; KNSL6; TRIP4; MBD2; HCAC5; MAGEA3.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047.
Familia de genes DAM, por ejemplo, DAM-1; DAM-6.	Fleishhauer, <i>et al.</i> (1998) <i>Cancer Res.</i> 58:2969-2972.
RCAS1.	Enjoji, <i>et al.</i> (2004) <i>Dig. Dis. Sci.</i> 49:1654-1656.
RU2.	Van Den Eynde, <i>et al.</i> (1999) <i>J. Exp. Med.</i> 190:1793-1800.
CAMEL.	Slager, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Immunol.</i> 172:5095-5102; Slager, <i>et al.</i> (2004) <i>Cancer Gene Ther.</i> 11:227-236.
Antígenos asociados al cáncer de colon, por ejemplo, NY-CO-8; NY-CO-9; NY-CO-13; NY-CO-16; NY-CO-20; NY-CO-38; NY-CO-45; NY -CO-9/HDAC5; NY-CO-41/MBD2; NY-CO-42/TRIP4; NY-CO-95/KIAA1416; KNSL6; seb4D.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047.
N-Acetilglucosaminil-transferasa V (GnT-V).	Dosaka-Akita, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:1773-1779.
Factor de alargamiento 2 mutado (ELF2M).	Renkvist, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 50:3-15.
HOM-MEL-40/SSX2	Neumann, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 112:661-668; Scanlan, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164.
BRDT.	Scanlan, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164.
SAGE; HAGE.	Sasaki, <i>et al.</i> (2003) <i>Eur. J. Surg. Oncol.</i> 29:900-903.
RAGE.	Véase, por ejemplo, Li, <i>et al.</i> (2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 164:1389-1397; Shirasawa, <i>et al.</i> (2004) <i>Genes to Cells</i> 9:165-174.
MUM-1 (melanoma mutado ubicuo); MUM-2; Mutación de Arg-Gly MUM-2; MUM-3.	Gueguen, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Immunol.</i> 160:6188-6194; Hirose, <i>et al.</i> (2005) <i>Int. J. Hematol.</i> 81:48-57; Baurain, <i>et al.</i> (2000) <i>J. Immunol.</i> 164:6057-6066; Chiari, <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:5785-5792.
Antígeno de proteína de fusión LDLR/FUT de melanoma.	Wang, <i>et al.</i> (1999) <i>J. Exp. Med.</i> 189:1659-1667.
Serie NY-REN de antígenos de cáncer renal.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047; Scanlan, <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:456-464.
Serie NY-BR de antígenos de cáncer de mama, por ejemplo, NY-BR-62; NY-BR-75; NY-BR-85; NY-BR-62; NY-BR-85.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047; Scanlan, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Immunity</i> 1:4.
BRCA-1; BRCA-2.	Stolier, <i>et al.</i> (2004) <i>Breast J.</i> 10:475-480; Nicoletto, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Treat Rev.</i> 27:295-304.
Proteína de fusión DEK/CAN.	Von Lindern, <i>et al.</i> (1992) <i>Mol. Cell. Biol.</i> 12:1687-1697.

(continuación)

Antígeno	Referencia
Ras, por ejemplo, ras de tipo silvestre, ras con mutaciones en el codón 12, 13, 59 o 61, por ejemplo, mutaciones G12C; G12D; G12R; G12S; G12V; G13D; A59T; Q61H. K-RAS; H-RAS; N-RAS.	N.º de registro del GenBank P01112; P01116; M54969; M54968; P01111; P01112; K00654. Véase también, por ejemplo, N.º de registro del GenBank M26261; M34904; K01519; K01520; BC006499; NM_006270; NM_002890; NM_004985; NM_033360; NM_176795; NM_005343.
BRAF (una isoforma de RAF).	Tannapfel, <i>et al.</i> (2005) <i>Am. J. Clin. Pathol.</i> 123:256-2601; Tsao y Sober (2005) <i>Dermatol. Clin.</i> 23:323-333.
Antígenos de melanoma, incluyendo los antígenos de células de melanoma HST-2.	N.º de registro del GenBank NM_206956; NM_206955; NM_206954; NM_206953; NM_006115; NM_005367; NM_004988; AY148486; U10340; U10339; M77481. Véase, por ejemplo, Suzuki, <i>et al.</i> (1999) <i>J. Immunol.</i> 163:2783-2791.
Survivina	N.º de registro del GenBank AB028869; U75285 (véase también, por ejemplo, Tsuruma, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Translational Med.</i> 2:19 (11 páginas); Pisarev, <i>et al.</i> (2003) <i>Clin. Cancer Res.</i> 9:6523-6533; Siegel, <i>et al.</i> (2003) <i>Br. J. Haematol.</i> 122:911-914; Andersen, <i>et al.</i> (2002) <i>Histol. Histopathol.</i> 17: 669-675).
MDM-2	NM 002392; NM 006878 (véase también, por ejemplo, Mayo, <i>et al.</i> (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:5013-5016; Demidenko y Blagosklonny (2004) <i>Cancer Res.</i> 64:3653-3660).
Proteínas de unión a metil-CpG (MeCP2; MBD2).	Muller, <i>et al.</i> (2003) <i>Br. J. Cancer</i> 89:1934-1939; Fang, <i>et al.</i> (2004) <i>World J. Gastroenterol.</i> 10:3394-3398.
NA88-A.	Moreau-Aubry, <i>et al.</i> (2000) <i>J. Exp. Med.</i> 191:1617-1624.
Histona desacetilasas (HDAC), por ejemplo, HDAC5.	Waltregny, <i>et al.</i> (2004) <i>Eur. J. Histochem.</i> 48:273-290; Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047.
Ciclofilina B (Cyp-B).	Tamura, <i>et al.</i> (2001) <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 92:762-767.
CA 15-3; CA 27.29.	Clinton, <i>et al.</i> (2003) <i>Biomed. Sci. Instrum.</i> 39:408-414.
Proteína de choque térmico Hsp70.	Faure, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 108:863-870.
Familia GAGE/PAGE, por ejemplo, PAGE-1; PAGE-2; PAGE-3; PAGE-4; XAGE-1; XAGE-2; XAGE-3.	Brinkmann, <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:1445-1448.
Familias de MAGE A, B, C y D. MAGE-B5; MAGE-B6; MAGE-C2; MAGE-C3; MAGE-3; MAGE-6.	Lucas, <i>et al.</i> (2000) <i>Int. J. Cancer</i> 87:55-60; Scanlan, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Immun.</i> 1:4.
Kinesina 2; Factor modulador del elemento TATA 1; proteína tumoral D53; NY	Scanlan, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Immun.</i> 30:1-4.
Alfa-fetoproteína (AFP)	Grimm, <i>et al.</i> (2000) <i>Gastroenterol.</i> 119:1104-1112.
SART1; SART2; SART3; ART4.	Kumamuru, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 108:686-695; Sasatomi, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer</i> 94:1636-1641; Matsumoto, <i>et al.</i> (1998) <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 89:1292-1295; Tanaka, <i>et al.</i> (2000) <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 91:1177-1184.
Antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME).	Matsushita, <i>et al.</i> (2003) <i>Leuk. Lymphoma</i> 44:439-444; Oberthuer, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:4307-4313.
Antígeno carcinoembrionario (CEA), Péptido agonista potenciador de CAP1-6D.	N.º de registro del GenBank M29540; E03352; X98311; M17303 (véase también, por ejemplo, Zaremba (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:4570-4577; Sarobe, <i>et al.</i> (2004) <i>Curr. Cancer Drug Targets</i> 4:443-454; Tsang, <i>et al.</i> (1997) <i>Clin. Cancer Res.</i> 3:2439-2449; Fong, <i>et al.</i> (2001) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.</i> 98:8809-8814).
HER-2/neu.	Disis, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Clin. Immunol.</i> 24:571-578; Disis y Cheever (1997) <i>Adv. Cancer Res.</i> 71:343-371.
Cdk4; cdk6; p16 (INK4); Proteína Rb.	Ghazizadeh, <i>et al.</i> (2005) <i>Respiration</i> 72:68-73; Ericson, <i>et al.</i> (2003) <i>Mol. Cancer Res.</i> 1:654-664.
TEL; AML1; TEL/AML1.	Stams, <i>et al.</i> (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:2974-2980.
Telomerasa (TERT).	Nair, <i>et al.</i> (2000) <i>Nat. Med.</i> 6:1011-1017.
707-AP.	Takahashi, <i>et al.</i> (1997) <i>Clin. Cancer Res.</i> 3:1363-1370.
Anexina, por ejemplo, Anexina II.	Zimmerman, <i>et al.</i> (2004) <i>Virchows Arch.</i> 445:368-374.

(continuación)

Antígeno	Referencia
BCR/ABL; BCR/ABL p210; BCR/ABL p190; CML-66; CML-28.	Cobaldd, <i>et al.</i> (2000) <i>Blood</i> 95:1007-1013; Hakansson, <i>et al.</i> (2004) <i>Leukemia</i> 18:538-547; Schwartz, <i>et al.</i> (2003) <i>Semin. Hematol.</i> 40:87-96; Lim, <i>et al.</i> (1999) <i>Int. J. Mol. Med.</i> 4:665-667.
BCL2; BLC6; proteína CD10.	Iqbal, <i>et al.</i> (2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 165:159-166.
CDC27 (se trata de un antígeno de melanoma).	Wang, <i>et al.</i> (1999) <i>Science</i> 284:1351-1354.
Proteína de esperma 17 (SP17); 14-3-3-zeta; MEMD; KIAA0471; TC21.	Arora, <i>et al.</i> (2005) <i>Mol. Carcinog.</i> 42:97-108.
Proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa (TRP-1 y TRP-2).	N.º de registro del GenBank NM_001922. (Véase también, por ejemplo, Bronte, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Res.</i> 60:253-258).
Gp100/pmel-17.	N.º de registro del GenBank AH003567 ; U31798 ; U31799 ; U31807 ; U31799 (véase también, por ejemplo, Bronte, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Res.</i> 60:253-258).
TARP.	Véase, por ejemplo, Clifton, <i>et al.</i> (2004) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.</i> 101: 10166-10171; Virok, <i>et al.</i> (2005) <i>Infection Immunity</i> 73:1939-1946.
Proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa (TRP-1 y TRP-2).	N.º de registro del GenBank NM_001922. (véase también, por ejemplo, Bronte, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Res.</i> 60:253-258).
Receptor de melanocortina 1 (MC1R); MAGE-3; gp100; tirosinasa; dopacromo tautomerasa (TRP-2); MART-1.	Salazar-Onfray, <i>et al.</i> (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:4348-4355; Reynolds, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Immunol.</i> 161:6970-6976; Chang, <i>et al.</i> (2002) <i>Clin. Cancer Res.</i> 8:1021-1032.
MUC-1; MUC-2.	Véase, por ejemplo, Davies, <i>et al.</i> (1994) <i>Cancer Lett.</i> 82:179-184; Gambus, <i>et al.</i> (1995) <i>Int. J. Cancer</i> 60:146-148; McCool, <i>et al.</i> (1999) <i>Biochem. J.</i> 341:593-600.
Spas-1.	Solicitud de patente publicada de EE.UU. n.º. 20020150588 de Allison, <i>et al.</i>
CASP-8; FLICE; MACH.	Mandruzzato, <i>et al.</i> (1997) <i>J. Exp. Med.</i> 186:785-793.
CEACAM6; CAP-1.	Duxbury, <i>et al.</i> (2004) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 317: 837-843; Morse, <i>et al.</i> (1999) <i>Clin. Cancer Res.</i> 5:1331-1338.
HMGB1 (una proteína de unión a ADN y citocina).	Brezniceanu, <i>et al.</i> (2003) <i>FASEB J.</i> 17:1295-1297.
ETV6/AML1.	Codrington, <i>et al.</i> (2000) <i>Br. J. Haematol.</i> 111:1071-1079.
Formas mutantes y de tipo silvestre de poliposis adenomatosa coli (APC); beta-catenina; c-met;	Clements, <i>et al.</i> (2003) <i>Clin. Colorectal Cancer</i> 3:113-120; Gulmann, <i>et al.</i> (2003) <i>Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.</i> 11:230-237; Jungck, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Colorectal. Dis.</i> 19:438-445; Wang, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Surg. Res.</i> 120:242-248; Abutaily, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Pathol.</i>
p53; E-cadherina; ciclooxigenasa-2 (COX-2).	201:355-362; Liang, <i>et al.</i> (2004) <i>Br. J. Surg.</i> 91:355-361; Shirakawa, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:4342-4348.
Antígeno de carcinoma de células renales unido por mAB G250.	Mulders, <i>et al.</i> (2003) <i>Urol. Clin. North Am.</i> 30:455-465; Steffens, <i>et al.</i> (1999) <i>Anticancer Res.</i> 19:1197-1200.
EphA2	Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º 2005/0281783 A1; N.º de registro del GenBank NM_004431 (ser humano); N.º de registro del GenBank NM_010139 (ratón); N.º de registro del GenBank AB038986 (Pollo, secuencia parcial); N.º de registro del GenBank NP_004422, AAH37166 y AAA53375 (ser humano); N.º de registro del GenBank NP_034269 (ratón), AAH06954 (ratón), XP_345597 (rata) y BAB63910 (pollo).
EGFRvIII	Véase, por ejemplo, documento WO/2012/068360
Antígenos de <i>Francisella tularensis</i>	

(continuación)

Antígeno	Referencia
<i>Francisella tularensis</i> A y B.	Genoma completo de la subespecie Schu S4 (N.º de registro del GenBank AJ749949); de la subespecie Schu 4 (N.º de registro del GenBank NC_006570). Proteína de la membrana exterior (43 kDa) Bevanger, <i>et al.</i> (1988) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 27:922-926; Porsch-Ozcurumez, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Diagnostic. Lab. Immunol.</i> 11:1008-1015). Los componentes antigénicos de <i>F. tularensis</i> incluyen, por ejemplo, 80 antígenos, incluyendo las chaperoninas de 10 kDa y 60 kDa (Havlasova, <i>et al.</i> (2002) <i>Proteomics</i> 2:857-86), nucleósido difosfato quinasa, isocitrato deshidrogenasa, proteína de unión a ARN Hfq, la chaperona ClpB (Havlasova, <i>et al.</i> (2005) <i>Proteomics</i> 5:2090-2103). Véase, también, por ejemplo, Oystony Quarry (2005) <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> 87:277-281; Isherwood, <i>et al.</i> (2005) <i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i> 57:1403-1414; Biagini, <i>et al.</i> (2005) <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 382:1027-1034.
Antígenos de la malaria	
Proteína de circunporozoito (CSP); SSP2; HEP17; ortólogos de Exp-1 encontrados en <i>P. falciparum</i> ; y LSA-1.	Véase, por ejemplo, Haddad, <i>et al.</i> (2004) <i>Infection Immunity</i> 72:1594-1602; Hoffman, <i>et al.</i> (1997) <i>Vaccine</i> 15:842-845; Oliveira-Ferreira y Daniel-Ribeiro (2001) <i>Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro</i> 96: 221-227. CSP (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AB121024). SSP2 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AF249739). LSA-1 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank Z30319).
Proteína de supervivencia de eritrocitos infectada con anillo (RESA); proteína de superficie de merozoito 2 (MSP2); Spf66; proteína de superficie de merozoito 1 (MSP1); 195A; BVp42.	Véase, por ejemplo, Stirnadel, <i>et al.</i> (2000) <i>Int. J. Epidemiol.</i> 29:579-586; Krzych, <i>et al.</i> (1995) <i>J. Immunol.</i> 155:4072-4077. Véase, también, Good, <i>et al.</i> (2004) <i>Immunol. Rev.</i> 201:254-267; Good, <i>et al.</i> (2004) <i>Ann. Rev. Immunol.</i> 23:69-99. MSP2 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank X96399; X96397). MSP1 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank X03371). RESA (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank X05181; X05182).
Antígeno de membrana apical 1 (AMA1).	Véase, por ejemplo, Gupta, <i>et al.</i> (2005) <i>Protein Expr. Purif.</i> 41:186-198. AMA1 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank A'13; AJ494905; AJ490565).
Virus y antígenos víricos	
Hepatitis A	N.º de registro del GenBank, por ejemplo, NC_001489; AY644670; X83302; K02990; M14707.
Hepatitis B	Genoma completo (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AB214516; NC_003977; AB205192; AB205191; AB205190; AJ748098; AB198079; AB198078; AB198076; AB074756).
Hepatitis C	Genoma completo (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_004102; AJ238800; AJ238799; AJ132997; AJ132996; AJ000009; D84263).
Hepatitis D	N.º de registro del GenBank, por ejemplo, NC_001653; AB118847; AY261457.
virus del papiloma humano, incluyendo los más de 200 subtipos (clasificados en 16 grupos), tales como los subtipos de alto riesgo 16, 18, 30, 31, 33, 45.	Véase, por ejemplo, Trimble, <i>et al.</i> (2003) <i>Vaccine</i> 21:4036-4042; Kim, <i>et al.</i> (2004) <i>Gene Ther.</i> 11:1011-1018; Simon, <i>et al.</i> (2003) <i>Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.</i> 109:219-223; Jung, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Microbiol.</i> 42:255-266; Damasus-Awatai y Freeman-Wang (2003) <i>Curr. Opin. Obstet. Gynecol.</i> 15:473-477; Jansen y Shaw (2004) <i>Annu. Rev. Med.</i> 55:319-331; Roden y Wu (2003) <i>Expert Rev. Vaccines</i> 2:495-516; de Villiers, <i>et al.</i> (2004) <i>Virology</i> 324:17-24; Hussain y Paterson (2005) <i>Cancer Immunol. Immunother.</i> 54:577-586; Molijn, <i>et al.</i> (2005) <i>J. Clin. Virol.</i> 32 (Supl. 1) S43-S51. N.º de registro del GenBank AY686584; AY686583; AY686582; NC_006169; NC_006168; NC_006164; NC_001355; NC_001349; NC_005351; NC_001596).

(continuación)

Antígeno	Referencia
Virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV) tipos I y II, incluyendo los subtipos del HTLV de tipo I cosmopolita, África central y austro-melanesia, y los subtipos de HTLV de tipo II Iia, lib, lic y lid.	Véase, por ejemplo, Capdepon, <i>et al.</i> (2005) <i>AIDS Res. Hum. Retrovirus</i> 21: 28-42; Bhigjee, <i>et al.</i> (1999) <i>AIDS Res. Hum. Retrovirus</i> 15: 1229-1233; Vandamme, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Virol.</i> 72:4327-4340; Vallejo, <i>et al.</i> (1996) <i>J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.</i> 13: 384-391. HTLV de tipo I (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY563954; AY563953. HTLV de tipo II (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank L03561; Y13051; AF139382).
<i>Coronaviridae</i> , incluyendo coronavirus, tales como el SARS-coronavirus (SARS-CoV) y Torovirus.	Véase, por ejemplo, Brian y Baric (2005) <i>Curr. Top. Microbiol. Immunol.</i> 287: 1-30; Gonzalez, <i>et al.</i> (2003) <i>Arch. Virol.</i> 148:2207-2235; Smits, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Virol.</i> 77:9567-9577; Jamieson, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Infect. Dis.</i> 178:1263-1269 (n.º de registro del GenBank AY348314; NC_004718; AY394850).
Virus de la rubeola.	N.º de registro del GenBank NC_001545; AF435866.
virus de las paperas, incluyendo los genotipos A, C, D, G, H e I.	Véase, por ejemplo, Orvell, <i>et al.</i> , (2002) <i>J. Gen. Virol.</i> 83:2489-2496. Véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY681495; NC_002200; AY685921; AF201473.
El virus de Coxsackie A, incluyendo los serotipos 1, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 24 (también conocido como enterovirus humano C; HEV-C).	Véase, por ejemplo, Brown, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Virol.</i> 77:8973-8984. N.º de registro del GenBank AY421768; AY790926: X67706.
Virus de Coxsackie B, incluyendo los subtipos 1-6.	Véase, por ejemplo, Ahn <i>et al.</i> (2005) <i>J. Med. Virol.</i> 75:290-294; Patel <i>et al.</i> (2004) <i>J. Virol. Methods</i> 120:167-172; Rezig, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Med. Virol.</i> 72:268-274. N.º de registro del GenBank X05690.
Enterovirus humanos que incluyen, por ejemplo, enterovirus humano A (HEV-A, CAV2 a CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16 y EV71) y que también incluyen HEV-B (CAV9, CBV1 a CBV6, E1 a E7, E9, E11 a E21, E24 a E27, E29 a E33, y EV69 y E73), así como HEV.	Véase, por ejemplo, Oberste, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Virol.</i> 78:855-867. Enterovirus humano A (n.º de registro del GenBank NC_001612); enterovirus humano B (NC_001472); enterovirus humano C (NC_001428); enterovirus humano D (NC_001430). Enterovirus de simio A (N.º de registro del GenBank NC_003988).
Poliovirus incluyendo PV1, PV2 y PV3.	Véase, por ejemplo, He, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Virol.</i> 77:4827-4835; Hahsido, <i>et al.</i> (1999) <i>Microbiol. Immunol.</i> 43:73-77. N.º de registro del GenBank AJ132961 (tipo 1); AY278550 (tipo 2); X04468 (tipo 3).
Virus de las encefalitis víricas, incluyendo la encefalitis equina, encefalitis equina venezolana (EEV) (incluyendo los subtipos IA, Ib, IC, ID, IIIC, IIID), encefalitis equina oriental (EEE), encefalitis equina occidental (WEE), encefalitis de San Luis, encefalitis de Murray Valley (australiana), encefalitis japonesa y encefalitis transmitida por garrapatas.	Véase, por ejemplo, Hoke (2005) <i>Mil. Med.</i> 170:92-105; Estrada-Franco, <i>et al.</i> (2004) <i>Emerg. Infect. Dis.</i> 10:2113-2121; Das, <i>et al.</i> (2004) <i>Antiviral Res.</i> 64:85-92; Aguilar, <i>et al.</i> (2004) <i>Emerg. Infect. Dis.</i> 10:880-888; Weaver, <i>et al.</i> (2004) <i>Arch. Virol. Supl.</i> 18:43-64; Weaver, <i>et al.</i> (2004) <i>Annu. Rev. Entomol.</i> 49:141-174. Encefalitis equina oriental (N.º de registro del GenBank NC_003899; AY722102); encefalitis equina occidental (NC_003908).
Virus del herpes humano, incluyendo citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus del herpes humano-1 (VHH-1), VHH-2, VHH-3, VHH-4, VHH-5, VHH-6, VHH-7, VHH-8, virus del herpes B, virus del herpes simple de tipo 1 y 2 (HSV-1, HSV-2) y el virus de la varicela zóster (VZV).	Véase, por ejemplo, Studahl, <i>et al.</i> (2000) <i>Scand. J. Infect. Dis.</i> 32:237-248; Padilla, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Med. Virol.</i> 70 (Supl. 1) S103-S110; Jaikittivong y Langlais (1998) <i>Oral Surg. Oral Med.</i> 85:399-403. n.º de registro del GenBank NC_001806 (virus del herpes 1); NC_001798 (virus del herpes 2); X04370 and NC_001348 (virus del herpes 3); NC_001345 (virus del herpes 4); NC_001347 (virus del herpes 5); X83413 y NC_000898 (virus del herpes 6); NC_001716 (virus del herpes 7). Los virus del herpes humanos de tipos 6 y 7 (VHH-6; VHH-7) son desvelados por, por ejemplo, Padilla, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Med. Virol.</i> 70 (Supl. 1) S103-S110. El virus del herpes humano 8 (VHH-8), incluyendo los subtipos A-E, se divulga en, por ejemplo, Treurnicht, <i>et al.</i> (2002) <i>J. Med. Virol.</i> 66:235-240.

(continuación)

Antígeno	Referencia
El VIH-1, incluyendo el grupo M (incluyendo los subtipos A a J) y el grupo O (incluyendo los subtipos distinguibles) (VIH-2, incluyendo los subtipos A-E.	Véase, por ejemplo, Smith, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Med. Virol.</i> 56:264-268. Véase, también, por ejemplo, N.º de registro del GenBank DQ054367; NC_001802; AY968312; DQ011180; DQ011179; DQ011178; DQ011177; AY588971; AY588970; AY781127; AY781126; AY970950; AY970949; AY970948; X61240; AJ006287; AJ508597; y AJ508596.
virus de Epstein Barr (VEB), incluyendo los subtipos A y B.	Véase, por ejemplo, Peh, <i>et al.</i> (2002) <i>Pathology</i> 34:446-450. Virus de Epstein-Barr, cepa B95-8 (N.º de registro del GenBank V01555).
Reovirus, Incluyendo los serotipos y cepas 1, 2 y 3, tipo 1 Lang, tipo 2 Jones y tipo 3 Dearing.	Véase, por ejemplo, Barthold, <i>et al.</i> (1993) <i>Lab. Anim. Sci.</i> 43:425-430; Roner, <i>et al.</i> (1995) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.</i> 92:12362-12366; Kedl, <i>et al.</i> (1995) <i>J. Virol.</i> 69:552-559. N.º de registro del GenBank K02739 (proteína de superficie del gen sigma-3).
Los subtipos de citomegalovirus (CMV) incluyen los subtipos de I-VII del CMV.	Véase, por ejemplo, Chern, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Infect. Dis.</i> 178:1149-1153; Vilas Boas, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Med. Virol.</i> 71:404-407; Trincado, <i>et al.</i> (2000) <i>J. Med. Virol.</i> 61:481-487. N.º de registro del GenBank X17403.
Rinovirus, incluyendo todos los serotipos.	Rinovirus humano 2 (N.º de registro del GenBank X02316); Rinovirus humano B (N.º de registro del GenBank NC_001490); Rinovirus humano 89 (N.º de registro del GenBank NC_001617); Rinovirus humano 39 (N.º de registro del GenBank AY751783).
Adenovirus, incluyendo todos los serotipos.	AY803294; NC_004001; AC_000019; AC_000018; AC_000017; AC_000015; AC_000008; AC_000007; AC_000006; AC_000005; AY737798; AY737797; NC_003266; NC_002067; AY594256; AY594254; AY875648; AJ854486; AY163756; AY594255; AY594253; NC_001460; NC_001405; AY598970; AY458656; AY487947; NC_001454; AF534906; AY45969; AY128640; L19443; AY339865; AF532578.
Filovirus, incluyendo el virus de Marburg y el virus del Ébola, y cepas tales como el Ébola-Sudán (EBO-S), Ebola-Zaire (EBO-Z) y Ebola-Reston (EBO-R).	Véase, por ejemplo, Geisbert y Jahrling (1995) <i>Virus Res.</i> 39:129-150; Hutchinson, <i>et al.</i> (2001) <i>J. Med. Virol.</i> 65:561-566. Virus de Marburg (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_001608). Virus del Ébola (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_006432; AY769362; NC_002549; AF272001; AF086833).
Arenavirus, incluyendo el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), virus de Lassa, virus de Junin y virus de Machupo.	Virus de Junin, segmento S (N.º de registro del GenBank NC_005081); Virus de Junin, segmento L (N.º de registro del GenBank NC_005080).
Virus de la rabia.	Véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_001542; AY956319; AY705373; AF499686; AB128149; AB085828; AB009663.
Arbovirus, incluyendo el virus del Nilo Occidental, virus del dengue 1 a 4, virus de la fiebre transmitida por garrapatas de Colorado, virus Sindbis, <i>Togaviridae</i> , <i>Flaviviridae</i> , <i>Bunyaviridae</i> , <i>Reoviridae</i> , <i>Rhabdoviridae</i> , <i>Orthomyxoviridae</i> y similares.	Virus del dengue de tipo 1 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AB195673; AY762084). Virus del dengue de tipo 2 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_001474; AY702040; AY702039; AY702037). Virus del dengue de tipo 3 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY923865; AT858043). Virus del dengue de tipo 4 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY947539; AY947539; AF326573). Virus Sindbis (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_001547; AF429428; J02363; AF103728). Virus del Nilo Occidental (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_001563; AY603654).
Poxvirus incluyendo <i>Orthopoxvirus</i> (virus de la viruela, virus de la viruela del mono, virus vacuna, virus de la viruela de la vaca), yatapoxvirus (virus tanapox, virus del tumor de mono Yaba), parapoxvirus y moluscipoxvirus.	Virus de la viruela (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_001611; Y16780; X72086; X69198).
Fiebre amarilla.	Véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_002031; AY640589; X03700.

(continuación)

Antígeno	Referencia
Hantavirus, incluyendo los serotipos Hantaan (HTN), Seúl (SEO), Dobrava (DOB), Sin Nombre (SN), Puumala (PUU) y Saaremaa de tipo Dobrava (SAAV).	Véase, por ejemplo, Elgh, <i>et al.</i> (1997) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 35:1122-1130; Sjolander, <i>et al.</i> (2002) <i>Epidemiol. Infect.</i> 128:99-103; Zeier, <i>et al.</i> (2005) <i>Virus Genes</i> 30:157-180. N.º de registro del GenBank NC_005222 and NC_005219 (Hantavirus). Véase, también, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_005218; NC_005222; NC_005219.
<i>Flavivirus</i> , incluyendo el virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus del Nilo Occidental y virus de la fiebre amarilla.	Véase, por ejemplo, Mukhopadhyay, <i>et al.</i> (2005) <i>Nature Rev. Microbiol.</i> 3: 13-22. N.º de registro del GenBank NC_001474 y AY702040 (Dengue). N.º de registro del GenBank NC_001563 y AY603654.
Virus del sarampión.	Véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AB040874 y AY486084.
Virus paragripal humano (VPH), incluyendo los tipos de VPH 1-56.	Virus paragripal humano 2 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AB176531; NC003443). Virus paragripal humano 3 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_001796).
Virus de la gripe, incluyendo los virus de la gripe de tipo A, B y C.	Nucleocápside de la gripe (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY626145). Hemaglutinina de la gripe (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY627885; AY555153). Neuraminidasa de la gripe (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY555151; AY577316). Proteína de la matriz 2 de la gripe (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY626144 (proteína básica 1 de la gripe (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY627897). Proteína ácida de la polimerasa de la gripe (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY627896). Nucleoproteína de la gripe (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY627895).
Subtipos del virus de la gripe A, por ejemplo, virus porcinos (SIV): virus de la gripe A H1N1 y virus de la gripe porcina.	Hemaglutinina de H1N1 (N.º de registro del GenBank S67220). Proteína de la matriz del virus de la gripe A (N.º de registro del GenBank AY700216). Nucleoproteína del virus de la gripe A H5H1 (N.º de registro del GenBank AY646426). Hemaglutinina de H1N1 (N.º de registro del GenBank D00837). Véase, también, N.º de registro del GenBank BD006058; BD006055; BD006052. Véase, también, por ejemplo, Wentworth, <i>et al.</i> (1994) <i>J. Virol.</i> 68:2051-2058; Wells, <i>et al.</i> (1991) <i>J.A.M.A.</i> 265:478-481.
Virus sincitial respiratorio (VSR), incluyendo el subgrupo A y el subgrupo B.	Virus sincitial respiratorio (VSR) (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY353550; NC_001803; NC001781).
Rotavirus, incluyendo los rotavirus humanos A a E, rotavirus bovino, rotavirus del mono rhesus y reordenamiento de los RVV humanos.	Segmento 8 del rotavirus humano C (N.º de registro del GenBank AJ549087); Proteína de la cápside externa de la cepa del rotavirus humano G9 (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank DQ056300); Proteína no estructural 4 de la cepa B del rotavirus humano (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY548957); Proteína principal de la cápside interna del rotavirus humano A (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY601554).
Poliomavirus, incluyendo el virus de simio 40 (SV40), virus JC (JCV) y virus BK (BKV).	Véase, por ejemplo, Engels, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Infect. Dis.</i> 190:2065-2069; Vilchez y Butel (2004) <i>Clin. Microbiol. Rev.</i> 17:495-508; Shivapurkar, <i>et al.</i> (2004) <i>Cancer Res.</i> 64:3757-3760; Carbone, <i>et al.</i> (2003) <i>Oncogene</i> 2:5173-5180; Barbanti-Brodano, <i>et al.</i> (2004) <i>Virology</i> 318:1-9 (genoma completo del SV40 en, por ejemplo, N.º de registro del GenBank NC_001669; AF168994; AY271817; AY271816; AY120890; AF345344; AF332562).
Coltivirus, incluyendo el virus de la fiebre transmitida por garrapatas de Colorado, virus de Eyach.	Attoui, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Gen. Virol.</i> 79:2481-2489. Segmentos del virus de Eyach (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AF282475; AF282472; AF282473; AF282478; AF282476; NC_003707; NC_003702; NC_003703; NC_003704; NC_003705; NC_003696; NC_003697; NC_003698; NC_003699; NC_003701; NC_003706; NC_003700; AF282471; AF282477).
Calcivirus, incluyendo los genogrupos Norwalk, grupo Snow Mountain (SMA) y Saaporo.	Virus Snow Mountain (véase, por ejemplo, N.º de registro del GenBank AY134748).

(continuación)

Antígeno	Referencia
<i>Parvoviridae</i> , incluyendo dependovirus, parvovirus (incluyendo parvovirus B19) y eritrovirus.	Véase, por ejemplo, Brown (2004) <i>Dev. Biol.</i> (Basel) 118:71-77; Alvarez-Lafuente, <i>et al.</i> (2005) <i>Ann. Rheum. Dis.</i> 64:780-782; Ziyaeyan, <i>et al.</i> (2005) <i>Jpn. J. Infect. Dis.</i> 58:95-97; Kaufman, <i>et al.</i> (2005) <i>Virology</i> 332:189-198.

Otros organismos para los que se conocen antígenos adecuados en la técnica incluyen, pero sin limitación, *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus pyogenes* (Srep. del grupo A), *Streptococcus agalactia* (Strep. del grupo B), *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, especies de *Salmonella* (incluyendo *typhi*, *typhimurium*), *enterica* (incluyendo *Helicobacter pylori* *Shigella flexneri* y otras especies de *shigella* del grupo D), *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Klebsiella pneumoniae*, especies *Clostridium* (incluyendo *C. difficile*), *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Esta lista no pretende ser limitante.

10 Composiciones farmacéuticas

El término "farmacéutico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia química destinada a usarse en la cura, el tratamiento o la prevención de enfermedades, y que está sujeta a un proceso de aprobación por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (o un equivalente no estadounidense del mismo) como un producto farmacológico recetado o de venta libre. Se pueden encontrar detalles sobre técnicas para la formulación y administración de dichas composiciones en Remington, "The Science and Practice of Pharmacy" 21ª edición (Mack Publishing Co., Easton, PA), y Nielloud y Marti-Mestres, "Pharmaceutical Emulsions and Suspensions": 2ª edición (Marcel Dekker, Inc, Nueva York).

Para los fines de la presente divulgación, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante diversos medios, incluyendo la vía oral, parenteral, mediante pulverización por inhalación, tópica o rectal en formulaciones que contienen portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, la vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, intratecal e inyección epidural con varias técnicas de infusión. La inyección intraarterial e intravenosa, como se usa en el presente documento, incluye la administración a través de catéteres. También se contempla la administración a través de stent intracoronarios y depósitos intracoronarios. La administración intratumoral de los compuestos de la presente invención puede activar directamente las DC localmente infiltrantes, potenciar directamente la apoptosis de las células tumorales o sensibilizar las células tumorales hacia los agentes citotóxicos. El término oral como se usa en el presente documento incluye, pero sin limitación, la ingestión oral, o la administración por vía sublingual o bucal. La administración oral incluye bebidas líquidas, barritas energéticas, así como formulaciones de pastillas.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para el método de administración pretendido. Cuando se usan para uso oral, por ejemplo, pueden prepararse comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes y elixires. Las composiciones destinadas a uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas, y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes, incluyendo agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el fin de proporcionar una preparación sabrosa. Son aceptables los comprimidos que contienen un compuesto farmacológico en combinación con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio o sódico, lactosa, fosfato cálcico o sódico; agentes de granulación y desintegración, tales como almidón de maíz o ácido alginico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábica; y agentes lubricantes; tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos, o se pueden recubrir mediante técnicas conocidas que incluyen recubrimiento entérico, recubrimiento colónico o microencapsulación para retrasar la desintegración y adsorción en el tracto gastrointestinal y/o proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retraso temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse en forma de cápsulas de gelatina dura, donde el compuesto farmacológico se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda, en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, tales como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de suspensiones acuosas mezcladas con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábica, y agentes de dispersión o humectantes tales como fosfátidos de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo,

estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes, tales como *p*-hidroxibenzoato de etilo o de *n*-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, tales como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones orales pueden contener un agente espesante, tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes, tales como aquellos expuestos anteriormente, y los agentes aromatizantes se pueden añadir para proporcionar una preparación oral agradable al paladar. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante, tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables de la divulgación, adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes de dispersión o humectantes adecuados y los agentes de suspensión se ejemplifican mediante los divulgados anteriormente. Excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes y colorantes, también pueden estar presentes.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete, un aceite mineral, tal como parafina líquida, o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural, tales como goma arábiga y goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitano, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietilensorbitano. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y saborizantes.

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, tales como glicerol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante, un saborizante o un agente colorante.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico tal como una solución en 1,3-butanodiol o prepararse en forma de un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónica. Además, pueden emplearse de manera convencional aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables pueden usarse asimismo ácidos grasos, tales como ácido oleico.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con el material portador, produciendo una forma de dosificación unitaria variará dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración en particular. Por ejemplo, una formulación de liberación temporal prevista para la administración oral a seres humanos puede contener de aproximadamente 20 a 500 mg de material activo compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de material transportador, que puede variar de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 95 % de las composiciones totales. Se prefiere la preparación de la composición farmacéutica que proporcione cantidades fácilmente medibles para la administración. Por lo general, una cantidad eficaz para ser administrada sistémicamente es de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, y depende de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, la edad y el peso del sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano), la afección exacta que requiere tratamiento y su gravedad, la vía de administración, quedando, finalmente, a discreción del médico o veterinario asistente. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular dependerá de diversos factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta de la persona tratada; el tiempo y la vía de administración; la tasa de excreción; otros fármacos que se hayan administrado previamente; y la gravedad de la afección en particular que se somete a terapia, como se entiende bien por los expertos en la materia.

Como se ha señalado anteriormente, las formulaciones de la divulgación adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades diferenciadas tales como cápsulas, sobres o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, en forma de un polvo o de gránulos; en forma de una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar en forma de un bolo, electuario o pasta.

Un comprimido se puede preparar por compresión o moldeo, opcionalmente, con uno o más ingredientes auxiliares.

Los comprimidos preparados por compresión pueden prepararse prensando en una máquina adecuada el principio activo en forma fluida tal como un polvo o gránulos, mezclados de forma opcional con un aglutinante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeables pueden fabricarse en una máquina adecuada usando una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo de los mismos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos se pueden proporcionar opcionalmente con un recubrimiento entérico o colónico para proporcionar liberación en partes del intestino que no sean el estómago. Esto es particularmente ventajoso con los compuestos de fórmula 1 cuando dichos compuestos son susceptibles a la hidrólisis ácida.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden al principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

Las formulaciones para la administración rectal pueden presentarse en forma de un supositorio con una base adecuada que comprenda, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal se pueden presentar en forma de óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverización que contienen, además del principio activo, los vehículos considerados apropiados en la técnica.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado de criodesecación (liofilizado), que solo precisa la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección a partir de polvos, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

Como se usan en el presente documento, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación: acetato, piridina, amonio, piperazina, dietilamina, nicotinamida, ácido fórmico, urea, sodio, potasio, calcio, magnesio, cinc, litio, ácido cinámico, metilamino, ácido metanosulfónico, ácido pícrico, ácido tartárico, trietilamino, dimetilamino y tris(hidroximetil)aminometano. Los expertos en la técnica conocen sales farmacéuticamente aceptables adicionales.

Una cantidad eficaz para un paciente en particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se vaya a tratar, el estado de salud general del paciente, la vía y la dosis de administración, y la gravedad de los efectos secundarios. Se dispone de orientación para los métodos de tratamiento y de diagnóstico (véase, por ejemplo, Maynard, *et al.* (1996) "A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice", Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) "Good Laboratory and Good Clinical Practice", Urch Publ., Londres, RU).

Se puede administrar una cantidad eficaz en una dosis, pero no está restringido a una dosis. Así pues, la administración puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, o más, administraciones de composición farmacéutica. Cuando hay más de una administración de una composición farmacéutica en los presentes métodos, las administraciones pueden estar separadas por intervalos de tiempo de un minuto, dos minutos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más minutos, por intervalos de aproximadamente una hora, dos horas, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, y así sucesivamente. En el contexto de las horas, el término "aproximadamente" significa más o menos cualquier intervalo de tiempo más/menos 30 minutos. Las administraciones también pueden estar separadas por intervalos de tiempo de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días y sus combinaciones. La invención no se limita a intervalos de dosificación que están espaciados por igual en el tiempo, sino que abarca dosis a intervalos no iguales.

Una pauta de dosificación de, por ejemplo, una vez/semana, dos veces/semana, tres veces/semana, cuatro veces/semana, cinco veces/semana, seis veces/semana, siete veces/semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas y similares, está disponible para la invención. Las pautas de dosificación abarcan la dosificación durante un período total de tiempo de, por ejemplo, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses y doce meses.

Se proporcionan ciclos de las pautas de dosificación anteriores. El ciclo se puede repetir aproximadamente, por ejemplo, cada siete días; cada 14 días; cada 21 días; cada 28 días; cada 35 días; 42 días; cada 49 días; cada 56 días;

cada 63 días; cada 70 días; y similares. Entre cada ciclo, se puede dar un intervalo de no dosificación, donde el intervalo puede ser de aproximadamente, por ejemplo, siete días; 14 días; 21 días; 28 días; 35 días; 42 días; 49 días; 56 días; 63 días; 70 días; y similares. En este contexto, el término "aproximadamente" significa más o menos un día, más o menos dos días, más o menos tres días, más o menos cuatro días, más o menos cinco días, más o menos seis días, o más o menos siete días.

Los métodos para la administración conjunta con un agente terapéutico adicional son bien conocidos en la técnica (Hardman, *et al.* (eds.), (2001) "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) "Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach", Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) "Cancer Chemotherapy and Biotherapy", Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA).

Como se ha indicado, Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas para la administración parenteral o enteral. Una composición farmacéutica típica para su administración a un animal comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª Ed., Easton ed., Mack Publishing Co., pág. 1405-1412 y 1461-1487 (1975); "The National Formulary XIV", 14ª Ed., American Pharmaceutical Association, Washington, DC (1975). Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como el etiloleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, solución de Ringer con dextrosa, etc. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores líquidos y de nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diferentes componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con las habilidades habituales en la técnica.

Las administraciones repetidas de una determinada vacuna (refuerzo homólogo) han demostrado su eficacia para aumentar las respuestas humorales. Dicho enfoque puede no ser eficaz para aumentar la inmunidad celular, porque la inmunidad previa al vector tiende a perjudicar la presentación robusta del antígeno y la generación de señales inflamatorias apropiadas. Un enfoque para sortear este problema ha sido la administración secuencial de vacunas que usan diferentes sistemas de administración de antígenos (refuerzo heterólogo). En un régimen de refuerzo heterólogo, al menos una administración primaria o de refuerzo comprende la administración de las composiciones de dinucleótidos cíclicos de purina/células tumorales inactivadas descritas en el presente documento. El grupo heterólogo del régimen puede comprender la administración de antígeno usando una o más de las siguientes estrategias:

bacterias o virus inactivados o atenuados que comprenden el antígeno de interés, que son partículas que han sido tratadas con alguna condición desnaturalizante para hacerlas ineficaces o ineficientes en la generación de una invasión patógena;

antígenos purificados, que normalmente son antígenos producidos de manera natural purificados de un cultivo de células del patógeno o una muestra de tejido que contiene el patógeno, o una versión recombinante de los mismos;

vectores de administración víricos o bacterianos vivos diseñados de forma recombinante para expresar y/o secretar antígenos en las células hospedadoras del sujeto. Estas estrategias se basan en atenuar (por ejemplo, mediante ingeniería genética) los vectores víricos o bacterianos para que no sean patógenos ni tóxicos;

vectores de células presentadoras de antígeno (APC), tales como un vector de células dendríticas (DC), que comprenden células que están cargadas con un antígeno o transfectadas con una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el antígeno (por ejemplo, Provenge® (Dendreon Corporation) para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico resistente a la castración);

vehículos de administración de antígenos liposomales; y

vectores de ADN desnudo y vectores de ARN desnudo que pueden administrarse mediante una pistola de genes, electroporación, fantasmas bacterianos, microesferas, micropartículas, liposomas, nanopartículas policationicas y similares.

Una vacuna de sensibilización y una vacuna de refuerzo pueden administrarse mediante una cualquiera de las siguientes vías o una combinación de las mismas. En un aspecto, la vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo se administran por la misma vía. En otro aspecto, la vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo se administran por diferentes vías. La expresión "diferentes vías" engloba, pero sin limitación, diferentes sitios del cuerpo, por ejemplo, un sitio que es oral, no oral, entérico, parenteral, rectal, intraganglionar (ganglio linfático), intravenoso, arterial, subcutáneo, intramuscular, intratumoral, peritumoral, intratumoral, infusión, mucoso, nasal, en el espacio cefalorraquídeo o líquido cefalorraquídeo, etc., así como por diferentes modos, por ejemplo, oral, intravenoso e intramuscular.

Se puede administrar una cantidad eficaz de una vacuna de sensibilización o de refuerzo en una dosis, pero no está

restringido a una dosis. Así pues, la administración puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, o más, administraciones de la vacuna. Cuando hay más de una administración de una vacuna, las administraciones pueden estar separadas por intervalos de tiempo de un minuto, dos minutos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más minutos, por intervalos de aproximadamente una hora, dos horas, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, y así sucesivamente. En el contexto de las horas, el término "aproximadamente" significa más o menos cualquier intervalo de tiempo más/menos 30 minutos. Las administraciones también pueden estar separadas por intervalos de tiempo de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días y sus combinaciones. La invención no se limita a intervalos de dosificación que están espaciados por igual en el tiempo, sino que engloba dosis a intervalos no iguales, como una pauta de sensibilización que consiste en la administración a 1 día, 4 días, 7 días y 25 días, solo por proporcionar un ejemplo no limitante.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1. Métodos generales

Los disolventes y reactivos anhidros adecuados para la síntesis de oligonucleótidos en fase de solución se adquirieron y se manipularon bajo argón seco o nitrógeno usando una técnica anhidra. Las reacciones de acoplamiento de amidita y las ciclaciones se llevaron a cabo en acetonitrilo anhidro o piridina bajo argón seco o nitrógeno. Los materiales de partida para todas las reacciones en piridina seca se secaron mediante concentración (tres veces) en piridina. La cromatografía ultrarrápida preparativa de gel de sílice se llevó a cabo usando sílice Fluka 60A de alta pureza o sílice Merck de Grado 9385 usando gradientes de metanol en diclorometano. La HPLC analítica se llevó a cabo en un sistema de HPLC Varian ProStar 210 con un detector de matriz de fotodiodos ProStar 330 a 254 nm usando una columna Microsorb Varian de 10 micrómetros C18 de 250 x 4,6 mm o una columna Varian de 3 micrómetros C18 de 100 x 4,6 mm y gradientes de TEAA 10 mM y acetonitrilo. La HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema de HPLC preparativa LC20-AP de Shimadzu, dotado de un detector SPD-20A UV/Vis que trabaja a 254 nm en una columna Microsorb 60-8 Varian C-18 de 41,6 x 250 mm usando gradientes de TEAA 10 mM y acetonitrilo a un caudal de 50 ml/min. Las extracciones en fase sólida usando Sep-Pak C-18 (Waters) se llevaron a cabo con cargas del 3 % (p/p). La LC/MS (ESI/APCI) se obtuvo en un solo instrumento Shimadzu 2010EV de cuadrupolo con detección de PDA, MS y ELSD usando una HPLC analítica Shimadzu LC20D. La espectrometría de masas de FT-ICR de alta resolución se obtuvo del Laboratorio de Recursos de Biotecnología de la Fundación WM Keck en la Universidad de Yale en New Haven, CT y el QB3/Chemistry Mass Spect Lab en UC Berkeley.

Se adquirieron espectros de ^1H , ^{31}P , de COSY de ^1H - ^1H (espectroscopía de correlación de RMN 2D), de HMBC de ^1H - ^{31}P (espectroscopía de correlación de enlace múltiple heteronuclear) en d_6 -DMSO con 10 μl de D_2O (retardo de 16 horas tras la adición de D_2O) a 45 °C en un espectrómetro de RMN INOVA-500 de Varian funcionando a 500 MHz para ^1H y a 202 MHz para ^{31}P . Se transfirieron los FID resultantes a un PC y se procesaron usando el software de procesamiento de RMN NUTS de Acorn NMR Inc. Los desplazamientos químicos se referenciaron con respecto al disolvente DMSO, 2,50 ppm para ^1H . Según las recomendaciones de la IUPAC para la referenciación del espectro de RMN, los desplazamientos químicos de ^{31}P se referenciaron usando la "escala unificada" a la frecuencia absoluta de ^1H de 0 ppm. Algunos de los espectros de ^1H y ^{31}P se adquirieron en un espectrómetro de RMN ECX-400 de JEOL que funcionaba a 400 MHz para ^1H y 162 MHz para ^{31}P .

El espectro de COSY en gradiente se adquirió en modo de valor absoluto usando 2.048 puntos de datos en la dimensión directa y 256 puntos de tiempo en la dimensión indirecta. Ambas dimensiones fueron sometidas a apodización usando funciones al cuadrado de campana sinusoidal. La dimensión indirecta se llenó a cero, dando un tamaño de matriz final de 2048 x 2048 puntos y una resolución de 3,91 Hz/punto de datos en ambas dimensiones.

Asignación de regioquímica en el enlace fosfodiéster: se usaron experimentos de COSY de ^1H - ^1H en combinación con HMBC de ^1H - ^{31}P (y, en algunos casos, desacoplamiento de fósforo) para proporcionar pruebas directas de que la regioquímica de los enlaces fosfodiéster son 2', 5'-3', 5' (véase el análisis en el apartado experimental para 9a y Fig. 3A-G). Experimentos similares de HMBC de ^1H - ^{31}P confirmaron la regioquímica no canónica (2', 5'-3', 5') en el enlace fosfodiéster de todos los dinucleótidos cíclicos sintetizados tras la desprotección final de sililo o el intercambio iónico.

La asignación de los diastereómeros *RR* y *RS* (productos de CDN principales de la secuencia sintética) siguió los métodos de la bibliografía (Zhao *et al.* "Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids" 289: 352-378, 2009J).

Todos los productos de CDN (Fig. 2A-2C) fueron ≥ 95 % puros como se indica por el análisis de HPLC de fase inversa C18 (detección UV a 254 nm)

Abreviaturas y acrónimos: Guanina = G. isobutilil-guanina = G^{ib} . 4,4-dimetoxitritilo = DMT. $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ = CEO. *tert*-butildimetilsililo = TBS. adenina = A. benzoil-adenina = A^{Bz} . $[\text{A}(2',5')\text{pA}(3',5')\text{p}]$ cíclico = ML-CDA = 19a (sal de TEA). ditio- $[\text{R}_\text{P}, \text{R}_\text{P}]\text{-}[\text{A}(2',5')\text{pA}(3',5')\text{p}]$ cíclico = ML-RR-CDA = **19b** (sal de TEA); **21** (sal de sodio); **22** (sal de amonio). ditio- $[\text{R}_\text{P}, \text{S}_\text{P}]\text{-}[\text{A}(2',5')\text{pA}(3',5')\text{p}]$ cíclico = ML-RS-CDA = 19c (sal de TEA). $[\text{G}(2',5')\text{pG}(3',5')\text{p}]$ cíclico = ML-CDG = 9a (sal

de TEA). ditio-[R_P, R_P]-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico = ML-RR-CDG = **9b** (sal de TEA). ditio-[R_P, S_P]-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico = ML-RS-CDG = **9c** (sal de TEA). [G(2',5')pA(3',5')p] cíclico = ML-cGAMP. ditio-[R_P, R_P]-[G(2',5')pA(3',5')p] cíclico = ML-RR-cGAMP = **20** (sal de TEA). monotio-[A(2',5')pA(3',5')Rp] cíclico = ML-3',5'-R-CDA = **19d** (sal de TEA). 2'-O-miristoil-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico = C14-ML-CDG = **10** (sal de TEA). ML-cGAMP = 2',3'-cGAMP = [G(2',5')pA(3',5')p] cíclico = **23** (sal de TEA).
Se preparó ML-cGAMP (estructura **23** en la Fig. 2c) enzimáticamente a partir de cGAS celular y se purificó mediante HPLC prep.

Ejemplo 2. Apartado experimental general para la serie de ML-CDG (Fig. 2a): síntesis de [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico **9a**. (no forma parte de la invención)

1) Preparación de **3**. A una solución de 4,87 g (5,0 mmol) de N²-isobutiril-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-*terc*-butildimetilsilil-3'-O-[(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilaminofinil]guanosina (**1**) en 25 ml de acetonitrilo, se añadieron 0,18 ml (10 mmol) de agua y 1,23 g (6 mmol) de trifluoroacetato de piridinio. Tras 5 minutos de agitación a temperatura ambiente, se añadieron 25 ml de *t*-butilamina, y se agitó la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se eliminaron los disolventes a presión reducida, dando **2** en forma de una espuma que luego se evaporó junto con acetonitrilo (2 x 50 ml). A una solución de **2** en 60 ml de diclorometano, se añadieron 0,9 ml (50 mmol) de agua y 60 ml de ácido dicloroacético al 6 % (v/v) en diclorometano (44 mmol). Tras 10 minutos a temperatura ambiente, se interrumpió la reacción mediante la adición de piridina (7,0 ml, 87 mmol). Se concentró la mezcla de reacción hasta un aceite que se secó mediante tres evaporaciones conjuntas con 40 ml de acetonitrilo anhidro, la última vez dejando **3** en un volumen de 12 ml.

2) Preparación de una solución seca de **4**. Se disolvió N²-isobutiril-5'-O- 4,4'-dimetoxitritil-3'-O-*terc*-butildimetilsilil-2'-O-[(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilaminofinil]guanosina (**4**, 6,33 g, 6,5 mmol) en 40 ml de acetonitrilo anhidro y se secó mediante tres evaporaciones conjuntas con 40 ml de acetonitrilo anhidro, la última vez dejando 20 ml. Se añadieron diez tamices moleculares de 3 Å y se almacenó la solución en argón hasta su uso.

3) Acoplamiento de **3** y **4**, dando, tras la oxidación y destritolación, el dímero lineal 2',5' **6a**. Se añadió **4** secado azeotrópicamente (6,5 mmol) en 20 ml de acetonitrilo mediante una jeringa a **3** (5,0 mmol). Tras 5 minutos agitando a temperatura ambiente, se añadieron 2,37 ml (15 mmol) de hidroperóxido de *t*-butilo 5,5 M en decano y se agitó la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se enfrió la reacción hasta 0 °C y se añadieron 1,25 g de NaHSO₃ en 2,5 ml de agua, se retiró el baño de hielo y se agitó la reacción durante 5 minutos. La reacción se concentró hasta obtenerse una espuma, que luego se recogió en 80 ml de diclorometano. Se añadieron 0,9 ml de agua y 80 ml de ácido dicloroacético al 6 % (v/v) en diclorometano, y se agitó la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 ml de piridina para inactivar el ácido dicloroacético. Se eliminaron los disolventes a presión reducida, dando **6a** en bruto en forma de un sólido.

4) Ciclación de **6a**, dando **7a**. Se disolvió **6a** en 50 ml de piridina seca y se transfirieron 5 ml (1/10 de la reacción total, aproximadamente, 0,5 mmol) mediante una jeringa a 150 ml de piridina seca. Esto se concentró hasta un volumen de aproximadamente 100 ml. Luego se añadió 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxafosforina-2-óxido (DMOCP, 0,35 g, 1,8 mmol) y se agitó la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,32 ml de agua de inmediato, seguidos de la adición de 0,16 g de yodo, y se agitó la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se vertió la mezcla de reacción en 350 ml de agua que contenía 0,1 g de NaHSO₃ y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron lentamente 2 g de NaHCO₃ con agitación, luego se vertieron en un embudo de decantación y se extrajeron con 400 ml de acetato de etilo:éter dietílico 1:1. La capa acuosa se extrajo nuevamente con 400 ml de acetato de etilo:éter dietílico 1:1, y las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a presión reducida, produciendo 0,75 g de una mezcla que contenía **7a**, el [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico totalmente protegido.

5) Desprotección de **7a** en bruto con metilamina, dando **8a** en bruto. A 750 mg de **7a**, se añadieron 18 ml de metilamina en etanol anhidro (33 % en peso) y se agitó la mezcla durante 90 minutos, momento en el que el análisis por HPLC indicó que la reacción se había completado. Se concentró la mezcla de reacción, dando un aceite que, tras el tratamiento con 10 ml de hexano/acetato de etilo (50:50), produjo un sólido blanquecino. Se decantó el disolvente de trituración/lavado, y el disolvente residual se eliminó a presión reducida, dando 240 mg de un sólido blanquecino.

6) HPLC preparativa del **8a** en bruto. Se recogió una parte de 120 mg de **8a** en bruto en 5 ml de CH₃CN/acetato de trietilamonio acuoso 10 mM (20/80). Tras una filtración a través de PTFE de 0,45 micrómetros, se aplicó la muestra de inyección a una columna Dynamax C-18 (40 x 250 mm). La elución se realizó con un gradiente de acetonitrilo y acetato de trietilamonio acuoso 10 mM (del 20 % al 50 % de CH₃CN durante 20 minutos a 50 ml/min de flujo). Se agruparon las fracciones de HPLC de las dos series de HPLC que contenían **8a** puro, se evaporaron para eliminar el CH₃CN y se liofilizaron para eliminar la mayor parte del agua restante y el tampón volátil, dando, después del secado azeotrópico con acetonitrilo (3 x 4 ml), 42 mg de **8a** puro en forma de la sal de bis-trietilamonio. (También es posible diferir la purificación de HPLC prep. hasta después de la última etapa). HRMS (FT-ICR) m/z: [M-H]⁺ calculado para C₃₂H₅₁N₁₀O₁₄P₂Si₂ 917,2606; observado 917,2622. RMN de ¹H (DMSO-d₆+ D₂O traza) 45 °C δ 8,22 (1H, s), 7,85 (1H, s), 5,76-5,79 (2H, dd), 5,21 (1H, m), 4,85 (1H, m), 4,58 (1H, t), 4,49 (1H, d), 4,31 (1H, m),

4,21 (1H, m), 3,97 (1H, d), 3,83 (3H, m), 2,94 (12H, m), 1,12 (18H, t), 0,90 (9H, s), 0,72 (9H, s), 0,14 (6H, d), 0,09 (3H, s), -0,02 (3H, s). RMN de ^{31}P (DMSO- d_6 + D_2O traza) 45 °C. δ -1,26, -2,02 (**Fig. 3a-3c**).

7) Desprotección de los grupos TBS de **8a** con trihidrofluoruro de trietilamina, neutralización con TEAB y extracción en fase sólida con un Sep-Pak C-18, dando **9a** puro en forma de la sal de bis-trietilamonio. A 40 mg de **8a**, se añadieron 1,0 ml de trihidrofluoruro de trietilamina. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 h. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante HPLC analítica, se neutralizó la muestra mediante la adición gota a gota en 12 ml de bicarbonato de trietilamonio 1 M enfriado. Se desaló la solución neutralizada en un Waters C-18 Sep-Pak y el producto se eluyó con CH_3CN /acetato de trietilamonio acuoso 10 mM (1:1). Se evaporó el CH_3CN a presión reducida, y se congeló la solución acuosa restante y se liofilizó durante la noche. Las evaporaciones múltiples en metanol (3 x 3 ml) y una evaporación final de acetonitrilo al 50 % en metanol (1 x 3 ml) dieron 29,3 mg de $[\text{G}(2',5')\text{pG}(3',5')\text{p}]$ cíclico (**9a**) en forma de la sal de bis-trietilamonio. HRMS (FT-ICR) m/z : $[\text{M-H}]^-$ calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2$ 689,0876; observado 689,0874. RMN de ^1H (DMSO- d_6 + D_2O traza) 45 °C δ 7,92 (1H, s), 7,90 (1H, s), 5,82 (1H, d), 5,80 (1H, d), 4,97 (1H, m), 4,85 (1H, m), 4,68 (1H, m), 4,31 (1H, d), 4,21 (1H, t), 4,10 (2H, m), 3,79 (3H, m), 2,91 (14H, m), 1,13 (22H, t). RMN de ^{31}P (DMSO- d_6) 45 °C. δ 1,80, -1,05.

El tiempo de retención de la HPLC de **9a** es de 7,25 min en comparación con 9,3 min para di-GMP cíclico usando un gradiente del 2 al 20 % de CH_3CN en acetato de trietilamonio 10 mM durante 20 l min en una columna C-18 (3 micrómetros, 100 x 4,6 mm, 0,6 ml/min.) La HRMS (FT-ICR) confirmó la fórmula elemental esperada: $[\text{M-H}]^-$ calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2$ 689,0876; observado 689,0874. La RMN de ^{31}P de **9a** mostró dos máximos (integrando 1:1) a 2,03 y -0,95 ppm coincidentes con un enlace mixto 2',5'/3',5' (tanto $c[\text{G}(3',5')\text{pG}(3',5')\text{p}]$ como $c[\text{G}(2',5')\text{pG}(2',5')\text{p}]$, por ejemplo, solo darían una señal de RMN de ^{31}P debido a la simetría). La prueba directa para la regioquímica de los enlaces fosfodiéster se obtuvo mediante COSY de ^1H - ^1H en combinación con los experimentos de desacoplamiento de fósforo, y mediante RMN bidimensional de HMBC de ^1H - ^{31}P (**Fig. 3b** y **3c**). Los protones anoméricos (H-1) aparecen como un doblete superpuesto de dobletes (o triplete) a 5,82 ppm. La designación "A" se le dio al protón anomérico de campo abajo (H-1) y la de "B" al protón anomérico de campo ligeramente arriba. Comenzando con el protón anomérico en la ribosa tanto "A" como "B", un experimento de COSY de ^1H - ^1H (**Fig. 3b**) permitió la asignación de H-2A (4,96 ppm), H-3A (4,31 ppm), así como H-2B (4,67 ppm) y H-3B (4,84 ppm). La irradiación del fósforo de campo abajo (2,03 ppm) convirtió el multiplete H-3B en un doblete, mientras que la irradiación del fósforo de campo arriba (-0,95 ppm) resultó en una simplificación del complejo multiplete de H-2A. En ambos experimentos de desacoplamiento, también se observó la simplificación del multiplete de metileno de la ribosa 5'. El HMBC bidimensional de ^1H - ^{31}P confirmó el resultado de los experimentos de desacoplamiento. Los resultados de COSY de ^1H - ^1H en combinación con el desacoplamiento de fósforo y los experimentos HMBC de ^1H - ^{31}P proporcionan pruebas directas de que la regioquímica de los enlaces fosfodiéster es 2',5'/3',5' y de que **9a** es $[\text{G}(2',5')\text{pG}(3',5')\text{p}]$ cíclico.

Ejemplo 3. Apartado experimental general para la serie de ML-CDA (**Fig. 2b**): síntesis de la sal de Na de $[\text{A}(2',5')\text{pA}(3',5')\text{p}]$ cíclico **21** (véase el compuesto **Fig. 2c**).

1) Preparación de **13**.

A una solución de 5 g (5,15 mmol) de N^6 -benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-*terc*-butildimetilsilil-3'-O-[(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilaminofinil]adenosina (**11**) en 25 ml de acetonitrilo, se añadieron 0,18 ml (10 mmol) de agua y 1,20 g (6,2 mmol) de trifluoroacetato de piridinio. Tras 5 minutos de agitación a temperatura ambiente, se añadieron 25 ml de *terc*-butilamina y se agitó la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se eliminaron los disolventes a presión reducida, dando **12** en forma de una espuma que luego se evaporó junto con acetonitrilo (2 x 50 ml), después se disolvió en 60 ml de diclorometano. A esta solución, se añadieron agua (0,9 ml, 50 mmol) y 60 ml de ácido dicloroacético al 6 % (v/v) (44 mmol) en diclorometano. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, se inactivó la reacción mediante la adición de piridina (7,0 ml, 87 mmol) y se concentró hasta obtenerse un aceite que se secó mediante tres evaporaciones conjuntas con 40 ml de acetonitrilo anhidro, la última vez dejando **13** en un volumen de 12 ml.

2) Preparación de una solución seca de **14**.

Se disolvió N^6 -benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-*terc*-butildimetilsilil-2'-O-[(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilaminofinil]adenosina (**14**, 6,4 g, 6,6 mmol) en 40 ml de acetonitrilo anhidro y se secó mediante tres evaporaciones conjuntas con 40 ml de acetonitrilo anhidro, la última vez dejando 20 ml. Se añadieron diez tamices moleculares de 3 Å y se almacenó la solución en argón hasta su uso.

3) Preparación del dímero 2',5'-monotio-lineal **16**.

Se añadió **14** secado azeotrópicamente (6,4 g, 6,6 mmol) en 20 ml de acetonitrilo mediante una jeringa a una solución de **13** (5,15 mmol) en 12 ml de acetonitrilo anhidro. Tras 5 minutos agitando a temperatura ambiente, se añadieron 1,14 g (5,6 mmol) de 3-((*N,N*-dimetilaminometilideno)amino)-3*H*-1,2,4-ditiazol-5-tiona (DDTT), y se agitó la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se concentró la reacción y se disolvió el aceite residual en 80 ml de diclorometano. Se añadieron agua (0,9 ml, 50 mmol) y 80 ml de ácido dicloroacético al 6 % (v/v) (58 mmol) en

diclorometano, y se agitó la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 ml de piridina para inactivar el ácido dicloroacético. Se eliminaron los disolventes a presión reducida, dando **16b** en bruto en forma de un sólido.

- 5 4) Ciclación y sulfuración de **16b**, dando los diastereoisómeros de ditio cíclico protegidos **17b** y **17c**.

Se disolvió **16b** en 150 ml de piridina seca que se concentró hasta un volumen de aproximadamente 100 ml. Después, se añadió 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxafosforina-2-óxido (DMOCP, 3,44 g, 18 mmol) y se agitó la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 3,2 ml de agua inmediatamente seguida de la adición de 3-*H*-1,2-benzoditio-3-ona (1,3 g, 7,7 mmol), y se agitó la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces, se vertió la mezcla de reacción en 700 ml de agua que contenía 20 g de NaHCO₃ y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se vertió en un embudo de decantación y se extrajo con 800 ml de acetato de etilo:éter dietílico 1:1. Se extrajo de nuevo la capa acuosa con 600 ml de acetato de etilo:éter dietílico 1:1. Las capas orgánicas se combinaron y se concentraron a presión reducida, produciendo aproximadamente 11 g de un aceite que contenía los diastereoisómeros **17b** y **17c**.

- 5) Cromatografía en columna de gel de sílice de la mezcla en bruto que contiene **17b** y **17c**.

Se disolvió la mezcla en bruto anterior en diclorometano y se aplicó a una columna de sílice de 250 g. Se eluyeron los diastereoisómeros deseados de la columna usando un gradiente de metanol en diclorometano (0-10 %). Se combinaron y se concentraron las fracciones que contenían los diastereoisómeros deseados **17b** y **17c**, dando 2,26 g de aproximadamente el 50 % de **17b** y el 50 % de **17c**.

- 6) Desprotección de los diastereoisómeros cíclicos totalmente protegidos **17b** y **17c** a **18b** y **18c** en bruto.

Se transfirieron 2,26 g de **17b** y **17c** en bruto de la columna de gel de sílice a un tubo de presión de vidrio de paredes gruesas. Se añadieron 60 ml de metanol y 60 ml de amoníaco acuoso concentrado, y se calentó el tubo con agitación en un baño de aceite a 50 °C durante 16 h (las últimas series se realizaron a las 12 h de que se consumiera el material de partida en este momento). Se enfrió la mezcla de reacción hasta casi la temperatura ambiente, se roció con una corriente de gas nitrógeno durante 30 minutos, y luego se transfirió a un matraz grande de fondo redondo. Se eliminó la mayoría de las sustancias volátiles bajo presión reducida con precaución para evitar la formación de espuma y los golpes. Cuando todavía quedaba agua presente, el residuo se congeló y se liofilizó a sequedad.

- 7) Purificación mediante HPLC preparativa de **18b** y **18c** en bruto, dando **18b** puro.

Se recogió la mezcla en bruto liofilizada que contenía **18b** y **18c** en aproximadamente 50 ml de CH₃CN/acetato de trietilamonio acuoso 10 mM (60/40). Tras una filtración a través de PTFE de 0,45 micrómetros, se aplicaron partes de muestra de 4-5 ml a una columna Dynamax C-18 (40 x 250 mm). La elución se realizó con un gradiente de acetonitrilo y acetato de trietilamonio acuoso 10 mM (del 30 % al 50 % de CH₃CN durante 20 minutos a 50 ml/min de flujo). Se combinaron las fracciones de las series de HPLC preparativa que contenían **18b** puro, se evaporaron para eliminar CH₃CN y se liofilizaron, dando 360 mg de **18b** puro (el diastereoisómero R_pR_p) en forma de la sal de bis-trietilamonio.

- 8) Desprotección de los dos grupos TBS de **18b** con trihidrofluoruro de trietilamina, neutralización con TEAB, extracción en fase sólida con un Sep-Pak C-18 y liofilización, dando **19b** puro como la sal de bis-trietilamonio.

8a) A 270 mg (0,24 mmol) de **18b**, se añadieron 5,0 ml de trihidrofluoruro de trietilamina puro. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 40 h. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante HPLC analítica, la muestra se neutralizó mediante la adición gota a gota en 45 ml de bicarbonato de trietilamonio 1 M enfriado y agitado. La solución neutralizada se desaló en una Sep-Pak C-18 de Waters y el producto se eluyó con CH₃CN/acetato de trietilamonio acuoso 10 mM (5:1). Se evaporó el CH₃CN a presión reducida, y se congeló la solución acuosa restante y se liofilizó. Múltiples series de liofilización en agua dieron 122 mg (57 %) de ditio-(Rp,Rp)-[A(2',5')pA(3',5')p cíclico] (**19b**) como la sal de bis-trietilamonio.

8b) Se evaporaron conjuntamente 90 mg (0,08 mmol) de **18b** tres veces con 10 ml de acetonitrilo seco. Se recogió el residuo seco en 0,4 ml de piridina anhidra. Se colocó el matraz con una aguja de ventilación en un baño de aceite a 50 °C, y se añadieron simultáneamente 0,62 ml de trihidrofluoruro de trietilamina y 1,0 ml de trietilamina a la mezcla de agitación. La mezcla se agitó a 50 °C durante dos horas. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante HPLC analítica, la muestra se neutralizó mediante la adición gota a gota en 45 ml de bicarbonato de trietilamonio 1 M enfriado y agitado. La solución neutralizada se desaló en una Sep-Pak C-18 de Waters y el producto se eluyó con CH₃CN/acetato de trietilamonio acuoso 10 mM (1:4). Se evaporó el CH₃CN a presión reducida, y se congeló la solución acuosa restante y se liofilizó. Múltiples series de liofilización en agua dieron 54 mg (76 %) de ditio-(Rp,Rp)-[A(2',5')pA(3',5')p cíclico] (**19b**) como la sal de bis-trietilamonio.

8c) Una variante de la desprotección de TEA-HF mediante calentamiento en TEA-HF puro a 45 °C seguido de la neutralización de TEAB, desalación con Sep-Pak y liofilización.

Se añadió TEA·3HF (1 ml, 6,1 mmol) a **18b** (41 mg, 0,04 mmol) a un matraz dotado de una aguja de ventilación, y se agitó la mezcla a 45 °C. El progreso de la reacción se controló mediante LC y, tras el consumo del material de partida y los análogos de mono-TBS (~2 h), se enfrió la mezcla hasta la temperatura ambiente. Se aplicó la mezcla lentamente con una pipeta a una solución de TEAB 1 M (4,9 ml) y TEA (1,6 ml) a 0 °C y se confirmó un pH ligeramente básico mediante papel de pH. Se desaló la solución neutralizada en una Sep-Pak C-18 de Waters (10 g) y el producto se eluyó con CH₃CN al 15%/acetato de trietilamonio acuoso 10 mM. La liofilización dio 21 mg (64 %) de **19b** (sal de bis-trietilamonio) en forma de un sólido blanco. El análisis mediante HPLC analítica (acetonitrilo al 2-20 %/tampón TEAA 10 nM-20 min) mostró >95 % de pureza (**Fig. 3h**). RMN de ¹H (500 MHz, 45 °C, (CD₃)₂SO-15 µl de D₂O) δ 8,58 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,12 (d, *J* = 8,0, 1H), 5,92 (d, *J* = 7,0, 1H), 5,30 (td, *J* = 8,5; 4,0, 1H), 5,24-5,21 (m, 1H), 5,03 (dd, *J* = 7,5; 4,5, 1H), 4,39 (d, *J* = 4, 1H), 4,23 (dd, *J* = 10,5; 4,0, 1H), 4,18 (s, 1H), 4,14-4,08 (m, 2H), 3,85-3,83 (m, 1H), 3,73 (d, *J* = 12,0, 1H), 3,06 (c, *J* = 7,5, 12H), 1,15 (t, *J* = 7,5, 1H); RMN de ³¹P (200 MHz, 45 °C, (CD₃)₂SO-15 µl de D₂O) δ 58,81; 52,54; HRMS (FT-ICR) *m/z* calculado para C₂₀H₂₄O₁₀N₁₀P₂S₂ (M - H)⁻ 689,0521, observado 689,0514.

8d) También es posible el tratamiento de la reacción DE TEA-HF mediante precipitación con acetona como se describe en Gaffney *et al.* 2010, pero se ha obtenido un producto algo más limpio usando las modificaciones descritas en los apartados 8a-8c anteriores.

10) Conversión a sal de sodio

La sal de bis-TEA ML-RR-CDA (**19b**) se convierte fácilmente en la sal de sodio farmacéuticamente aceptable (**21**) mediante intercambio iónico como se describe a continuación.

ML-RR-CDA·2Na⁺ (**21**). Malla 100-200 de resina BT AG ® 50W-X2, Se empaquetó la forma de hidrógeno (100 mg) en suspensión con agua DI en una columna Bio-spin®. Se drenó el exceso de agua DI por gravedad. Se pasaron 3 volúmenes de lecho de NaOH 1 M (1 ml) a través de la columna por gravedad, seguidos de 5 volúmenes de lecho de agua DI (2 ml). Tras drenar el exceso de agua DI por gravedad, se cargó en la columna una solución de ML-RR-CDA·2TEA (**19b**, 10 mg) en agua DI (1 ml). La columna se eluyó con 5 volúmenes de lecho de agua DI (2 ml), se recogieron las fracciones y se verificó la actividad UV mediante una placa de TLC y una lámpara UV. Las fracciones de interés se agruparon, se congelaron y se liofilizaron durante la noche, dando ML-RR-CDA·2Na⁺ cuantitativamente. RMN de ¹H (500 MHz, 45 °C, (CD₃)₂SO-30 µl de D₂O) δ 8,54 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,167 (s, 1H), 6,09 (d, *J* = 8,0, 1H), 5,92 (d, *J* = 8,0, 1H), 5,26 (td, *J* = 8,5; 4,5, 1H), 5,21-5,19 (m, 1H), 5,01 (dd, *J* = 7,5; 4,5, 1H), 4,42 (d, *J* = 4, 1H), 4,23 (dd, *J* = 10,5; 5,0, 1H), 4,17 (s, 1H), 4,15-4,00 (m, 2H), 3,90-3,82 (m, 1H), 3,73-3,70 (m, 1H); RMN de ³¹P (200 MHz, 45 °C, (CD₃)₂SO-30 µl de D₂O) δ 58,85; 51,53 (**Fig. 3d-3g**); HRMS (FT-ICR) *m/z* calculado para C₂₀H₂₃O₁₀N₁₀P₂S₂ (M - H)⁻ 689,0521, observado 689,0503.

La prueba directa para la regioquímica de los enlaces fosfodiéster se obtuvo mediante COSY de ¹H-¹H en combinación con RMN bidimensional de HMBC de ¹H-³¹P (**Fig. 3e-3g**) de forma análoga al apartado experimental de las series de ML-CDG (como se ha descrito anteriormente).

ML-RR-CDG (9b). El compuesto **9b** se sintetizó de forma análoga a ML-CDG siguiendo los procedimientos del apartado experimental de las series de ML-CDG (como se ha descrito anteriormente) con las siguientes modificaciones (**Fig. 2a**): e) DDTT; h) 3-H-1,2-benzoditiol-3-ona; n) obtenido como la sal de TEA, no se necesitó intercambio iónico.

RMN de ¹H (500 MHz, 45 °C, (CD₃)₂SO-15 µl de D₂O) δ 7,98 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 5,85 (d, *J* = 9,0, 1H), 5,80 (d, *J* = 7,5, 1H), 5,25-5,23 (m, 1H), 5,12 (dd, *J* = 8,5; 4,5, 1H), 4,73 (dd, *J* = 8,0; 4,5, 1H), 4,42 (d, *J* = 4,0, 1H), 4,22 (t, *J* = 7,5, 1H), 4,14-4,10 (m, 2H), 3,94-3,90 (m, 2H), 3,77-3,73 (m, 1H), 3,05 (c, *J* = 7,0, 12H), 1,160 (t, *J* = 7,0, 1H); RMN de ³¹P (200 MHz, 45 °C, (CD₃)₂SO-15 µl de D₂O) δ 59,09; 50,37; HRMS (FT-ICR) *m/z* calculado para C₂₀H₂₃O₁₂N₁₀P₂S₂ (M - H)⁻ 721,0419, observado 721,0410.

ML-RS-CDG (9c). El compuesto **9c** se sintetizó de forma análoga a ML-CDG siguiendo los procedimientos del apartado experimental de las series de ML-CDG (como se ha descrito anteriormente) con las siguientes modificaciones (**Fig. 2a**): e) DDTT; h) 3-H-1,2-benzoditiol-3-ona; k) se recogió el diastereómero [Rp, Sp] **8c**; n) obtenido como la sal de TEA, no se necesitó intercambio iónico.

RMN de ¹H (500 MHz, 45 °C, (CD₃)₂SO-15 µl de D₂O) δ 8,01 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 5,86 (d, *J* = 8,5, 1H), 5,79 (d, *J* = 8,0, 1H), 5,29 (dd, *J* = 8,5; 4,0, 1H), 5,20-5,19 (m, 1H), 4,68 (dd, *J* = 8,5; 4,0, 1H), 4,21-4,18 (m, 2H), 4,10-4,05 (m, 3H), 3,71-3,68 (m, 2H), 2,96 (c, *J* = 7,0, 12H), 1,13 (t, *J* = 7,0, 18H); RMN de ³¹P (200 MHz, 45 °C, (CD₃)₂SO-15 µl de D₂O) δ 59,89; 57,17; HRMS (FT-ICR) *m/z* calculado para C₂₀H₂₄O₁₂N₁₀P₂S₂ (M - H)⁻ 721,041904, observado 721,04143.

C14-ML-CDG (10): El compuesto **10** (**Fig. 2c**) se sintetizó de manera análoga a ML-CDG siguiendo los procedimientos del apartado experimental de las series de ML-CDG (como se ha descrito anteriormente) con las siguientes modificaciones (**Fig. 2a**): n) anhídrido mirístico, DMF.

A la sal de bis-trietilamina de **9a** (0,260 g, 0,291 mmol), se añadieron 3,7 ml de DMF, 0,3 ml de piridina y 128 mg (0,292 mmol) de anhídrido mirístico. Se calentó la mezcla de reacción durante un total de 5 h a 60 °C, se enfrió hasta

la temperatura ambiente y se inactivó con 100 µl de MeOH. La traza de la LC indicó una conversión del 25 % en un producto nuevo principal, apareciendo el resto de la masa en el intervalo de tiempos de retención del material de partida. La masa del producto principal se confirmó como el producto acilado C14 mediante LC/MS en modo negativo, con m/z (M-1) de 899 (calculado para $C_{34}H_{49}N_{10}O_{15}P_2^-$: 899,3). Tras la evaporación, se recogió el residuo en 2 ml de CH_3CN , 3 ml de TEAA 0,1 M y suficiente MeOH para llevar la mayor parte del material a la solución. Tras una breve centrifugación para eliminar una pequeña cantidad de material de partículas, se purificó la solución mediante HPLC prep de C18 usando un gradiente de CH_3CN del 25 % -> 50 % en TEAA 10 mM durante 20 min. Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado y se liofilizaron a sequedad, proporcionando 36 mg de C14-ML-CDG **10** (sal de trietilamonio) en forma de un sólido blanco.

RMN de 1H (500 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-15$ µl de D_2O) δ 8,00 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 5,98 (d, $J = 7,5$, 1H), 5,83 (d, $J = 8,5$, 1H), 5,76 (dd, $J = 7,5$; 4,5, 1H), 5,15-5,10 (m, 1H), 4,90-4,85 (m, 1H), 4,36 (d, $J = 4,5$, 1H), 4,30-4,27 (m, 1H), 4,07 (s, 1H), 3,94-3,90 (m, 3H), 3,82-3,78 (m, 1H), 3,04 (c, $J = 7,0$, 12H), 2,37-2,23 (m, 2H), 1,51-1,43 (m, 2H), 1,28-1,14 (m, 38H). 0,85 (t, $J = 7,0$, 3H); RMN de ^{31}P (200 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-15$ µl de D_2O) δ -1,36, -2,12; HRMS (FT-ICR) m/z calculado para $C_{34}H_{49}O_{15}N_{10}P_2$ (M - H) $^-$: 899,2860, observado 899,2834.

ML-CDA (19a). El compuesto **19a** se sintetizó de forma análoga a ML-RR-CDA siguiendo los procedimientos del apartado experimental de las series de ML-CDA (como se ha descrito anteriormente) con las siguientes modificaciones (Fig. 2b): e) t-BuOOH; h) I_2/H_2O ; n) obtenido como la sal de TEA, no se necesitó intercambio iónico.

RMN de 1H (500 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-15$ µl de D_2O) δ 8,44 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 6,08 (d, $J = 8,0$, 1H), 5,90 (d, $J = 7,5$, 1H), 5,10-5,0 (m, 3H), 4,30 (d, $J = 4,5$, 1H), 4,3-4,19 (m, 1H), 4,14 (d, $J = 1,5$, 1H), 4,05 (c, $J = 11,5$, 2H), 3,78-3,75 (m, 2H), 2,90 (c, $J = 7,5$, 18H), 1,08 (t, $J = 7,0$, 27H); RMN de ^{31}P (200 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-15$ µl de D_2O) δ 1,67, -0,47; HRMS (FT-ICR) m/z calculado para $C_{20}H_{24}O_{12}N_{10}P_2$ (M - H) $^-$: 657,097763, observado 657,09680.

ML-RS-CDA (19c). El compuesto **19c** se sintetizó de forma análoga a ML-RR-CDA siguiendo los procedimientos del apartado experimental de las series de ML-CDA (como se ha descrito anteriormente) con las siguientes modificaciones (Fig. 2b): k) se recogió el diastereómero [Rp, Sp] 18c; n) obtenido como la sal de TEA, no se necesitó intercambio iónico.

RMN de 1H (500 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-15$ µl de D_2O) δ 8,52 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,10 (d, $J = 8,5$, 1H), 5,90 (d, $J = 7,5$, 1H), 5,45 (dd, $J = 8,5$; 4,5, 1H), 5,31-5,26 (m, 1H), 5,00 (dd, $J = 8,5$; 4,5, 1H), 4,41-4,36 (m, 1H), 4,22 (d, $J = 5,0$, 1H), 4,14-4,07 (m, 3H), 3,70-3,67 (m, 3H), 2,84 (c, $J = 7,0$, 19H), 1,08 (t, $J = 7,5$, 29H); RMN de ^{31}P (200 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-15$ µl de D_2O) δ 59,98; 57,35; HRMS (FT-ICR) m/z calculado para $C_{20}H_{24}O_{10}N_{10}P_2S_2$ (M - 2 H+Na) $^-$: 711,0340, observado 711,0316.

ML-3'-5'-R-CDA (19e). El compuesto **19e** se sintetizó de forma análoga a ML-RR-CDA siguiendo los procedimientos del apartado experimental de las series de ML-CDA (como se ha descrito anteriormente) con las siguientes modificaciones (Fig. 2b): e) t-BuOOH; h) 3-H-1,2-benzoditiol-3-ona; n) obtenido como la sal de TEA, no se necesitó intercambio iónico.

RMN de 1H (500 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-15$ µl de D_2O) δ 8,49 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 6,09 (d, $J = 8,5$, 1H), 5,90 (d, $J = 7,5$, 1H), 5,23 (dd, $J = 8,0$; 5,0, 1H), 5,12-5,04 (m, 2H), 4,31 (d, $J = 4,5$, 1H), 4,21-4,14 (m, 3H), 4,10 (c, $J = 11,0$, 1H), 3,80-3,71 (m, 2H), 2,85 (c, $J = 7,0$, 18H), 1,08 (t, $J = 7,5$, 27H); RMN de ^{31}P (200 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-15$ µl de D_2O) δ 59,32; -0,37; HRMS (FT-ICR) m/z calculado para $C_{20}H_{23}O_{11}N_{10}P_2S$ (M - H) $^-$: 673,0749, observado 673,0729.

ML-RR-CDA (22) en forma de una sal de amoníaco. El compuesto **22** se sintetizó de forma análoga a ML-RR-CDA siguiendo los procedimientos del apartado experimental de las series de ML-CDA (como se ha descrito anteriormente) con las siguientes modificaciones (Fig. 2b): n) Malla 100-200 de resina BT AG ® 50W-X2, forma de hidrógeno, NH_4OH 1 M. RMN de 1H (500 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-30$ µl de D_2O) δ 8,80 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,39 (s, 2H), 6,45 (d, $J = 10,0$, 1H), 6,34 (s, 1H), 5,50 (td, $J = 10,5$; 4,5, 1H), 5,21-5,15 (m, 1H), 5,02 (d, $J = 4,0$, 1H), 4,92 (d, $J = 4,5$, 1H), 4,61-4,49 (m, 2H), 4,30-4,27 (m, 2H); 1HRMS (FT-ICR) m/z calculado para $C_{20}H_{23}O_{10}N_{10}P_2S_2$ (M - H) $^-$: 689,0521, observado 689,0504.

ML-RR-cGAMP (20). El compuesto **20** (Fig. 2c) se sintetizó de forma análoga a ML-RR-CDA siguiendo los procedimientos del apartado experimental de las series de ML-CDA (como se ha descrito anteriormente) con las siguientes modificaciones (Fig. 2b): d) pir, **4**; n) obtenido como la sal de TEA, no se necesitó intercambio iónico.

RMN de 1H (500 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-30$ µl de D_2O) δ 8,34 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 5,91 (d, $J = 7,5$, 1H), 5,86 (d, $J = 8,5$, 1H), 5,29-5,23 (m, 1H), 5,17-5,14 (m, 1H), 5,02 (dd, $J = 7,5$; 4,0, 1H), 4,41 (d, $J = 4,5$, 1H), 4,25 (dd, $J = 5,0$; 10,5, 1H), 4,13-4,03 (m, 3H), 3,95-3,85 (m, 1H), 3,78-3,74 (m, 1H), 2,84 (c, $J = 7,5$, 18H), 1,08 (t, $J = 7,5$, 28H); RMN de ^{31}P (200 MHz, 45 °C, $(CD_3)_2SO-30$ µl de D_2O) δ 58,81; 50,91; HRMS (FT-ICR) m/z calculado para $C_{20}H_{23}O_{11}N_{10}P_2S_2$ (M - H) $^-$: 705,0470, observado 705,0451.

Ejemplo 4. Derivados sustituidos en la ribosa 2' y 3

Por motivos de referencia, en las Fig. 4-6, se representan ejemplos de derivados.

Ejemplo 5. Expresión de interferón de tipo I inducida por CDN

Para determinar el nivel relativo de interferón de tipo I inducido en las células humanas por cada una de las moléculas nativas y derivadas como un distintivo de la potencia adyuvante, se incubaron 4×10^5 linfocitos THP1-Blue™ ISG (una estirpe celular de monocitos humanos transfectada con un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada inducible por IRF (Invivogen) que expresa fosfatasa alcalina bajo el control de un promotor compuesto por cinco elementos de respuesta estimulados por IFN) con 100 μ M de [G(3',5')pG(3',5')p] (CDG) cíclico, [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (enlace mixto o ML-CDG) o HBSS durante 30 minutos a 37 °C con CO₂ al 5 %. Tras 30 minutos, se lavaron las células y se sembraron en placas de 96 pocillos en medio RPMI que contenía FBS al 10 %, y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular de cada muestra tras la incubación durante la noche, y se añadieron 20 μ l de los sobrenadantes de cultivo celular a 180 μ l de reactivo QUANTI-Blue (Invivogen) y se incubaron durante 45 minutos para evaluar los niveles de proteína de interferón de tipo I. Se tomaron lecturas a Absorbancia a 655 nm cada 3 minutos usando un espectrofotómetro cinético Versa Max (Diagnóstico Molecular).

Como se muestra en la Fig. 7, [G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) cíclico indujo niveles significativamente más altos de IFN- β que [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico en una amplia selección de puntos de tiempo. Estos resultados demuestran que un preparado purificado de [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico activa más profundamente la respuesta inmunitaria innata que [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico en una estirpe celular de monocitos humanos.

Para determinar los niveles de IFN- α , - β y - γ inducidos por [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML-CDG) en comparación con [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico como un distintivo de la potencia para activar la inmunidad innata, se incubaron 1×10^6 PBMC humanas primarias aisladas de cuatro donantes humanos independientes en una placa de fondo U de 96 pocillos durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 % con 5 o 0,5 μ M de [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico (CDG) o [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML-CDG), 1 μ g/ml de ADN estimulador del interferón (ISD) o 4 μ g/ml de Poli(I:C) usando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen) para transferir las moléculas a las PBMC. ISD (ADN estimulador del interferón) es independiente del TLR (Stetson, D. B. *et al.*, *Immunity* 24, 93-103, Enero de 2006) y señala a través de cGAS, y por lo tanto, depende de STING, mientras que Poli(I:C) puede señalar a través de las vías TLR3 y RIG-I y, por lo tanto, son independientes de STING. Tras 30 minutos, se lavaron y se reemplazaron las células con medios RPMI que contenían FBS al 10 % y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %. Tras 6 horas de incubación, se recogió una parte de las células y se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real para determinar la expresión génica de las citocinas de tipo I interferón alfa 2 (IFNA2) e interferón beta 1 (IFNB1), y el gen de citocina de tipo II interferón gamma (IFNG). La expresión génica se determinó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de análisis de ADNc y de purificación de ARN PrimePCR, y se ejecutó en el ciclador génico CFX96 (todo de BioRad). Se determinó la expresión normalizada para cada uno, que explica las diferentes eficiencias de la amplificación por PCR para la diana (E_{diana}) y la referencia ($E_{\text{referencia}}$), y transforma el Umbral de Ciclo (UC) de unidad de datos sin procesar a escala logarítmica en la unidad lineal de expresión normalizada. Los genes de referencia usados fueron GUSB y PGK1, y se confirmó que los genes tenían una variable de coeficiente (VC) por debajo de 0,5 y un valor de M por debajo de 1, por lo que no variaron con las diferentes condiciones de tratamiento. Para evaluar los niveles correlativos de proteínas secretadas de estas citocinas, se recogieron los sobrenadantes de las células restantes tras 24 horas de incubación y se determinaron los niveles de IFN- α e IFN- γ mediante la matriz de perlas Cytometric (CBA, BD Biosciences), mientras que los niveles de IFN- β se determinaron mediante ELISA (PBL).

Como se muestra en la Fig. 8, La expresión génica de interferón alfa 2 (IFNA2) fue significativamente mayor para [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico a 5 μ M que para [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico a 5 μ M en los cuatro donantes. De manera similar, la expresión génica de interferón beta 1 (IFNB1) fue significativamente mayor para [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico a 5 μ M que para [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico a 5 μ M en los cuatro donantes. La expresión génica para interferón gamma (IFNG) se indujo a un nivel significativamente más alto para [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico a 5 μ M que para [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico en los cuatro donantes. Estos datos demuestran el aumento de la potencia de [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico en comparación con [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico induce la expresión génica de citocinas inmunitarias innatas críticas en varios donantes humanos.

Como se muestra en la Fig. 9(a), los niveles de IFN- α secretado inducidos en las PBMC humanas primarias por [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico a 5 μ M son más altos que los de [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico a la misma o menor dosis en los cuatro donantes. En la Fig. 9(b), los niveles de IFN- β , según lo evaluado por ELISA, para [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico a 5 μ M también fueron mayores que con los niveles inducidos por [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico, así como para los controles de ISD y Poli(I:C) en los cuatro donantes. La Fig. 9(c) demuestra un hallazgo similar para la secreción de IFN- γ , según lo evaluado por CBA. Tanto a 5 μ M como a 0,5 μ M, el [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico indujo niveles más altos de IFN- γ que el [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico a las mismas dosis y niveles más altos que los controles de ISD y Poli(I:C) en los cuatro donantes. Estos datos demuestran el aumento de la potencia de [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico en comparación con [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico para estimular la producción de IFN de tipo I y II, crítico para la inducción de inmunidad innata a través de una amplia muestra de donantes humanos.

Para determinar el nivel relativo de IFN- β inducido en las células humanas por cada una de las moléculas nativas y derivadas como un distintivo de la potencia adyuvante, se incubaron 4×10^5 células THP1-Blue, una estirpe celular de monocitos humanos transfectada con un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada inducible por IRF (Invivogen), con 50 μ M de [G(3',5')pG(3',5')p] (CDG) cíclico, [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (enlace mixto o ML-CDG), Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG), en comparación con [A(3',5')pA(3',5')p] (CDA), [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (enlace mixto o ML-CDA), Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) o control de medios durante 30 minutos a 37 °C con CO₂ al 5 %. Tras 30 minutos, se lavaron las células y se sembraron en placas de 96 pocillos en medio RPMI que contenía FBS al 10 %, y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular de cada muestra tras la incubación durante la noche, y se añadieron 20 μ l de los sobrenadantes de cultivo celular a 180 μ l de reactivo QUANTI-Blue (Invivogen) y se incubaron durante 45 minutos. Se tomaron lecturas a Absorbancia a 655 nm a los 15 minutos usando un espectrofotómetro SpectraMax (Molecular Diagnostics).

Como se muestra en la Fig. 10, el derivado Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG) indujo niveles significativamente más altos de IFN- β que las moléculas de c-di-GMP cíclico no modificadas (CDG) o de CDG modificadas. De manera similar, la molécula de Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) indujo niveles de IFN- β significativamente más altos que las moléculas de CDA o ML CDA no modificadas. Estos resultados demuestran que los preparados purificados de los derivados ML RR-CDN activan más profundamente la respuesta inmunitaria innata que las moléculas de CDN parentales en una estirpe celular de monocitos humanos.

Para determinar la capacidad relativa de las moléculas derivadas para activar las respuestas inmunitarias, se administraron compuestos de CDN a ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de vida (en un volumen total de 100 μ l en HBSS) a dosis de 50, 5 y 0,5 μ M mediante inyección subcutánea en la base de la cola. Los ratones fueron evaluados 24 horas después para determinar la activación de las células inmunitarias linfocíticas mediante clasificación de células activadas fluorescentes (FACS) para la regulación positiva de la expresión de CD69 de superficie en los linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, en comparación con los controles de isotipo IgG1.

Como se muestra en las Fig. 11(a-c), la molécula de Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG) indujo una potente activación inmunitaria de los linfocitos NK y T de forma dependiente de la dosis. La molécula de Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) también indujo la activación de los linfocitos NK y T, aunque en menor medida que la molécula de ML RR-CDG. Ambas moléculas de ML RR-CDN indujeron una mayor activación de las células inmunitarias que las moléculas de ML CDN a todas las dosis. Estos datos demuestran el aumento de las propiedades de activación inmunitaria de las moléculas de ML RR-CDN en comparación con las moléculas de ML CDN, y específicamente, destaca la capacidad de la molécula de ML RR-CDG para inducir una potente activación de las células inmunitarias.

Ejemplo 6. Resistencia mejorada de los Rp,Rp-ditio-CDN a las fosfodiesterasas

Se midió la inducción del interferón de tipo I en células humanas para evaluar la potencia de oxo no tratado y tratado con fosfodiesterasa, derivados Rp-monotio y Rp,Rp-ditio. Cinco compuestos ([A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (CDA), [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML-CDA), Rp-monotio (Rp,monotio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML R-CDA), Rp,Rp-ditio (Rp,Rp-ditio-[A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (RR-CDA) y Rp, Rp-ditio [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) se trataron bien con 160 μ g de fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD) de *Crotalus adamanteus* (Sigma), 2,5 mU de Nucleasa PI (NP1) de *Penicillium citrinum* (Sigma) o con tratamiento simulado. Se diluyeron 7 μ g de cada compuesto en tampón SVPD (1 x PBS y MgCl₂ 0,6 mM), Tampón NP1 (acetato de Na 30 mM, pH 5,3, ZnCl₂ 2 mM) o se dejaron sin tratar y luego se incubaron durante 2 horas a 37 °C, seguido de la ebullición durante 10 minutos para inactivar las nucleasas. Se incubaron 4×10^5 linfocitos THP1-Blue™ ISG (una estirpe celular de monocitos humanos transfectada con un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada inducible por IRF (Invivogen) que expresa fosfatasa alcalina bajo el control de un promotor compuesto por cinco elementos de respuesta estimulados por IFN) con 50 μ M de moléculas con tratamiento simulado, tratadas con SVPD o tratadas con NP1. Tras 30 minutos, se lavaron las células y se sembraron en una placa de 96 pocillos en medio RPMI que contenía FBS al 10 %, y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular de cada muestra tras la incubación durante 16 h, y se añadieron 20 μ l de los sobrenadantes de cultivo celular a 180 μ l de reactivo QUANTI-Blue (Invivogen) y se incubaron durante 25 minutos para evaluar los niveles de proteína de interferón de tipo I. Se midieron lecturas a la absorbancia de 655 nm con un espectrofotómetro Versa Max (Molecular Diagnostics).

Como se muestra en la Figura 12, los compuestos de Rp,Rp-ditio no tratados, Rp,Rp-ditio-[A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (RR-CDA) y Rp, Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) son inductores más potentes del interferón de tipo I que el oxo ([A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (CDA) y [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML-CDA) y el Rp-monotio. Moléculas derivadas de CDN (Rp,monotio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML R-CDA). Se evaluó la actividad de los derivados de CDN después del tratamiento con la fosfodiesterasa SVPD, que escinde ambos enlaces fosfodiéster 2'-5' y 3'-5', o con NP1, que digiere selectivamente los enlaces de fosfodiéster 3'-5' (Pino, *et al.*, (2008) *Journal of Biological Chemistry*, 283, 36494-36503). La Figura 12 muestra que los compuestos Rp,Rp-ditio, Rp,Rp-ditio-[A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (RR-CDA) y Rp, Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) conservan su potencia después del tratamiento con SVPD y NP1, mientras que oxo ([A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (CDA) y [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML-CDA) perdieron actividad tras la digestión con SVPD y NP1. El derivado Rp-monotio (Rp,monotio [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML R-CDA) que contiene

una única sustitución tio en el enlace fosfodiéster 3'-5 conservó actividad tras la digestión con NP1, pero fue susceptible al tratamiento con SVPD, que escinde el enlace fosfodiéster 2'-5'. La susceptibilidad diferencial de los derivados oxo, Rp-monotio y Rp,Rp-ditio a la digestión con SVPD o NP1 confirma la estructura de los derivados Rp-monotio y Rp,Rp-ditio. Estos resultados también demuestran la utilidad de los derivados Rp,Rp-ditio debido a su resistencia a la digestión con fosfodiesterasas, presentes en sueros y/o en células hospedadoras, resultando así en una activación más potente de la señalización inmunitaria innata y una mayor eficacia terapéutica antitumoral *in vivo*, como se muestra en el presente documento.

Ejemplo 7. Las moléculas derivadas de CDN sintéticas activan potentemente la señalización de todos los alelos STING humanos

Para determinar la capacidad de respuesta de las cinco variantes STING humanas naturales conocidas (denominadas WT, REF, HAQ, AQ y Q) a las moléculas nativas y derivadas, se generó un panel de estirpes celulares 293T de riñón embrionario humano (HEK) que expresaban los alelos STING humanos. La estirpe celular parental HEK 293T no expresa STING endógeno, por lo que se puede evaluar la capacidad de respuesta de alelos STING expresados exógenamente. Los plásmidos MSCV2.2 que codifican hSTING(REF)-GFP, hSTING(WT)-GFP, hSTING(HAQ)-GFP, hSTING(Q)-GFP y mSTING(WT)-GFP se obtuvieron del Laboratorio Vance en UC Berkeley. hSTING(AQ)-GFP se derivó de hSTING(Q)-GFP usando un kit de mutagénesis dirigida QuickChange (Stratagene). La secuencia del alelo hSTING(REF) también se conoce como alelo de Barber (Ishikawa, H., y Barber, G. N. (2008). *Nature* 455, 674-678), y tiene la secuencia de referencia del NCBI NP_938023.1. La diferencia de aminoácidos entre hSTING(REF) y el resto de alelos de STING humanos WT, HAQ, AQ y Q se muestra en la Fig. 13, que está adaptada de Yi *et al.*, Plos One 8: e77846 (2013). Se generaron estirpes celulares estables derivadas de HEK 293T que expresaban cada uno de los alelos STING humanos individuales mediante clasificación FACS de células positivas en GFP usando un clasificador de células Mo Flo en el Centro de Citometría de Flujo del Laboratorio de Investigación del Cáncer en UC Berkeley. Se sembraron 1×10^4 células HEK293T STING en placas de 96 pocillos y se transfectaron transitoriamente (usando Lipofectamine 2000) con 50 ng de un plásmido indicador de IFN- β humano (pLuc-IFN- β) que expresa el promotor IFN- β humano cadena arriba de un indicador de luciferasa y 10 ng de TK-renilla para la normalización. Después de 24 horas, las células se estimularon con moléculas derivadas de CDN nativas y sintéticas usando la permeabilización con digitonina para garantizar una absorción uniforme. Cada estirpe celular STING se estimuló con 10 μ M de [G(3',5')pA(3',5')p] cíclico (cGAMP), [G(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML-cGAMP), Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-cGAMP), [A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (CDA), Rp,Rp-ditio-[A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (RR-CDA), [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML-CDA), Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA), [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico (CDG), Rp,Rp-ditio-[G(3',5')pG(3',5')p] cíclico (RR-CDG), [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML-CDG) o Rp, Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG) en 25 μ l de tampón de digitonina (HEPES 50 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 0,1 mM, Sacarosa 85 mM, BSA al 0,2 %, ATP 1 mM, GTP 0,1 mM, 10 μ g/ml de digitonina). Tras 20 min, se eliminaron las mezclas de estimulación y se añadieron 200 μ l de medio RPMI convencional. Tras la estimulación durante 6 horas, se prepararon lisados celulares y se midió la actividad del gen indicador usando el sistema de ensayo de luciferasa dual (Promega) en un luminómetro Spectramax M3.

La Fig. 14 representa la estimulación de estirpes celulares HEK293 que codifican alelos de variantes de STING humanos midiendo el factor de inducción del indicador IFN β -LUC (ULR representadas en el eje y). Como se muestra en la Fig. 14, los compuestos Rp,Rp-ditio de enlace mixto, Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-cGAMP), Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG) y Rp, Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) inducen fuertemente la actividad del indicador IFN β mediante todos los alelos STING humanos. Los alelos STING humanos refractarios, hSTING (REF) and hSTING (Q), respondieron a un bajo nivel a la estimulación con las moléculas nativas con enlaces canónicos de puente fosfato internucleotídico: [G(3',5')pA(3',5')p] cíclico (cGAMP), [A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (CDA); y [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico (CDG). Sorprendentemente, por el contrario, las estirpes celulares que expresan los alelos STING humanos refractarios respondieron a la estimulación con Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p]cíclico (ML RR-CDA) sintético: ML RR-CDA; ML RR-CDG; y ML RR-cGAMP. Las células que expresan STING de ratón respondieron a todas las moléculas probadas, demostrando que las moléculas derivadas de CDN sintéticas modificadas son relevantes para la activación de la vía de señalización STING humana. Estos resultados demuestran que los compuestos Rp,Rp-ditio de enlace mixto, Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-cGAMP), Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG) y Rp, Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) activan potentemente todos los alelos STING humanos probados, indicando que estas moléculas inducirán eficazmente la inmunidad innata en una amplia selección de la población humana.

Para demostrar que las moléculas derivadas de CDN sintéticas indujeron la maduración de las células dendríticas humanas (DC), se trataron monocitos CD14+ de las PBMC humanas durante 6 días con 50 ng/ml de GM-CSF y 25 ng/ml de IL-4. Siete días después, Las DC derivadas de monocitos se estimularon con LPS (1 μ g/ml) o CDN (50 μ M) añadidos directamente a los medios. Tras 48 h, se determinó la expresión en superficie de MHC de clase I (HLA-ABC), CD80, CD83 y CD86 mediante FACS activada en la población de DC CD11c+. La Fig. 15A representa gráficos de barras que indican el promedio de la intensidad de fluorescencia media (IFM) tras la estimulación con las moléculas de CDN indicadas en la figura. En la Fig. 15B, también se muestran histogramas representativos de la expresión de CD80, CD86, CD83 y MHC de Clase I (HLA-ABC) en las DC humanas. Los histogramas rellenos corresponden a células no estimuladas, la línea de puntos representa la estimulación con LPS, y la línea continua representa la estimulación con Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA). Estos resultados demuestran que las moléculas

de CDN sintéticas con estructuras que comprenden la sustitución de Rp,Rp-ditio de los átomos de oxígeno sueltos del puente de fosfato internucleotídico en combinación con la estructura de puente de fosfato de enlace no canónico o mixto 2'-5, 3'-5' (ML) activa la señalización en todos los alelos STING humanos, y activa potentemente maduración de las CD humanas.

Ejemplo 8. Respuesta de los linfocitos T específica del antígeno inducida por CDN

Para determinar la respuesta de los linfocitos T CD8 específica de OVA inducida por las diferentes moléculas de dinucleótidos cíclicos, se inmunizaron ratones C57BL/6 ($n = 5$) por vía subcutánea con 0 μg (sin CDN) o con 5 μg o 25 μg de [G(2',5')pG(3',5')p] (enlace mixto o ML-CDG) formulado en escualeno al 2 % y agua con 10 μg de proteína de ovoalbúmina. Siete días después de la vacunación, se extrajo sangre de cada animal y se prepararon PBMC. Se estimularon 5×10^4 PBMC durante la noche en un ensayo ELISpot de IFN γ solo con medio (sin estimulación) o con péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ 1 μM en presencia de 1×10^5 esplenocitos sin tratamiento previo como células alimentadoras. Se desarrollaron ELISpots de IFN γ y se cuantificaron usando un lector de placas CTL y el software ImmunoSpot.

Como se muestra en la Fig. 16, ambas dosis de [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML-CDG) inducen respuestas inmunitarias de CD8 específicas de OVA en ratones C57BL/6. Estas respuestas son significativamente más altas que las respuestas inducidas por los controles no estimulados y por un grupo de control sin CDN. Estos resultados demuestran que las formulaciones de [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML-CDG) con un antígeno pueden estimular las respuestas de los linfocitos T CD8 específicas del antígeno *in vivo*.

Para determinar si se requiere la señalización STING para c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) a fin de inducir una respuesta de linfocitos T CD8 específica de OVA, se inmunizaron ratones C57BL/6 ($n = 3$ o 5) y los ratones goldenticket ($n = 3$) por vía subcutánea con 0 μg (sin CDN) o 25 μg de c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) formulado en escualeno al 2 % y agua con 10 μg de proteína ovoalbúmina. Siete días después de la vacunación, se extrajo sangre de cada animal y se prepararon PBMC. Se estimularon 5×10^4 PBMC durante la noche en un ensayo ELISpot de IFN γ solo con medio (sin estimulación) o con péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ 1 μM en presencia de 1×10^5 esplenocitos sin tratamiento previo como células alimentadoras. Se desarrollaron ELISpots de IFN γ y se cuantificaron usando un lector de placas CTL y el software ImmunoSpot.

La Fig. 17 muestra que c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) induce una respuesta de linfocitos T CD8 específica de OVA que depende de la presencia de una molécula STING funcional. En los ratones C57BL/6 de tipo silvestre con una molécula STING funcional, la formulación de c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) y proteína de ovoalbúmina induce respuestas inmunitarias específicas de OVA₂₅₇₋₂₆₄ significativas en comparación con el control sin estimulación y un control sin CDN. En ratones goldenticket, que no expresan una molécula STING funcional (Sauer, "Infection and Immunity" 2011), las respuestas específicas de OVA inducidas por c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) no son significativamente diferentes de las respuestas específicas de OVA inducidas por una formulación de control que no incluye CDN (sin CDN). Estos resultados indican que la respuesta inmunitaria inducida por c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) requiere una molécula STING funcional.

Ejemplo 9. Datos comparativos con diferentes derivados de CDN

Para evaluar la capacidad de las moléculas derivadas para potenciar la inmunidad antitumoral, se implantaron células de melanoma B16 (5×10^4 células en 100 μl de PBS) por vía subcutánea en la parte lumbar de ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas (8 ratones por grupo). Los tratamientos comenzaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 75 mm^3 , el día 14 después de la implantación del tumor. Los compuestos de CDN se administraron (25 μg en un volumen total de 40 μl de HBSS) mediante inyección subcutánea en el centro del tumor usando una aguja de calibre 27. Las inyecciones se repitieron cada tres días, para un total de tres inyecciones intratumorales. Los CDN probados fueron [G(3',5')pG(3',5')p] cíclico (CDG); [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (enlace mixto o ML CDG); Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG); [A(3',5')pA(3',5')p] cíclico (CDA); [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (enlace mixto o ML CDA); y Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA).

Como se muestra en la Fig. 18, los derivados ML RR-CDG y ML RR-CDA indujeron una potente eficacia antitumoral, en comparación con las moléculas de dinucleótido cíclico ML CDG cíclico y ML CDA cíclico. La molécula de ML RR-CDA indujo significativamente más rechazo tumoral que el derivado ML CDA ($p = 0,0004$, prueba t del Student), y los ratones del grupo de tumores ML RR-CDG permanecían casi libres de tumor el día 44 después de la implantación del tumor. Estos datos demuestran la potencia mejorada de los derivados ML RR-CDN en comparación con las moléculas de derivados ML CDN y la eficacia antitumoral significativa de las moléculas de ML RR-CDN en el modelo de ratones con melanoma B16.

Para evaluar en mayor profundidad la capacidad de las moléculas derivadas para potenciar la inmunidad antitumoral, se implantaron células de carcinoma de colon CT26 (2×10^5 células en 100 μl de PBS) mediante inyección intravenosa en ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad y se evaluó la supervivencia general. Los compuestos de CDN (25 μg en un volumen total de 100 μl de HBSS) se administraron un día después de la implantación del tumor mediante inyección subcutánea en la base de la cola. Los ratones fueron reforzados con una inyección adicional una semana después para un total de dos vacunas.

Como se muestra en la Fig. 19A, el Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG) indujo tasas de supervivencia significativamente más altas en comparación con la molécula de [G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML CDG) ($p = 0,0018$, prueba de rango logarítmico), y Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) indujo tasas de supervivencia significativamente más altas en comparación con la molécula de [A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML CDA) ($p = 0,0005$, prueba de rango logarítmico). Esto demuestra la eficacia antitumoral significativa de los derivados ML RR-CDN en comparación con las moléculas de derivados ML CDN en un modelo de supervivencia de metástasis pulmonar CT26. Estos resultados demuestran que las moléculas de derivados de CDN pueden administrarse con éxito por vía subcutánea.

Para demostrar que la activación de la sensibilización de linfocitos T de iniciación tumoral y la eficacia antitumoral inducida por las moléculas de derivados de CDN no se limitaba a un solo tipo de tumor y antecedente genético de ratón, se probó la capacidad de los CDN sintéticos para potenciar la inmunidad antitumoral en otros modelos tumorales. Se implantaron por vía subcutánea células de carcinoma de colon CT26 (1×10^5 células en 100 μ l de PBS) o células de carcinoma de mama 4T1 (1×10^5 células en 100 μ l de PBS) en el costado de ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas (8 ratones por grupo). Los tratamientos comenzaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 75 mm³, que fue aproximadamente el día 14 después de la implantación del tumor. Los compuestos Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) o Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG) (25 μ g en un volumen total de 40 μ l de HBSS), o control de vehículo HBSS, y Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) (50 μ g en un volumen total de 40 μ l de HBSS) o control de vehículo HBSS, fueron administrados por inyección subcutánea en el centro del tumor usando una aguja de calibre 27. Las inyecciones se repitieron cada tres días, para un total de tres inyecciones intratumorales.

Como se muestra en la Fig. 19B, ML RR-CDG inhibió completamente el crecimiento tumoral en 7 de los 8 ratones, mientras que ML RR-CDA inhibió completamente el crecimiento tumoral de todos los tumores CT26 establecidos. Como se muestra en la Fig. 19C, el derivado ML RR-CDA inhibió completamente el crecimiento tumoral de todos los tumores de mama 4T1 establecidos. Estos datos demuestran la sorprendente potencia y la eficacia antitumoral duradera de los derivados sintéticos de dinucleótido cíclico Rp,Rp-ditio de enlace mixto (ML RR-CDN) en múltiples modelos tumorales.

Ejemplo 10. La eficacia antitumoral inducida por CDN depende de STING

Para determinar si los efectos de las moléculas derivadas dependen de STING, se implantaron células de melanoma B16 (5×10^4 células en 100 μ l de PBS) en el costado derecho de ratones STING^{-/-} goldenticket hembra de 6-8 semanas de vida o ratones de control C57BL/6 de tipo silvestre (5 ratones por grupo). Los tratamientos comenzaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 75 mm³, el día 14 después de la implantación del tumor. Los compuestos administrados fueron Rp,Rp-ditio-[G(2',5')pG(3',5')p] cíclico (ML RR-CDG) (25 μ g en un volumen total de 40 μ l de HBSS), Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) (50 μ g en un volumen total de 40 μ l de HBSS), el agonista de TLR9 CpG 1668 (50 μ g en un volumen total de 40 μ l de HBSS) o control de vehículo HBSS. Los ratones fueron tratados mediante inyección subcutánea en el centro del tumor usando solo una aguja de calibre 27. Las inyecciones se repitieron cada tres días, para un total de tres inyecciones intratumorales.

Como se muestra en la Fig. 20A, los derivados ML RR-CDN indujeron una inhibición tumoral drástica en ratones C57BL/6 de tipo silvestre en comparación con el control de HBSS, y significativamente más inhibición tumoral que el agonista de TLR9 CpG 1668 ($p = 0,03$, ensayo t de Student). En la Fig. 20B, el crecimiento tumoral no fue inhibido por ML RR-CDG ni por ML RR-CDA, demostrando que la eficacia antitumoral observada en los ratones C57BL/6 de tipo silvestre (Fig. 20A) era completamente dependiente de una vía de señalización STING funcional. Por el contrario, el crecimiento tumoral de CpG 1668 fue similar tanto en ratones de tipo silvestre como en ratones STING^{-/-}, en comparación con el control de HBSS ($p = 0,03$, ensayo t de Student), demostrando que la acción de este compuesto es independiente de STING.

Ejemplo 11. Los derivados de CDN inducen inmunidad duradera y eficaz contra los linfocitos T específicos del tumor

Para determinar si las moléculas de CDN derivadas sintéticas producen inmunidad duradera y eficaz contra los linfocitos T específicos del tumor, se implantaron células de carcinoma de colon CT26 (1×10^5 células en 100 μ l de PBS) en ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas (8 ratones por grupo). Los ratones fueron tratados con compuesto de Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) (50 μ g en un volumen total de 40 μ l de HBSS) o control de vehículo HBSS, y se controló el crecimiento tumoral según el ejemplo anterior. Los ratones se desangraron el día 18 después de la implantación del tumor y se aislaron las PBMC mediante gradiente de Ficoll (Miltényi Biotech). Se estimularon 5×10^4 PBMC durante la noche en un ensayo ELISpot de IFN γ con medio solo (sin estimulación) o con 1 μ M del antígeno peptídico AH1 endógeno de rechazo tumoral restringido a H-2 L^d en presencia de 1×10^5 esplenocitos sin tratamiento previo como células alimentadoras. Las placas de ELISpot de IFN- γ se desarrollaron y se cuantificaron usando un lector de placas CTL y el software ImmunoSpot. El día 55 después de la implantación del tumor, se implantaron células tumorales CT26 o 4T1 (ambas 1×10^5 células en 100 μ l de PBS) en ratones supervivientes y ratones de control sin tratamiento previo de la misma edad en el costado contralateral (4 ratones por grupo), y se controló el crecimiento tumoral.

Como se muestra en la Fig. 21A, Todos los ratones tratados con ML RR-CDA rechazaron el crecimiento de los carcinomas de colon CT26 establecidos. Para demostrar que el efecto fue mediado por la inducción mediada por CDN de una respuesta inmunitaria adaptativa de linfocitos T, se evaluaron las PBMC el día 18 después de la inducción tumoral para determinar la producción de IFN- γ mediante el ensayo ELISpot, en respuesta a la estimulación con el antígeno tumoral endógeno AH1. Como se muestra en la Fig. 21B, las PBMC aisladas de ratones tratados con ML RR-CDA generaron un nivel de IFN- γ significativamente más alto en respuesta a la estimulación del péptido AH1, en comparación con el grupo de control tratado con HBSS ($p = 0,003$, ensayo t de Student). Además, en la Fig. 21C, los ratones supervivientes que se volvieron a exponer a un tumor contralateral presentaron protección completa contra el mismo tipo de tumor CT26, sin inhibir el crecimiento del tipo de tumor 4T1. Estos datos demuestran la capacidad de ML RR-CDA para generar una inmunidad antitumoral mediada por linfocitos T específicos del tumor duradera y eficaz que produce tanto el rechazo del tumor tratado como una población estable de linfocitos T de memoria específicos del antígeno tumoral que puede rechazar la exposición tumoral.

Para determinar si las moléculas derivadas de CDN inducen inmunidad antitumoral eficaz y duradera en un modelo de tumor alternativo, se implantaron en ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas (8 ratones por grupo) células de carcinoma de mama 4T1 (1×10^5 células en 100 μ l de PBS). Los ratones fueron tratados con compuesto de Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p]cíclico (ML RR-CDA) (50 μ g en un volumen total de 40 μ l de HBSS) o control de vehículo HBSS, según el experimento anterior. El día 35 después de la implantación del tumor, se implantaron células tumorales CT26 o 4T1 (ambas 1×10^5 células en 100 μ l de PBS) en ratones supervivientes y ratones de control sin tratamiento previo de la misma edad en el costado contralateral (4 ratones por grupo), y se controló el crecimiento tumoral.

Como se muestra en la Fig. 22A, y se ha demostrado previamente, el tratamiento con ML RR-CDA inhibió completamente el crecimiento tumoral de carcinomas de mama 4T1 establecidos. Además, en la Fig. 22B, la repetición de la exposición a células tumorales 4T1 en el costado contralateral indujo una protección completa. La repetición de la exposición al tumor CT26 más inmunogénico también generó protección completa, indicando que estos tumores comparten antígenos tumorales similares, proporcionando aún más pruebas de la potencia de las moléculas derivadas de CDN sintéticas.

Ejemplo 12. La activación de la sensibilización con linfocitos T de iniciación tumoral mediante la inyección intratumoral con derivados sintéticos de CDN induce la inhibición del tumor abscopal.

Los ejemplos mostrados en el presente documento demuestran que la inyección intratumoral (IT) de derivados sintéticos de CDN produce una destrucción tumoral sorprendente y duradera, debido a la activación dependiente de STING de las citocinas proinflamatorias, para facilitar el desarrollo de inmunidad eficaz de linfocitos T específicos del tumor. La inducción dependiente de STING de la inmunidad de los linfocitos T específicos del tumor protege a los animales contra la exposición posterior al tumor autólogo. Será evidente para los expertos en la materia que el cáncer avanzado es metastásico y que, para ser eficaces, las terapias deben inhibir el crecimiento de masas distales. El tratamiento de una lesión o de lesiones seleccionadas que inhibe la excrecencia tumoral de las masas tumorales distales no tratadas se conoce como efecto abscopal. Para probar si la inyección IT de un tumor seleccionado con moléculas derivadas de CDN sintéticas inhibió la excrecencia tumoral de un tumor distal no tratado, (A) se implantaron por vía subcutánea células de carcinoma de colon CT26 (1×10^5 células en 100 μ l de PBS) o (B) células de carcinoma de mama 4T1 (1×10^5 células en 100 μ l de PBS) en el costado contralateral de ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas (8 ratones por grupo). Los tratamientos comenzaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 75 mm³, el día 13 después de la implantación del tumor. El compuesto de Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p]cíclico (ML RR-CDA) (50 μ g en un volumen total de 40 μ l de HBSS) o control de vehículo HBSS, se administró mediante inyección subcutánea en el centro del tumor primario (lado derecho) solo con una aguja de calibre 27. Las inyecciones se repitieron cada tres días, para un total de tres inyecciones intratumorales.

Como se muestra en la Fig. 23, el compuesto Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p] cíclico (ML RR-CDA) indujo la inhibición completa del tumor primario tratado en animales portadores de tumores tanto CT26 (Fig. 23A) como 4T1 (Fig. 23B), en comparación con el control del vehículo HBSS. Además, el crecimiento del tumor contralateral (no tratado) en ambos modelos tumorales también se inhibió significativamente, en comparación con los controles de HBSS (Fig. 23A, $p = 0,0011$, Fig. 23B, $p = 0,0019$, ensayo t de Student). Estos datos demuestran la eficacia antitumoral significativa del derivado ML RR-CDA cuando se inyecta en el tumor primario, así como sus importantes efectos inmunitarios antitumorales abscopales.

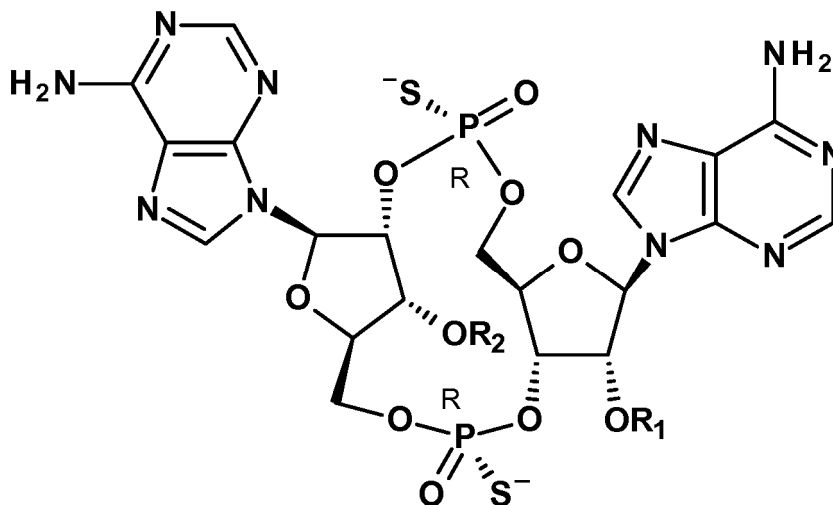
Para determinar si las moléculas derivadas de CDN sintéticas potencian la inmunidad antitumoral abscopal en un modelo tumoral alternativo y otros antecedentes genéticos de ratón, se implantaron en ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas (8 ratones por grupo) células de melanoma B16 (5×10^4 células en 100 μ l de PBS) en el costado derecho. Una semana después, se implantaron en los ratones por vía intravenosa 1×10^5 células de melanoma B16 para colonizar el pulmón, junto con un grupo de ratones de control sin tratamiento previo de la misma edad. Cuando el tumor subcutáneo del costado hubo alcanzado aproximadamente 75 mm³ el día 13, los ratones fueron tratados por vía intratumoral con Rp,Rp-ditio-[A(2',5')pA(3',5')p]cíclico (ML RR-CDA) (50 μ g en un volumen total de 40 μ l de HBSS) o control de vehículo HBSS, para tres inyecciones según el protocolo anterior. El día 28 después de la implantación del tumor subcutáneo (día 21 después de la implantación i.v.), se sacrificaron los ratones, y se recogieron y fijaron los

pulmones (formalina tamponada neutra al 10 %), y se contó el número de ganglios tumorales de pulmón usando un microscopio de disección.

- 5 Como se muestra en la Fig. 24A, y en experimentos anteriores, el tratamiento con ML RR-CDA inhibió significativamente el crecimiento tumoral del tumor primario del costado, en comparación con el grupo de control de HBSS ($p < 0,001$, ensayo t de Student). Además, en la Fig. 24B y según lo representado en la Fig. 24C, el tratamiento con el derivado de CDN inhibió significativamente el crecimiento de los ganglios tumorales distales del pulmón, en comparación con los grupos de tumores de HBSS y sin tratamiento previo (solo i.v.). Los resultados mostrados en el presente documento demuestran que la inyección intratumoral (IT) de derivados sintéticos de CDN produce un efecto antitumoral abscopal, como lo demuestra la destrucción del tumor tratado, debido a la activación dependiente de
- 10 STING de las citocinas proinflamatorias y al desarrollo de una inmunidad eficaz de linfocitos T específicos del tumor, que luego inhibe la excrecencia de tumores distales no tratados.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



donde R_1 y R_2 son cada uno H, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende un vehículo de administración que potencia la captación celular y/o la estabilidad del compuesto.

4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo de administración comprende uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en lípidos, vesículas multilamelares reticuladas entre capas, nanopartículas o micropartículas biodegradables a base de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) [PLGA] o a base de poli-anhídrido, y bicapas lipídicas soportadas por partículas nanoporosas.

5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende además un antagonista de CTLA-4, un agonista de TLR, CpG, monofosforil lípido A y/o una célula tumoral inactivada que expresa y secreta una o más citocinas que estimulan la inducción, el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas.

6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la célula tumoral inactivada expresa y secreta GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70 o ligando FLT-3.

7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende además uno o más antígenos seleccionados con el fin de inducir una respuesta inmunitaria contra el/los antígeno/s cuando la composición se administra a un individuo.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 para su uso en un método de tratamiento.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 para su uso en un método de tratamiento de un individuo que padece cáncer.

10. Un compuesto o una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9 en un método de tratamiento de un individuo que padece un cáncer seleccionado del grupo que consiste en:

un cáncer colorrectal, un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer de hígado, un cáncer de estómago, un sarcoma, una leucemia, un linfoma, un mieloma múltiple, un cáncer de ovario, un cáncer uterino, un cáncer de mama, un melanoma, un cáncer de próstata, un carcinoma pancreático, un carcinoma renal, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer cervical.

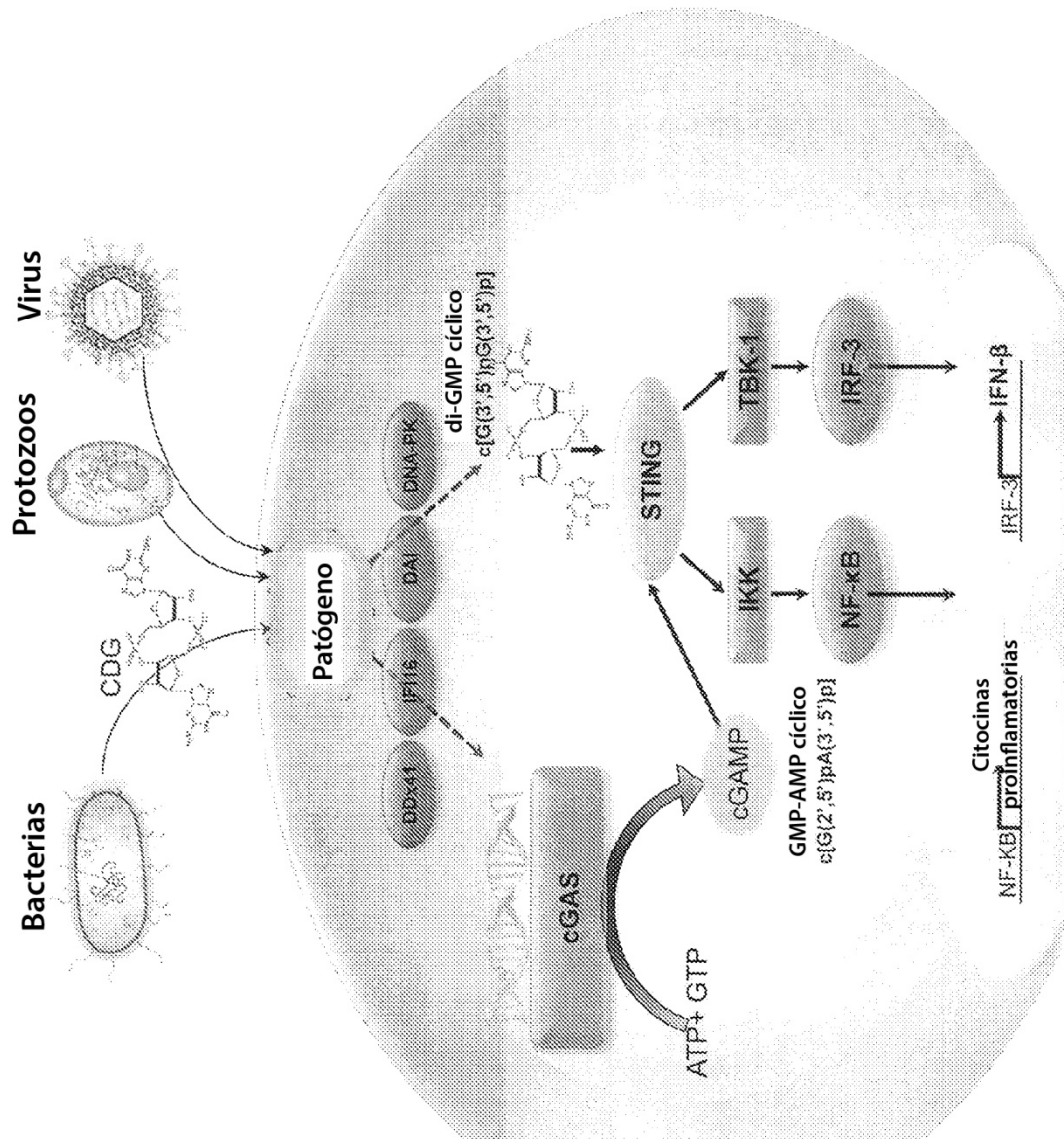
11. Un compuesto o una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 en un método de tratamiento, en donde dicho tratamiento comprende:

inducir una respuesta inmunitaria en el individuo;

inducir la producción de interferón de tipo I dependiente de STING en el individuo;

- administrar dicho compuesto o dicha composición al individuo, en donde el individuo expresa un antígeno de cáncer, antes o después de una terapia primaria administrada para eliminar o destruir células cancerosas que expresan dicho antígeno de cáncer en el individuo;
- 5 administrar por vía parenteral dicho compuesto o dicha composición al individuo, en donde el individuo padece cáncer; o
- administrar dicho compuesto o dicha composición junto con uno o más anticuerpos terapéuticos que inducen citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo con el fin de estimular la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo en el individuo.
- 10 12. Un compuesto o una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el compuesto o la composición se administran tras la terapia primaria.
13. Un compuesto o una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde la terapia primaria comprende cirugía para eliminar las células cancerosas de un mamífero, radioterapia para destruir
- 15 las células cancerosas del mamífero, o cirugía y radioterapia.
14. Un compuesto o una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la administración parenteral es subcutánea, intramuscular o intradérmica, y opcionalmente, directamente en una masa tumoral.
- 20 15. Un compuesto o una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el método comprende además administrar al mamífero uno o más de entre un antagonista de CTLA-4, un antagonista de la vía PD-1, un agonista de TLR o uno o más anticuerpos terapéuticos.

FIG. 1



a) $\text{pH} \sim 7$, TEA , H_2O ; b) tBuNH_2 ; c) DCM/AgNO_3 ; d) pyr ; e) BuOOH ($\text{X}_1 = \text{O}$) or DDTT ($\text{X}_1 = \text{S}$); f) DCM/AgNO_3 ; g) DMOCP ; h) $\text{I}_2/\text{H}_2\text{O}$ ($\text{X}_2 = \text{O}$) or $3\text{-H-1,2-benzodithiol-3-one}$ ($\text{X}_2 = \text{S}$); i) SiO_2 ($\text{X}_2 = \text{S}$); j) AWA ; k) HPLC prep ; l) TEA ; m) H_2O ; n) $\text{desalination in SepPak}$; o) interconversion

FIG. 2B

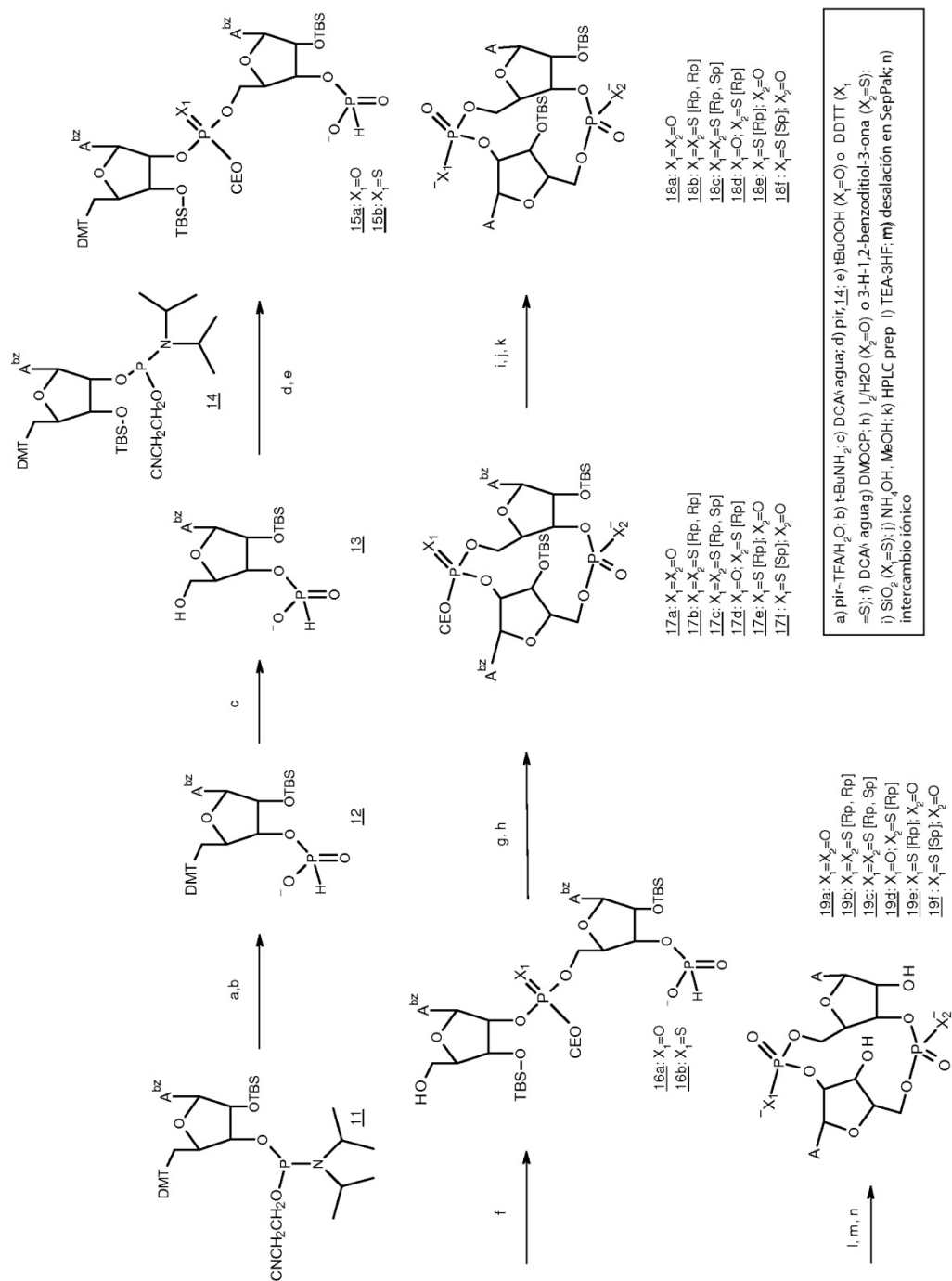
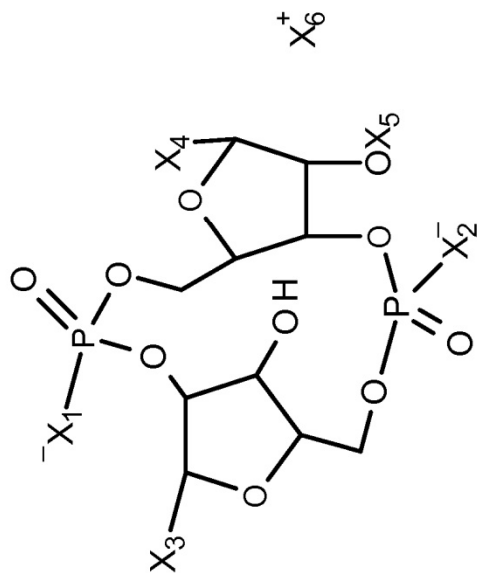
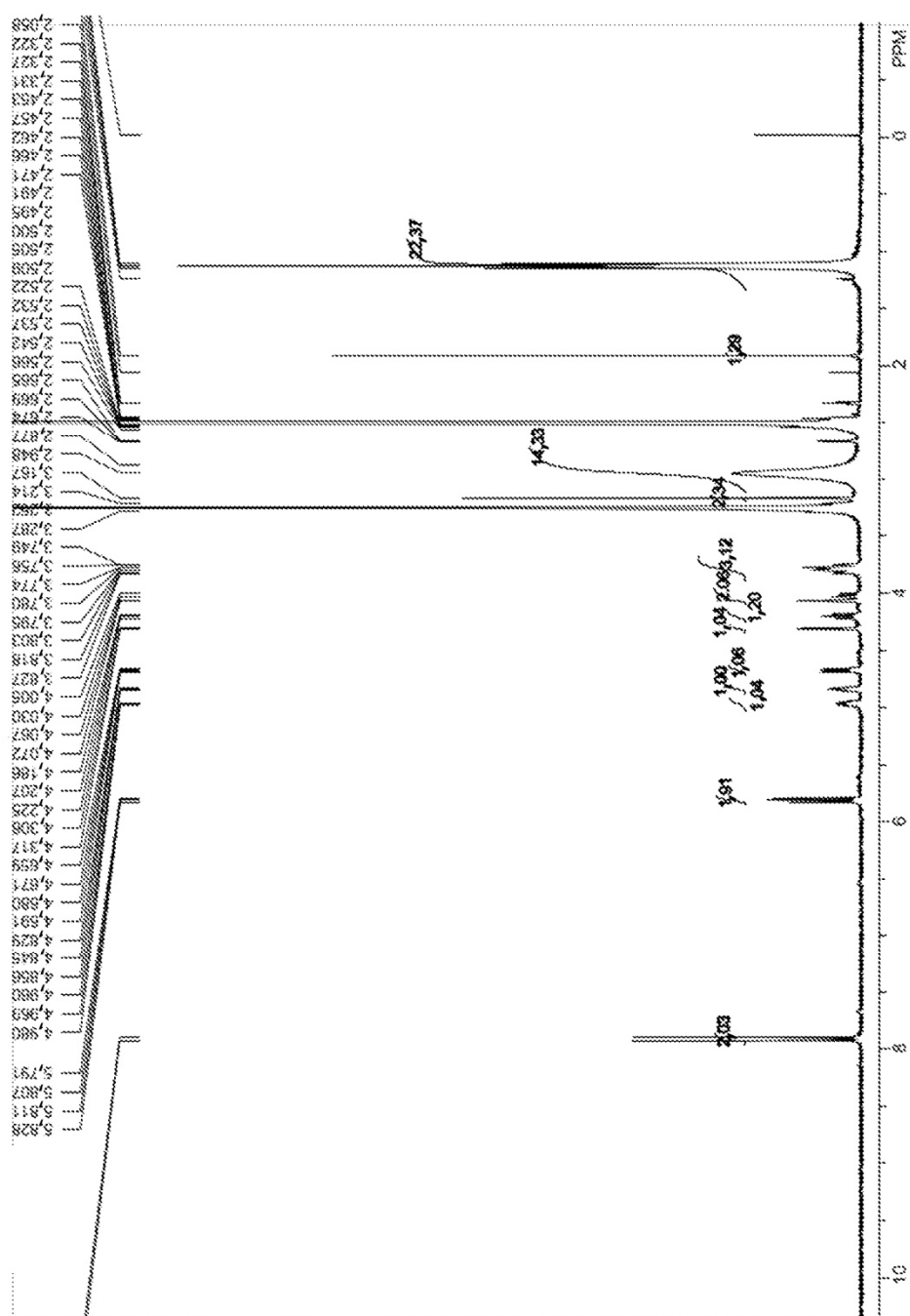
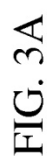


FIG. 2C



- 10) $X_1 = X_2 = O$; $X_3 = G$; $X_4 = G$; $X_5 = CO(CH_2)_{12}CH_3$; $X_6 = 2TEAH$
- 20) $X_1 = X_2 = S$ [Rp, Rp]; $X_3 = G$; $X_4 = A$; $X_5 = H$; $X_6 = 2TEAH$
- 21) $X_1 = X_2 = S$ [Rp, Rp]; $X_3 = A$; $X_4 = A$; $X_5 = H$; $X_6 = 2Na$
- 22) $X_1 = X_2 = S$ [Rp, Rp]; $X_3 = A$; $X_4 = A$; $X_5 = H$; $X_6 = 2NH_4$
- 23) $X_1 = X_2 = O$; $X_3 = G$; $X_4 = A$; $X_5 = H$; $X_6 = 2TEAH$



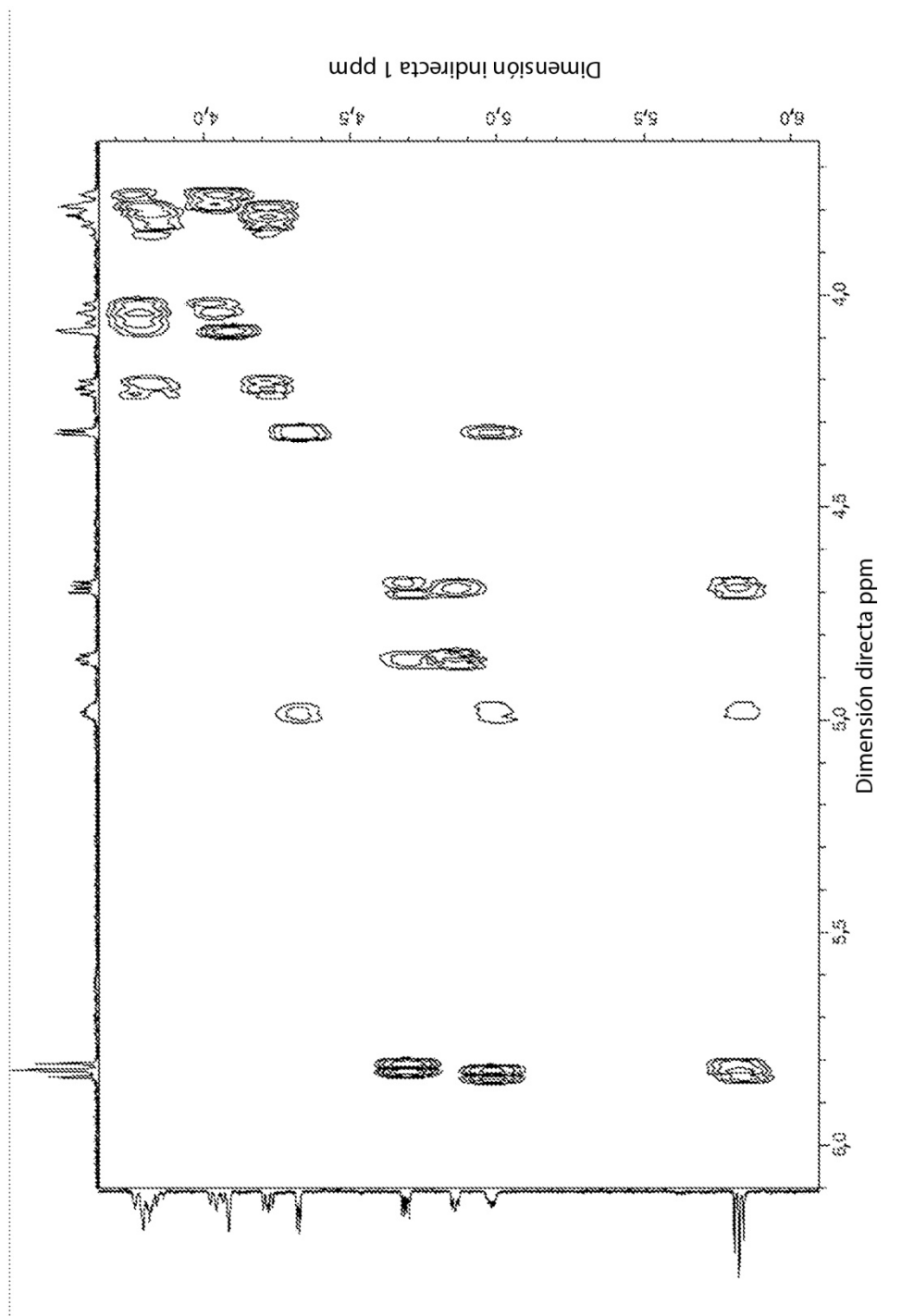


FIG. 3C

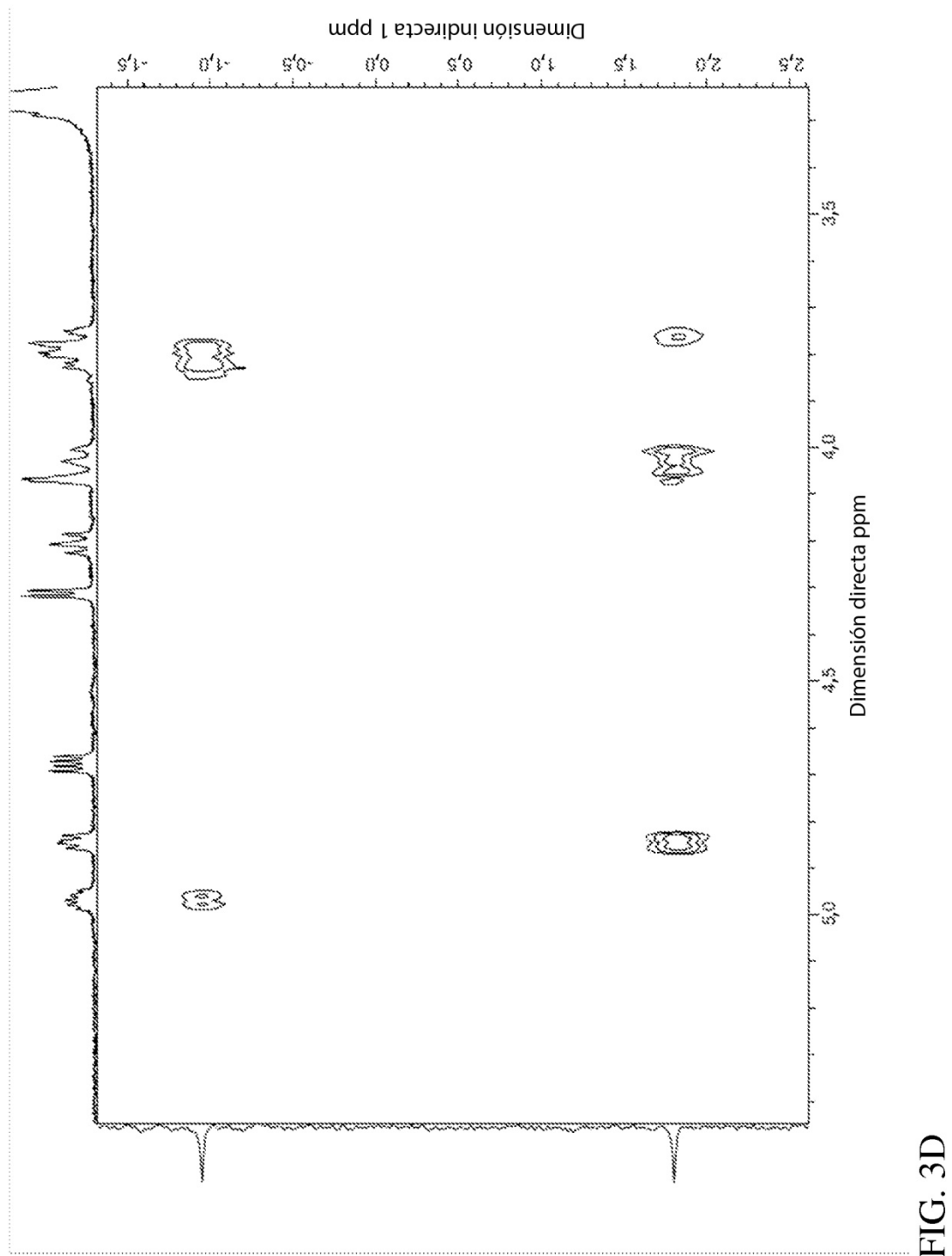
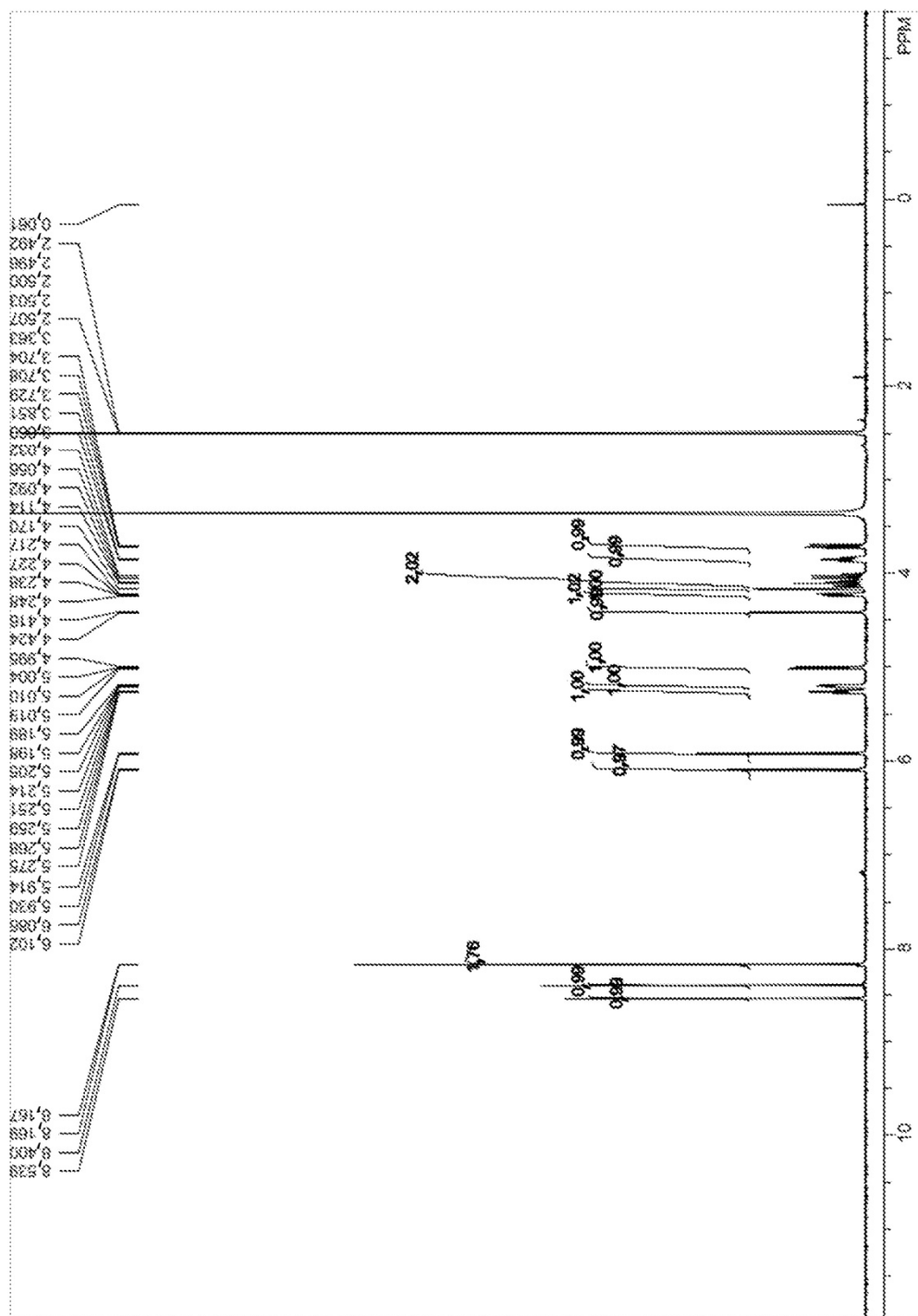
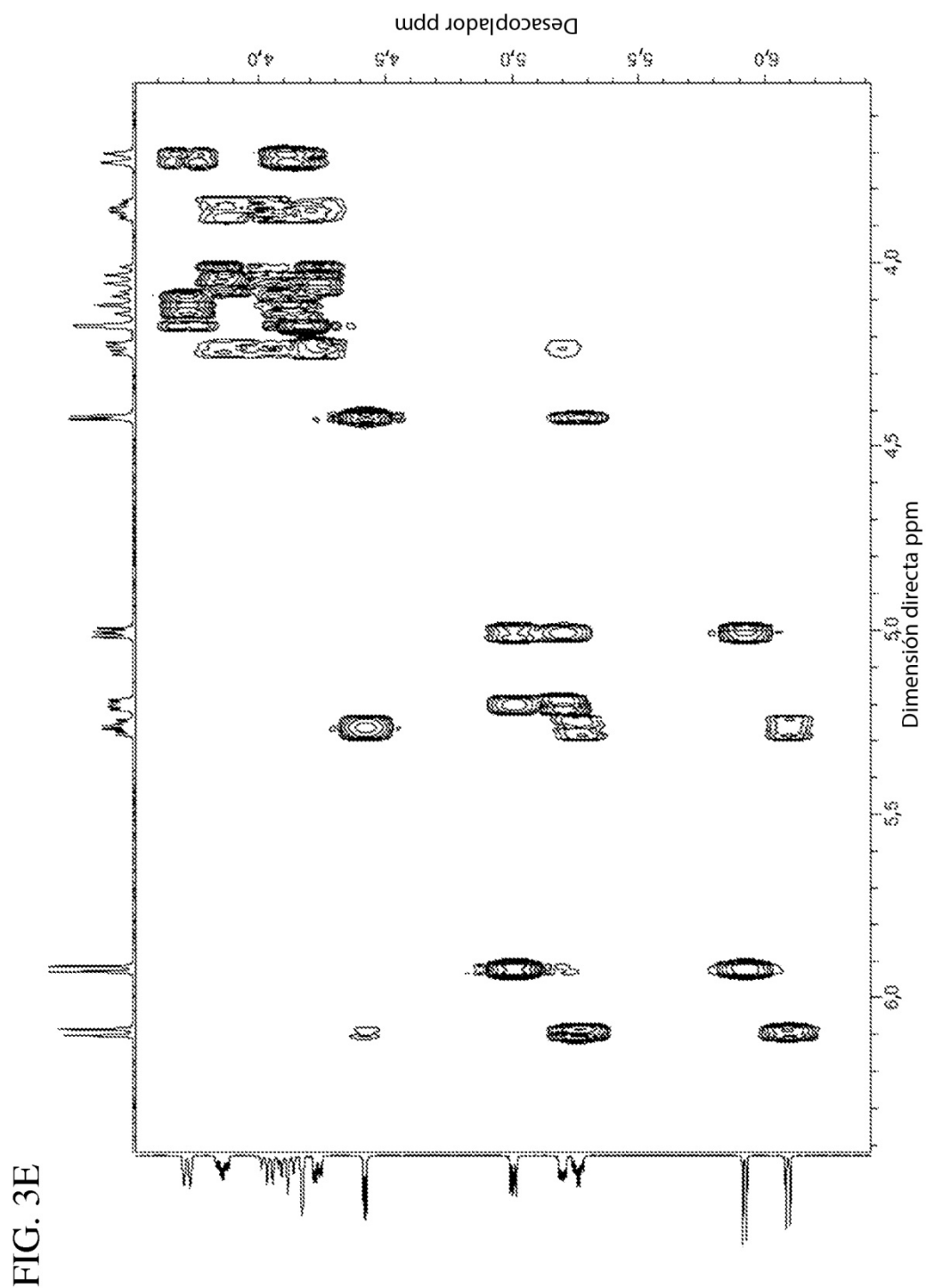


FIG. 3D





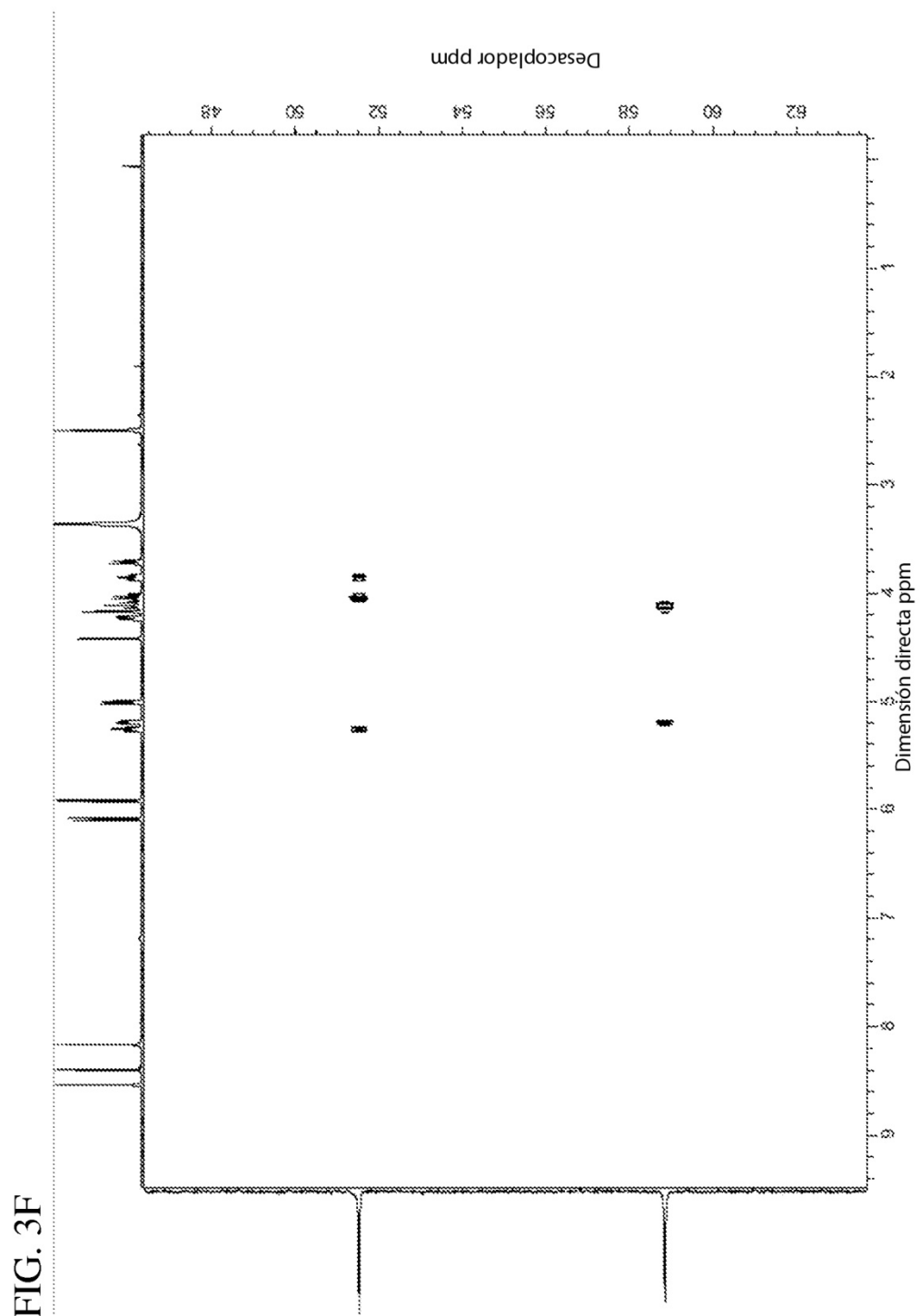


FIG. 3G

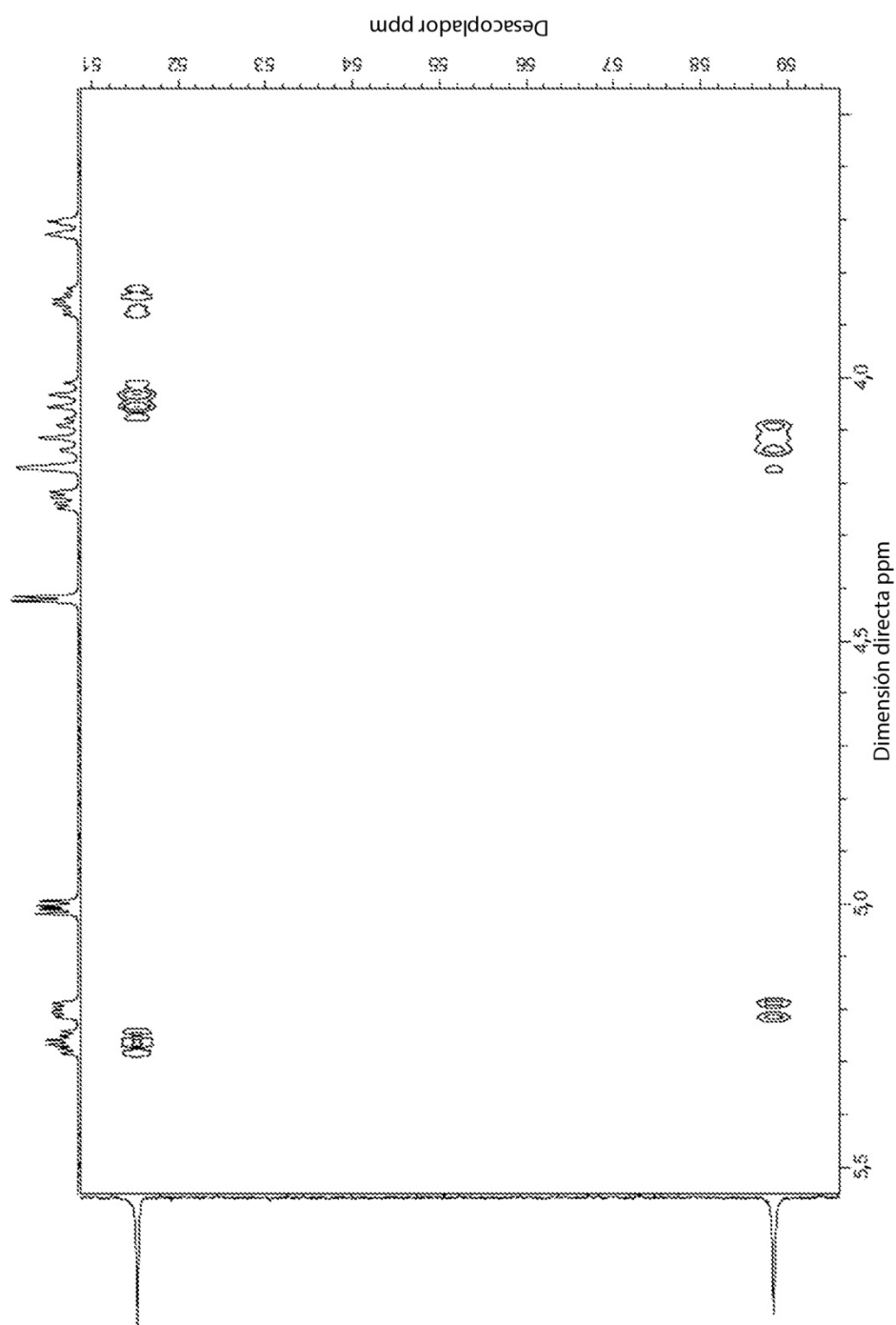
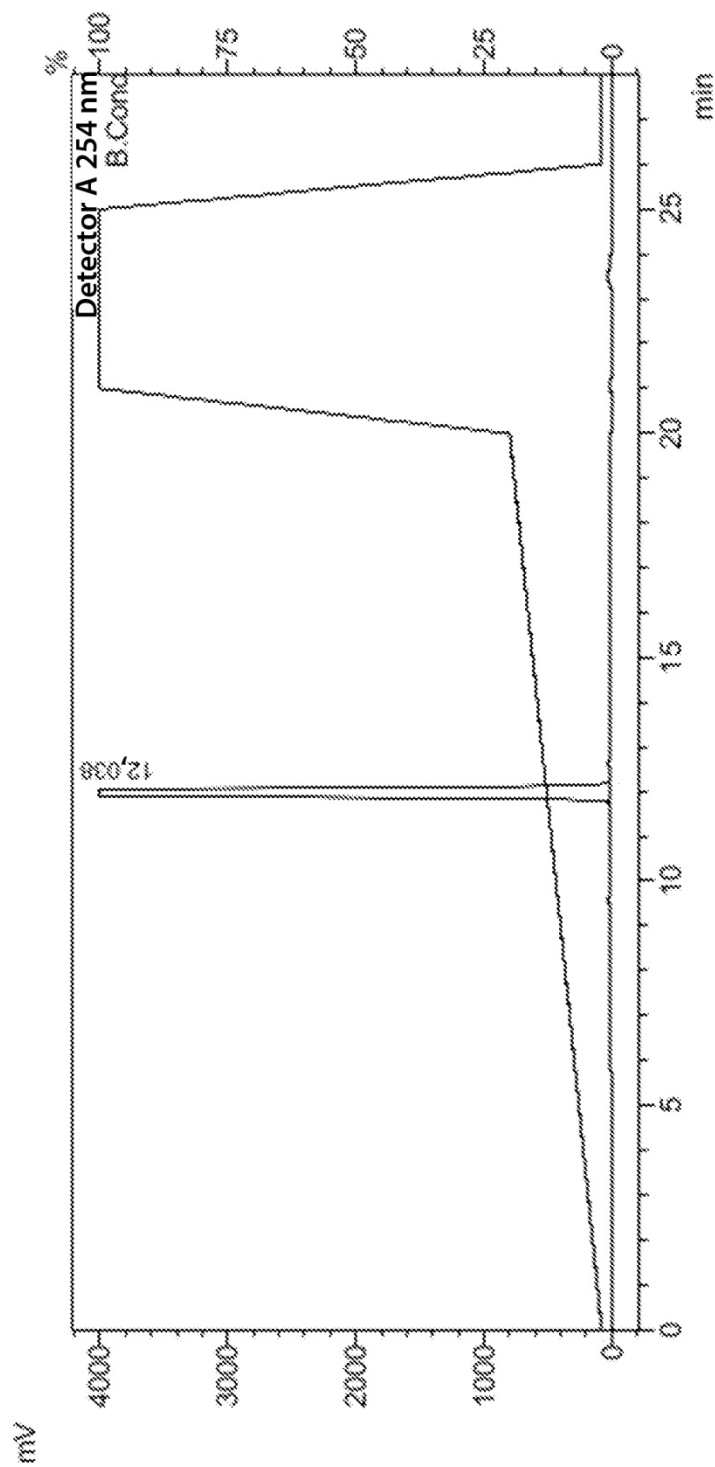


FIG. 3H



<Tabla de máximos>

Detector A 254 nm			
Máximo n.º	Tiempo de ret.	Área	% de área
1	12,038	57113226	100,000
Total		57113226	100,000

FIG.4

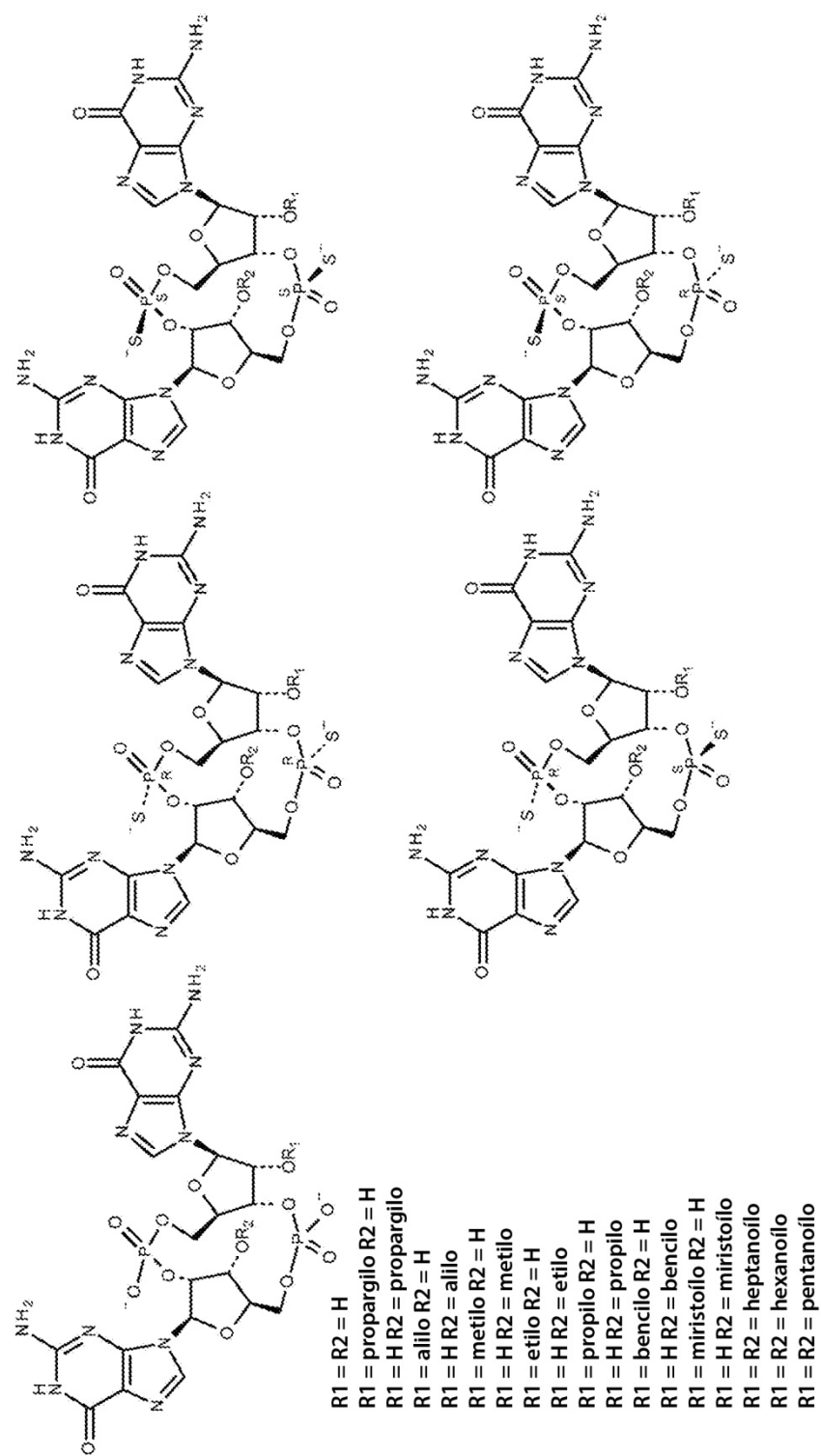


FIG. 5

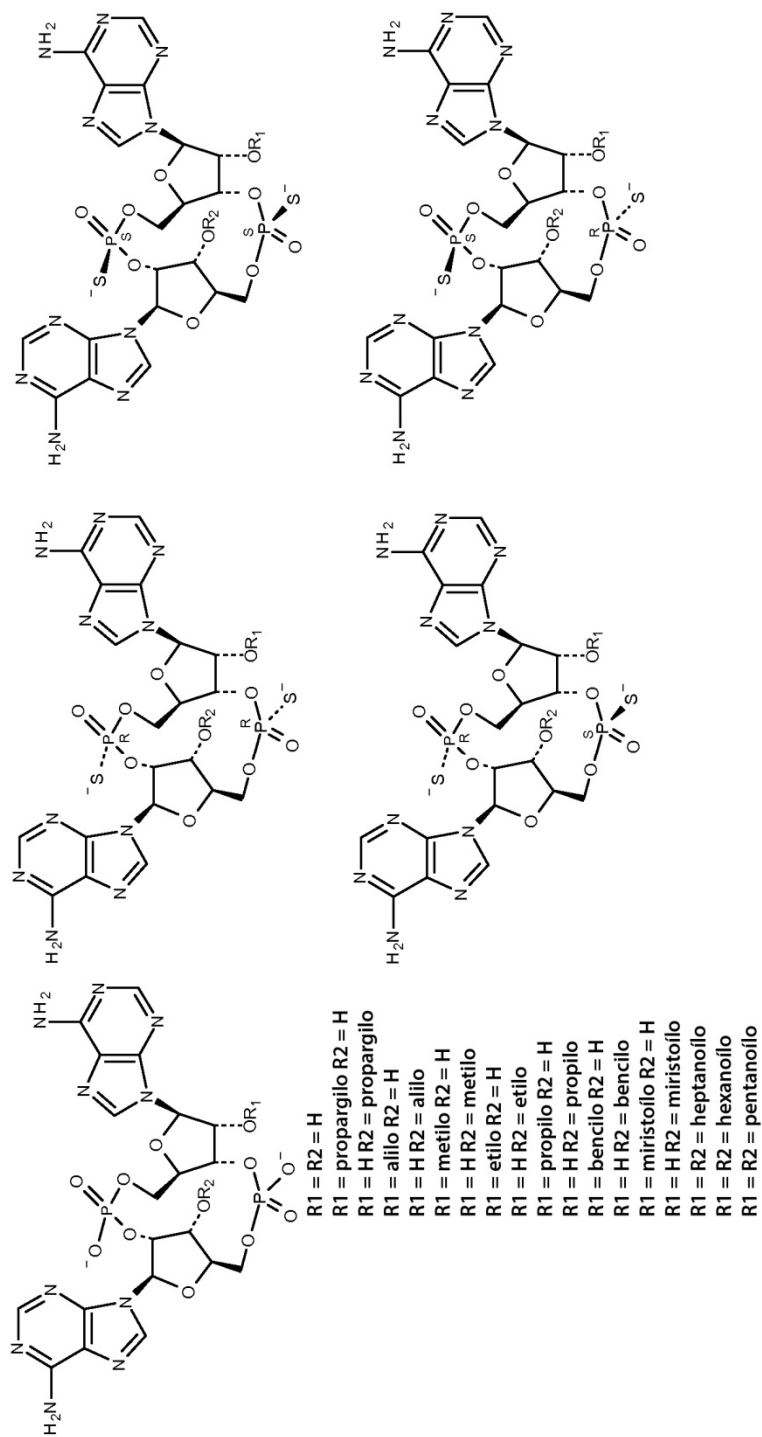


FIG. 6

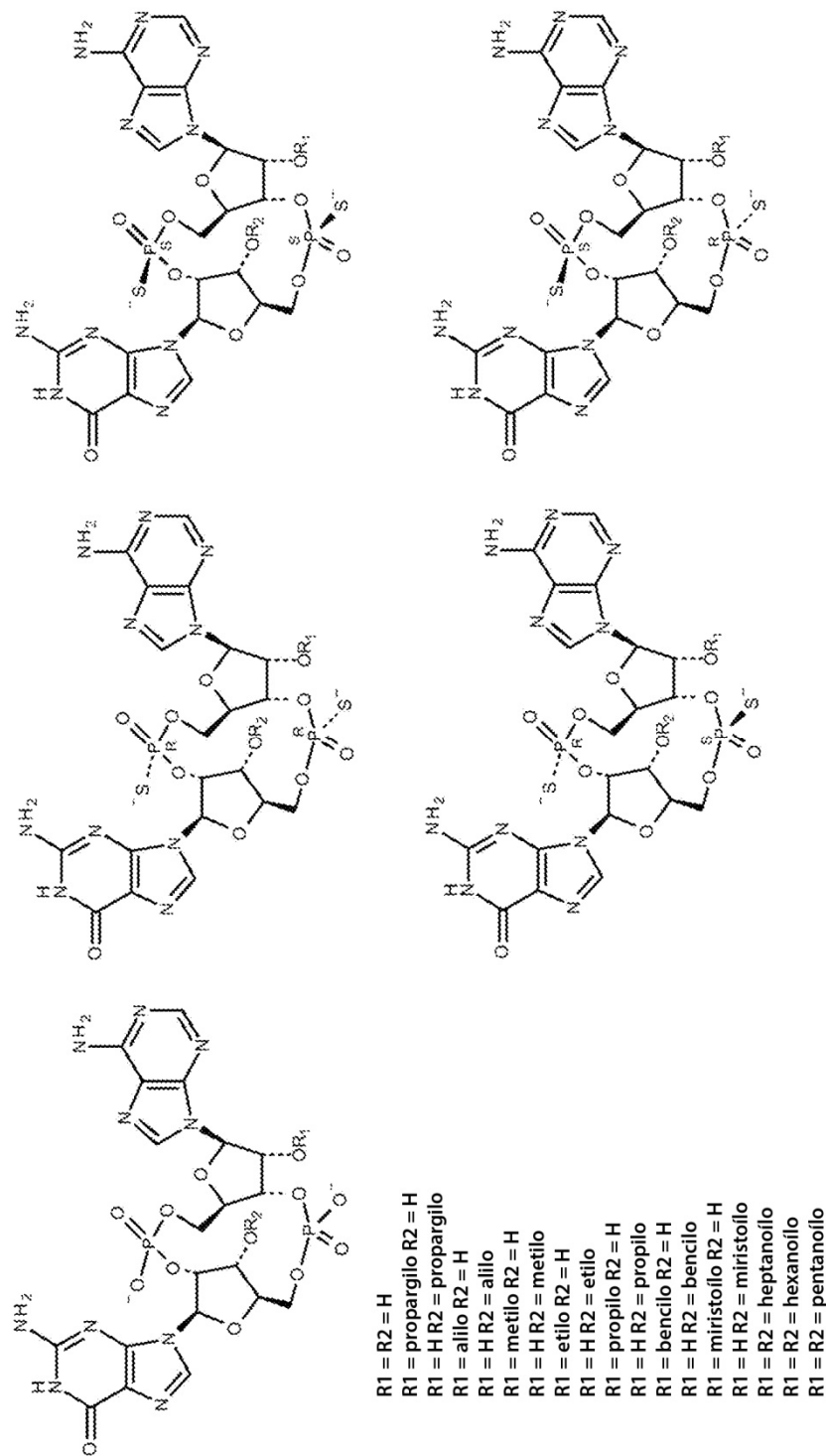


FIG. 7

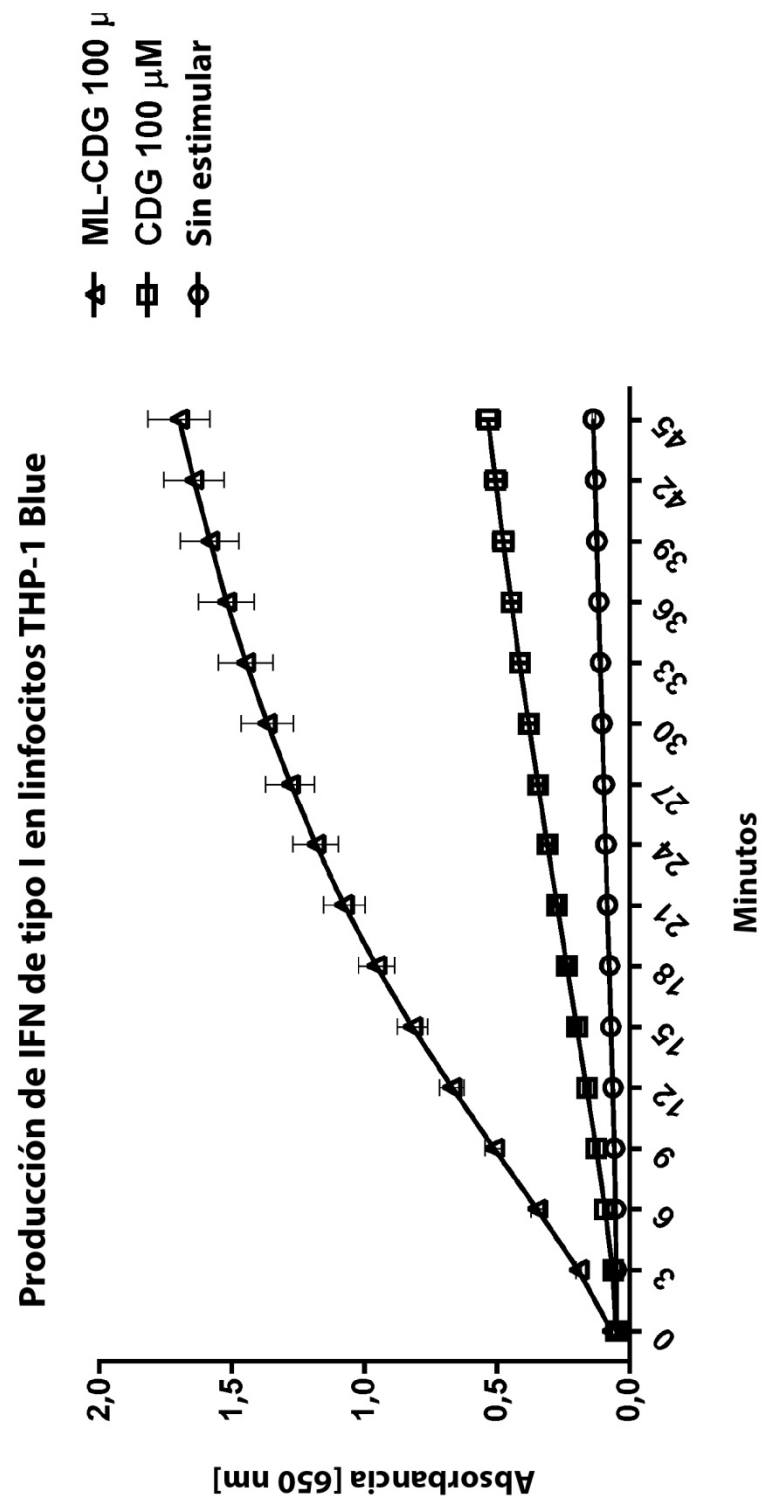


FIG. 8

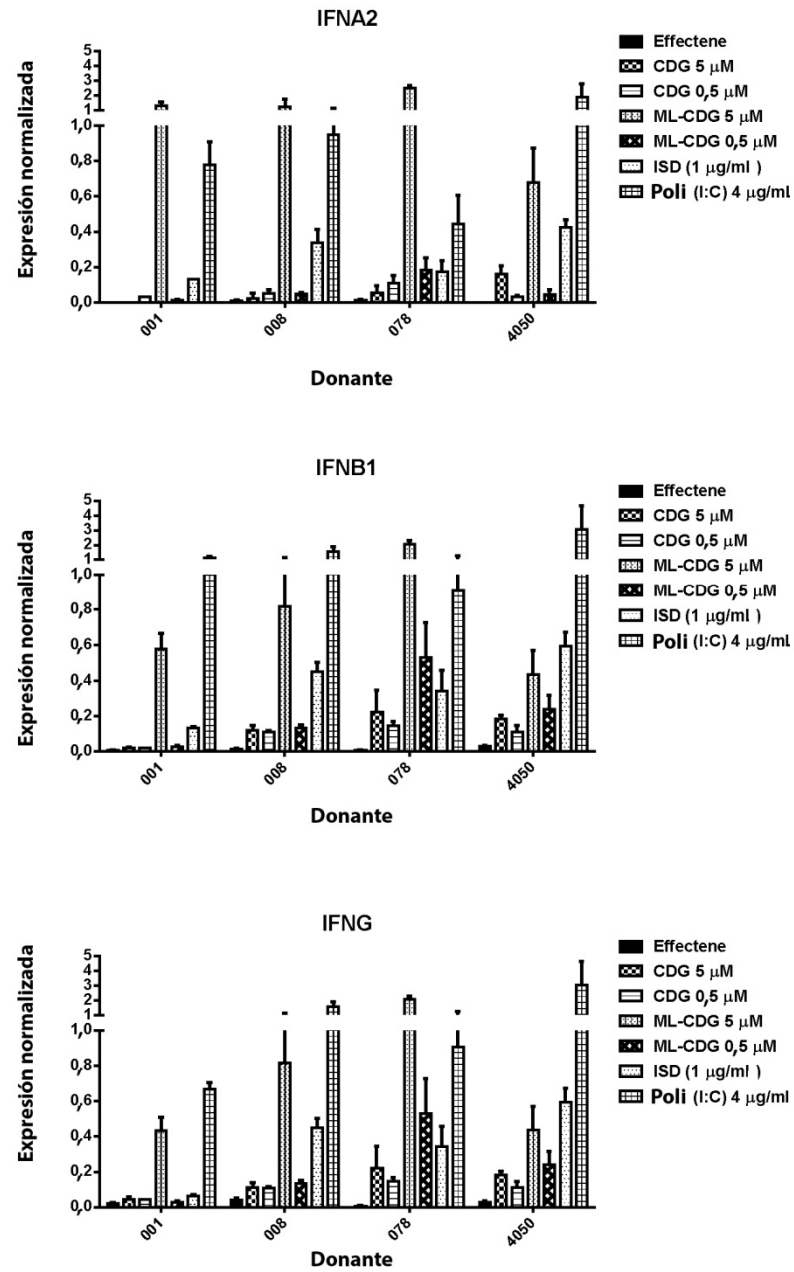


FIG. 9(a)

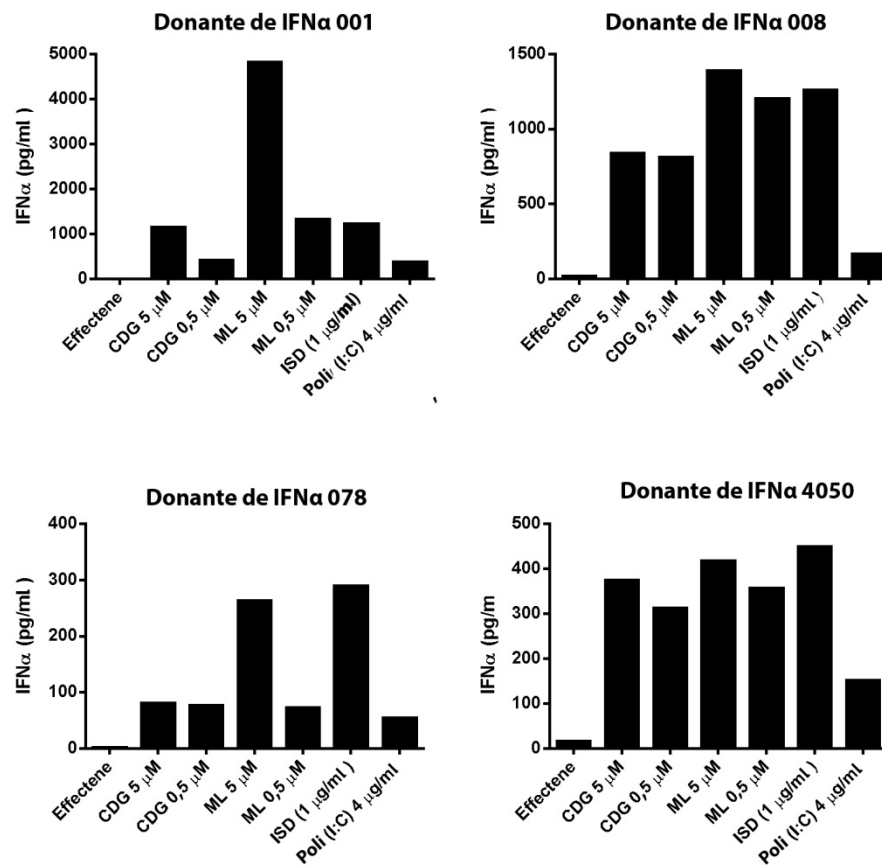


FIG. 9(b)

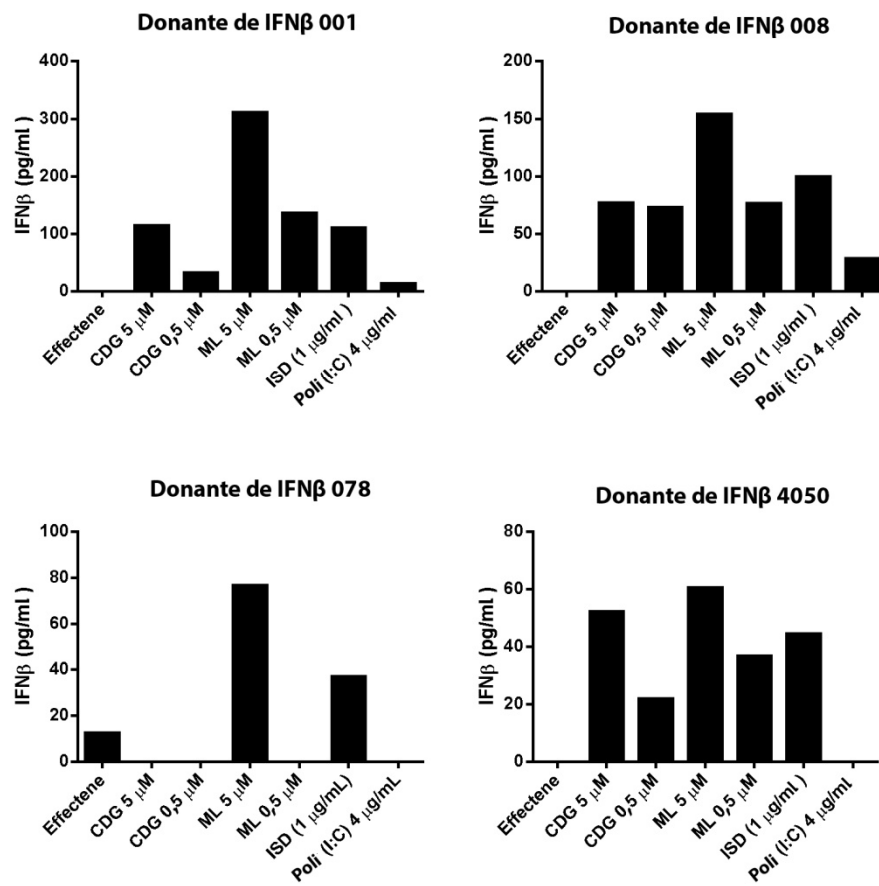


FIG. 9(c)

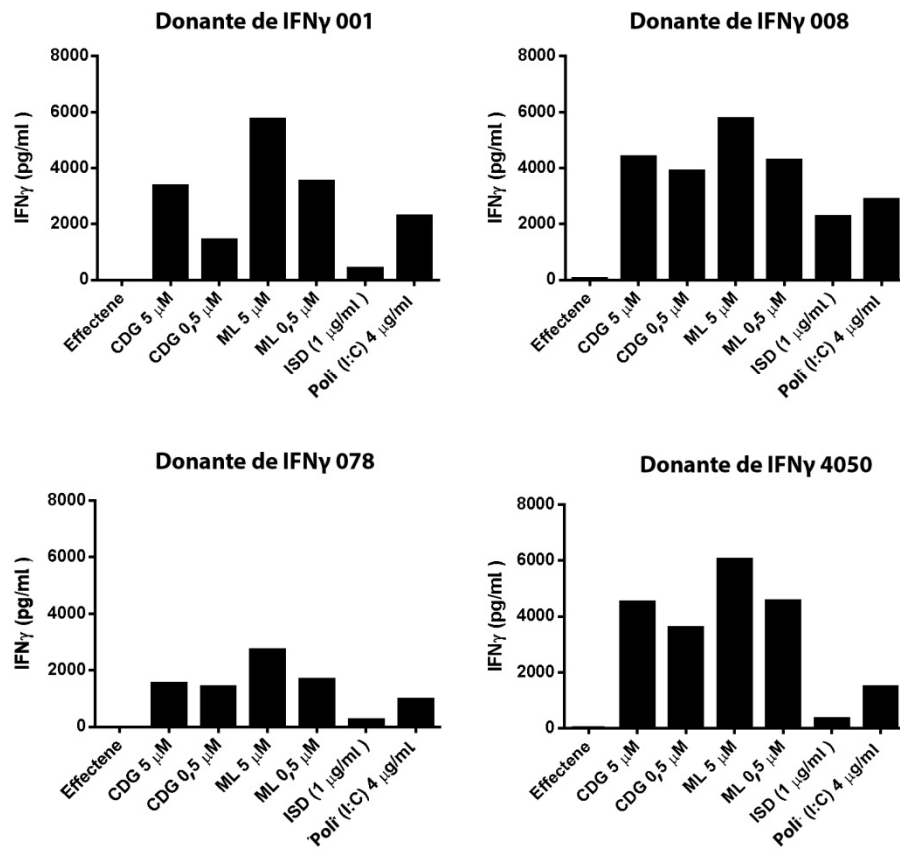


FIG. 10

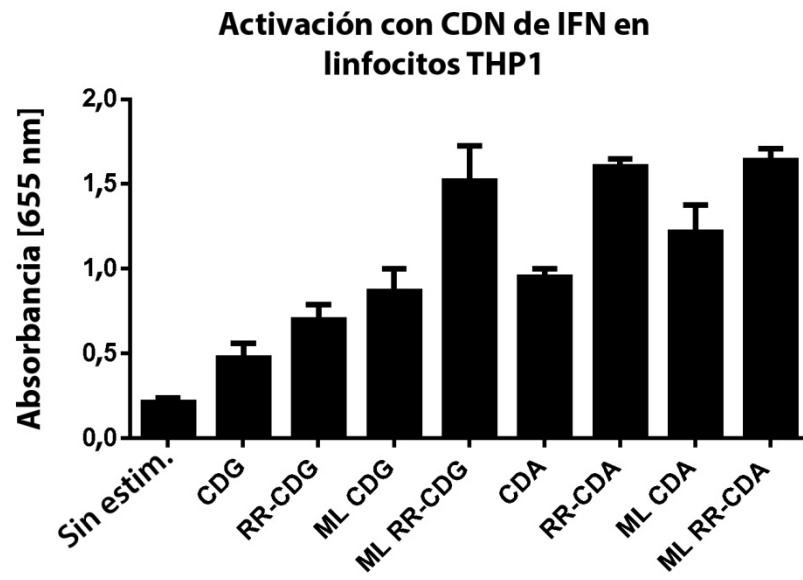


FIG. 11A

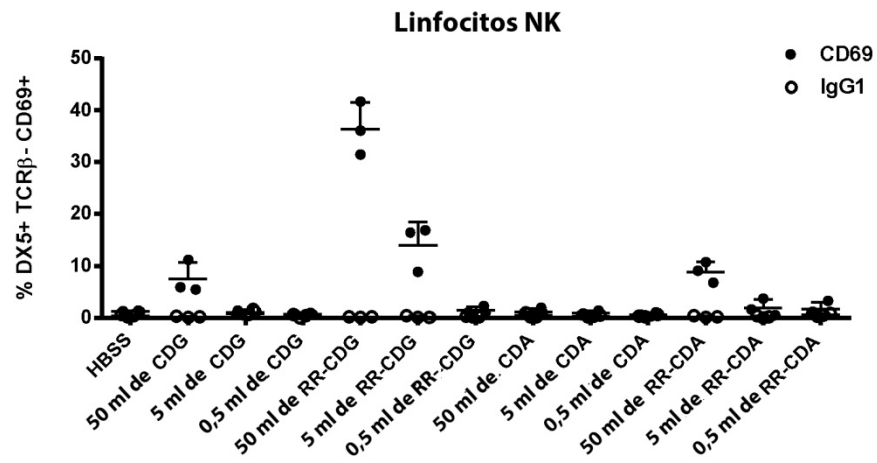


FIG. 11B

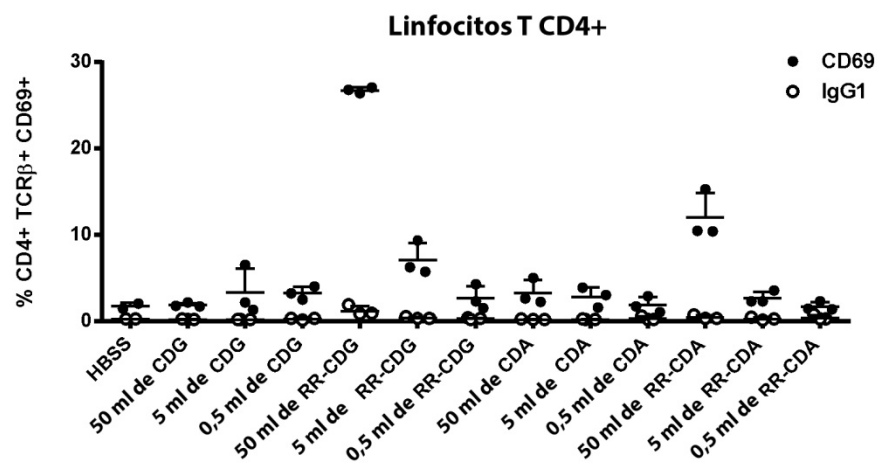


FIG. 11C

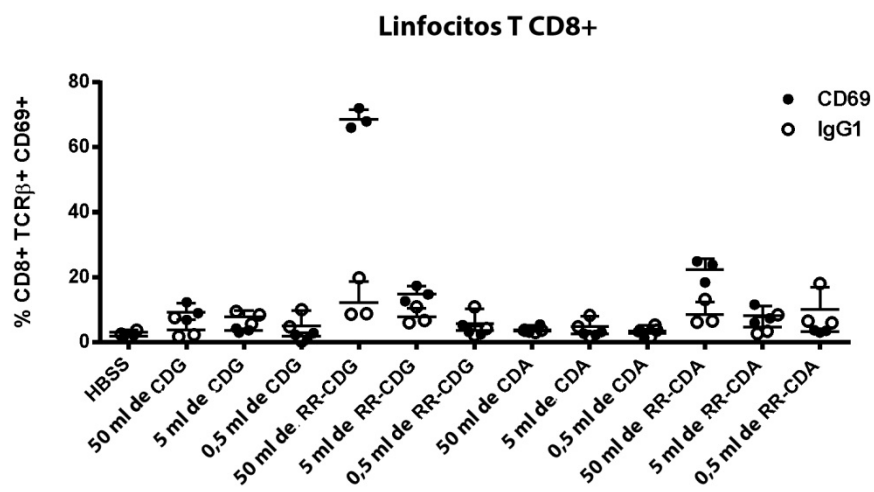


FIG. 12

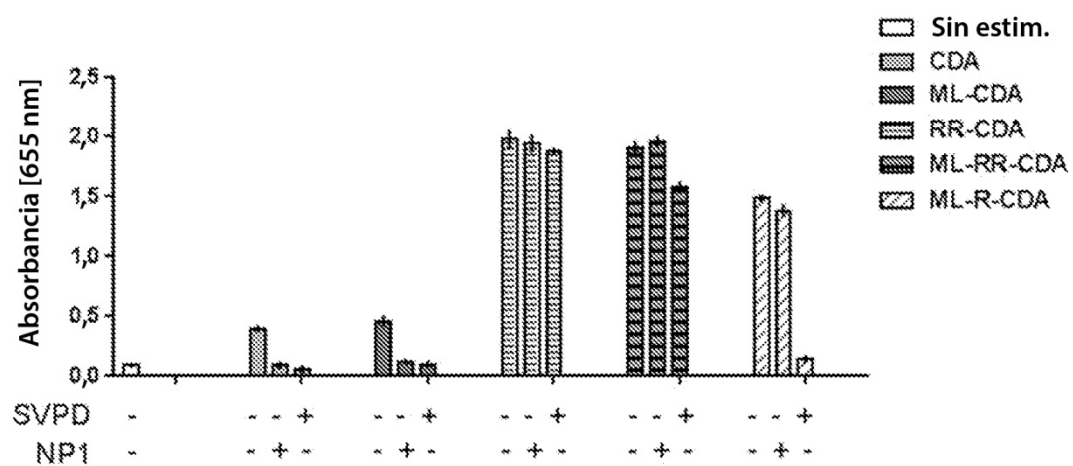


FIG. 13



FIG. 14

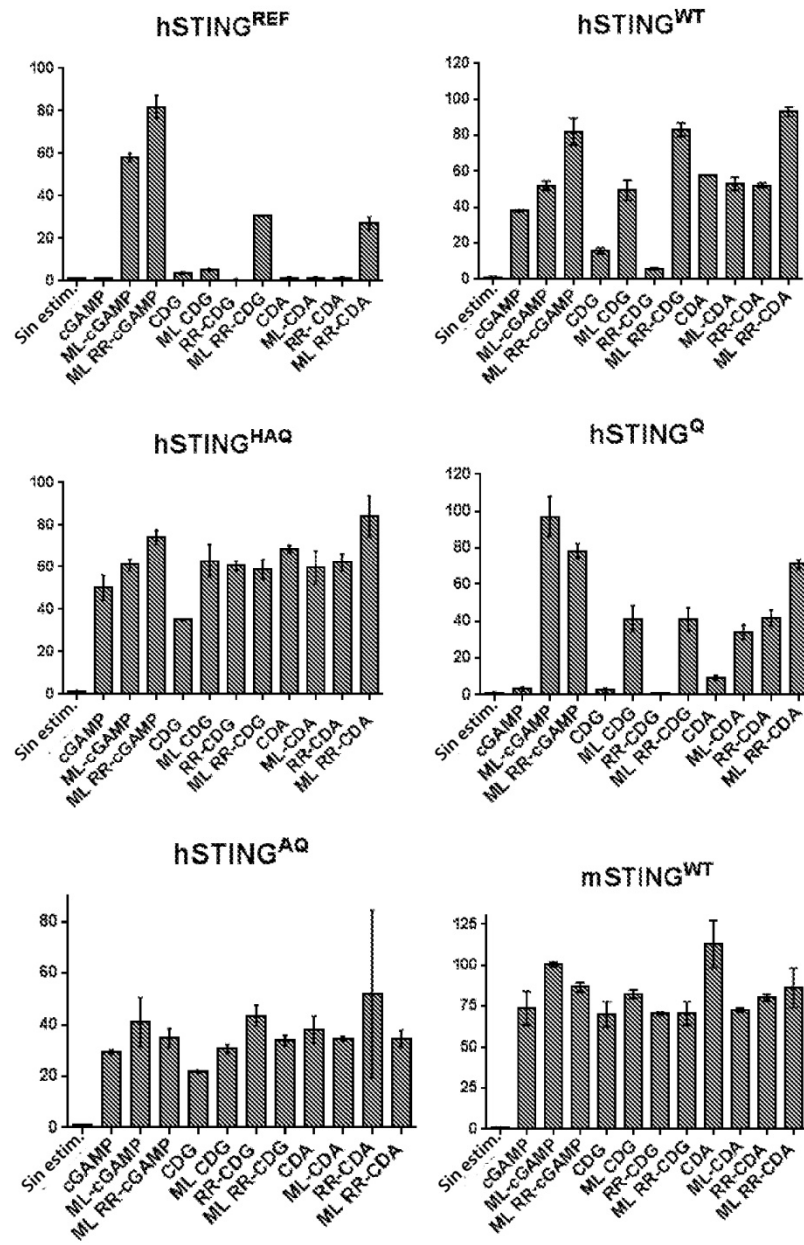


FIG. 15

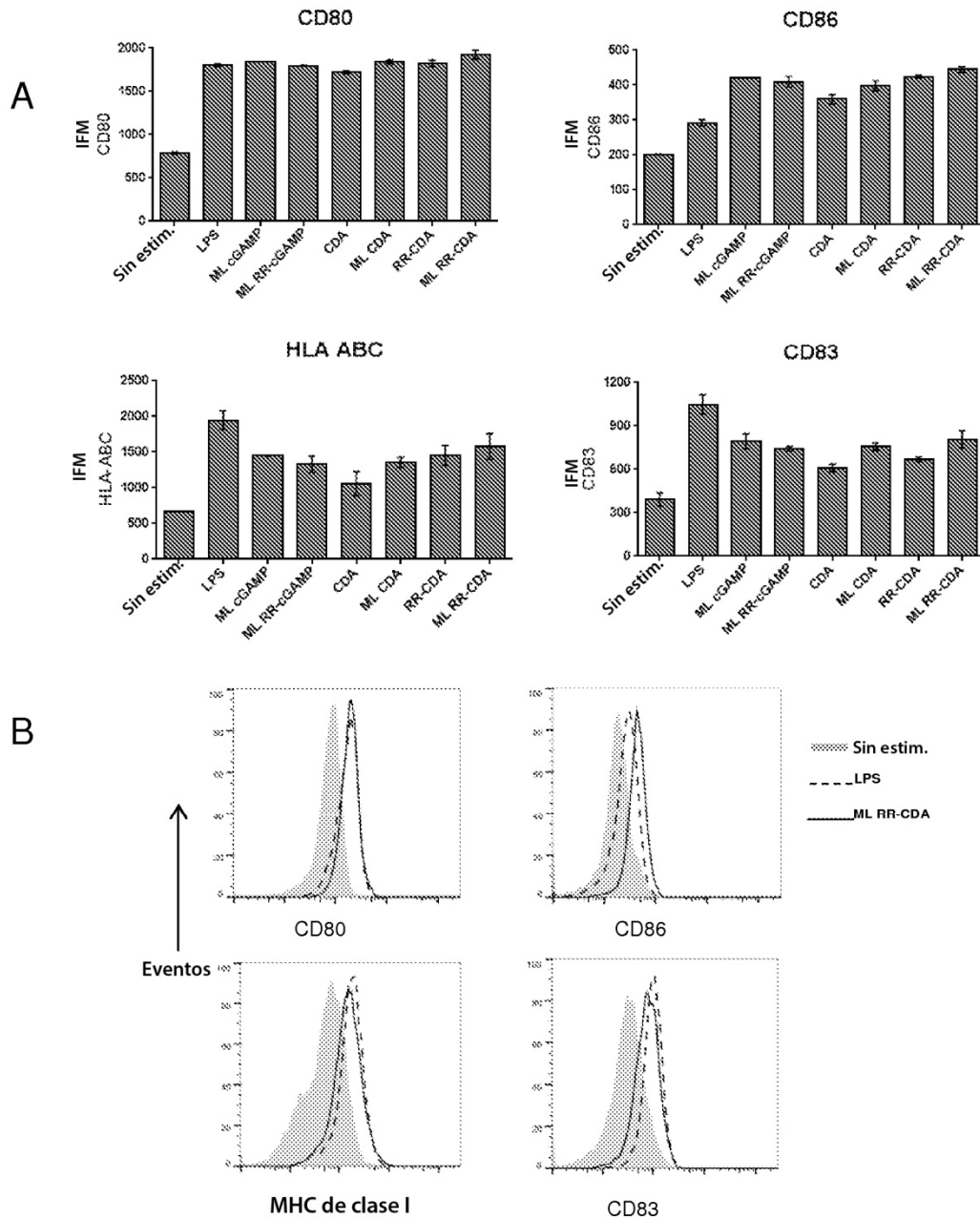


FIG. 16

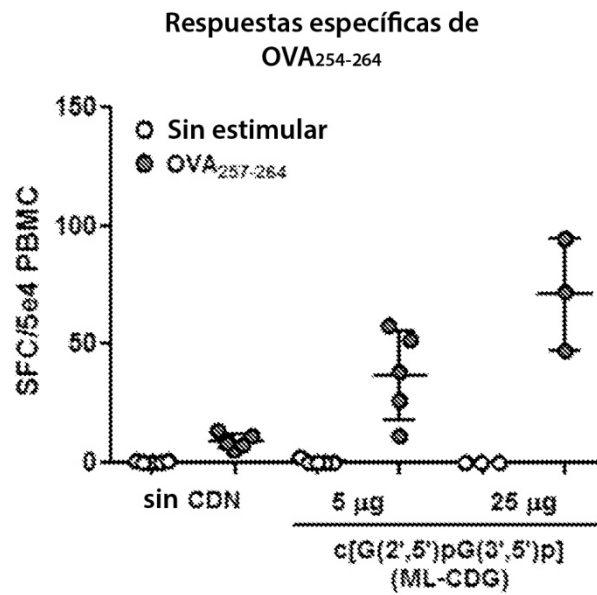


FIG. 17

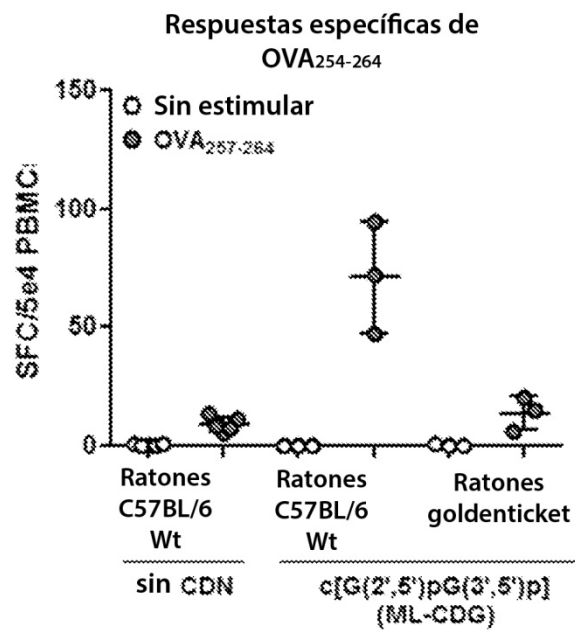


FIG. 18

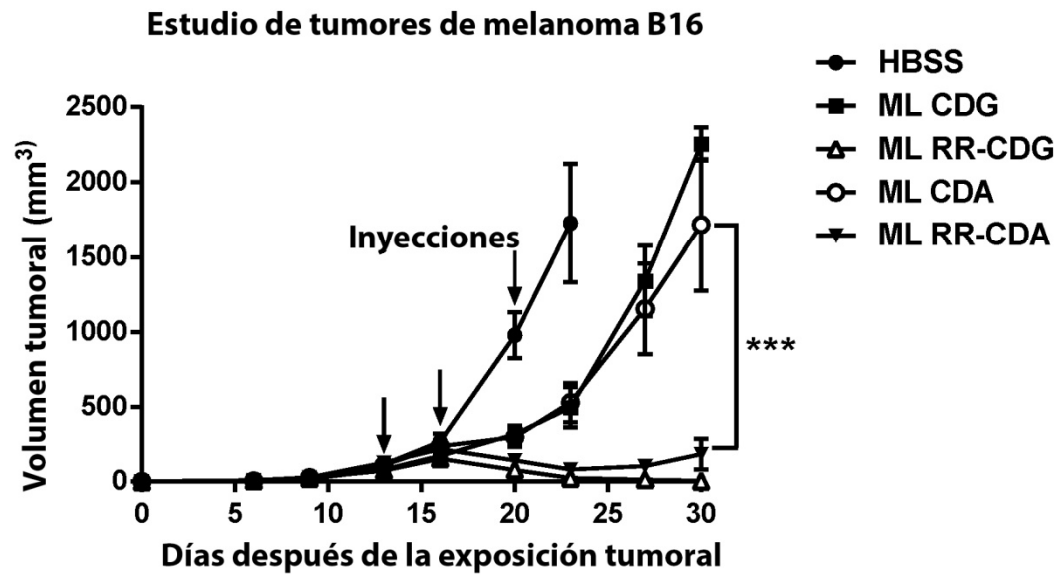


FIG. 19A

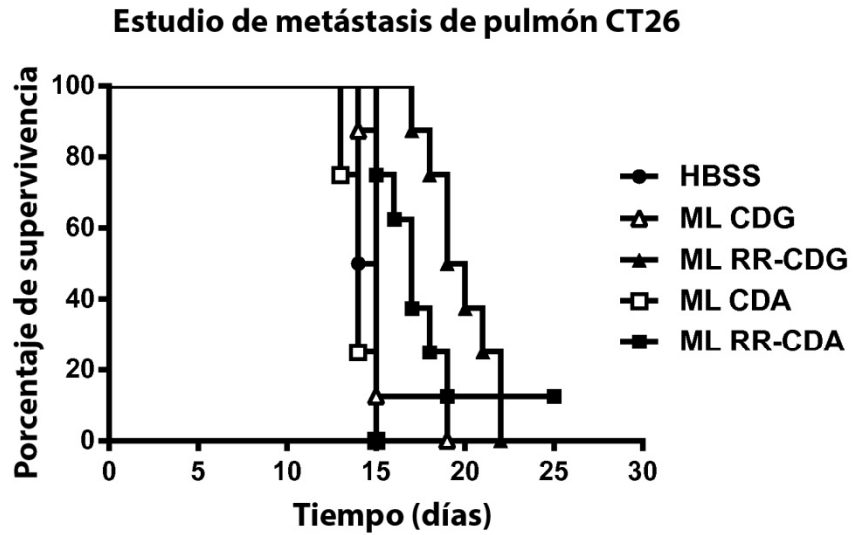


FIG. 19B

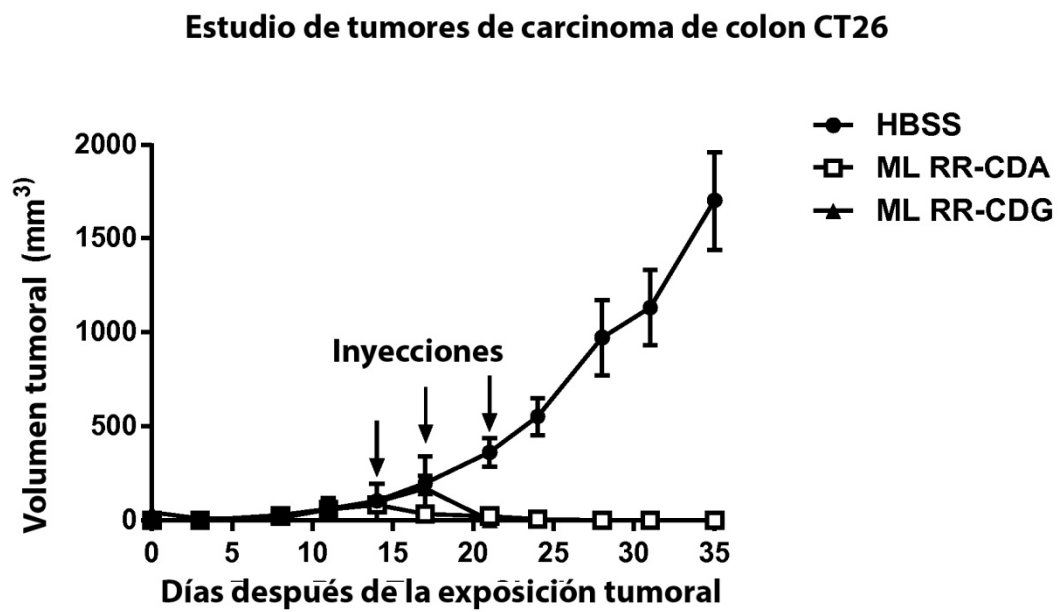


FIG. 19C

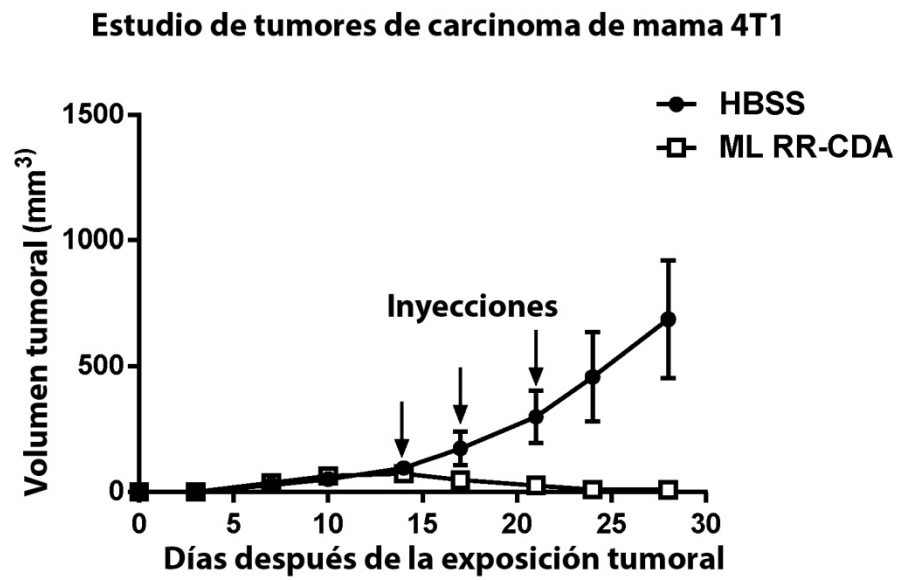


FIG. 20A

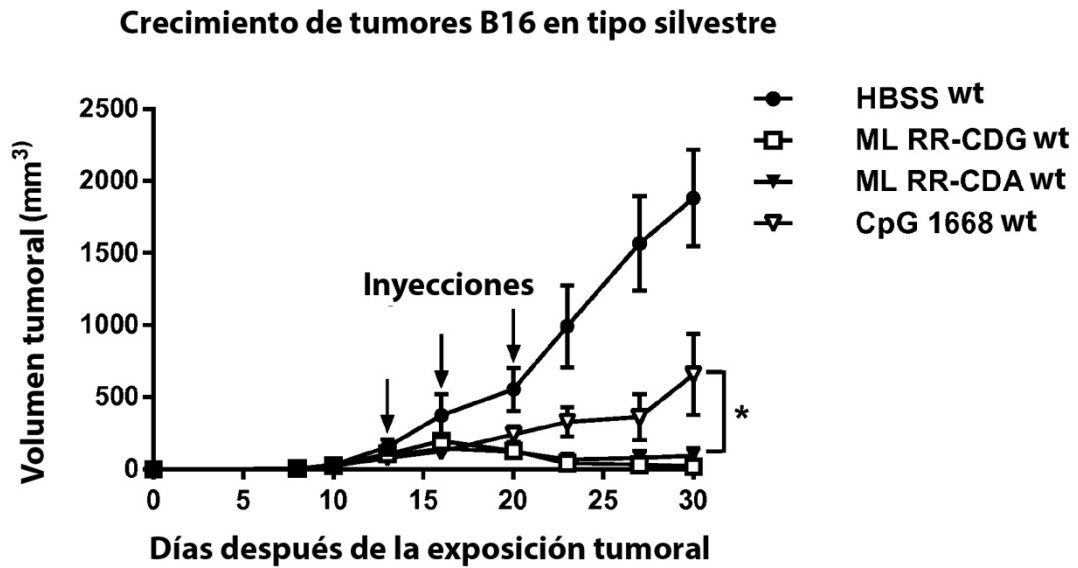


FIG. 20B

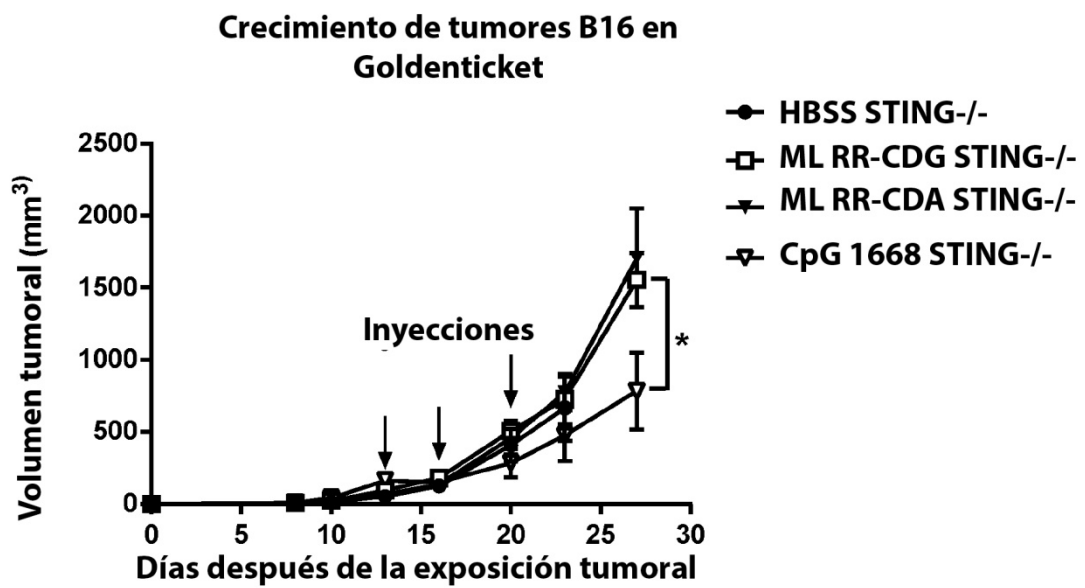


FIG. 21A

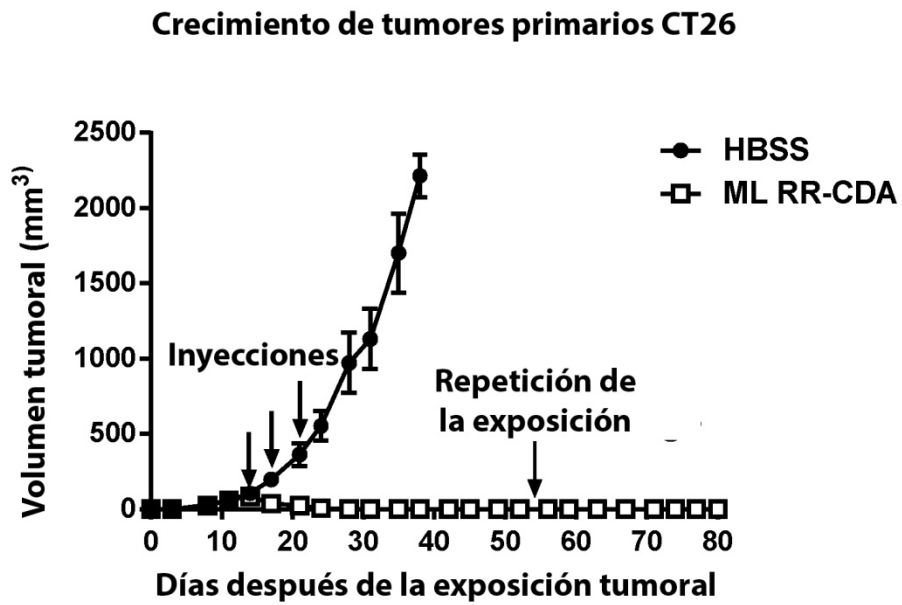


FIG. 21B

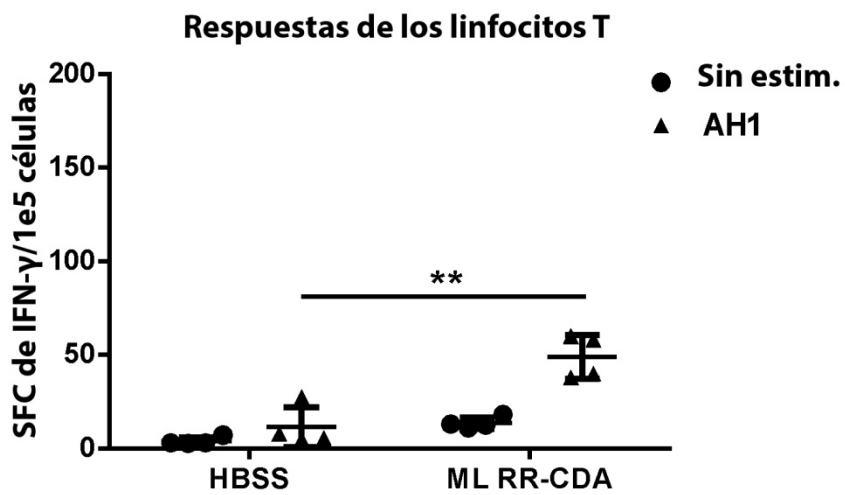


FIG. 21C

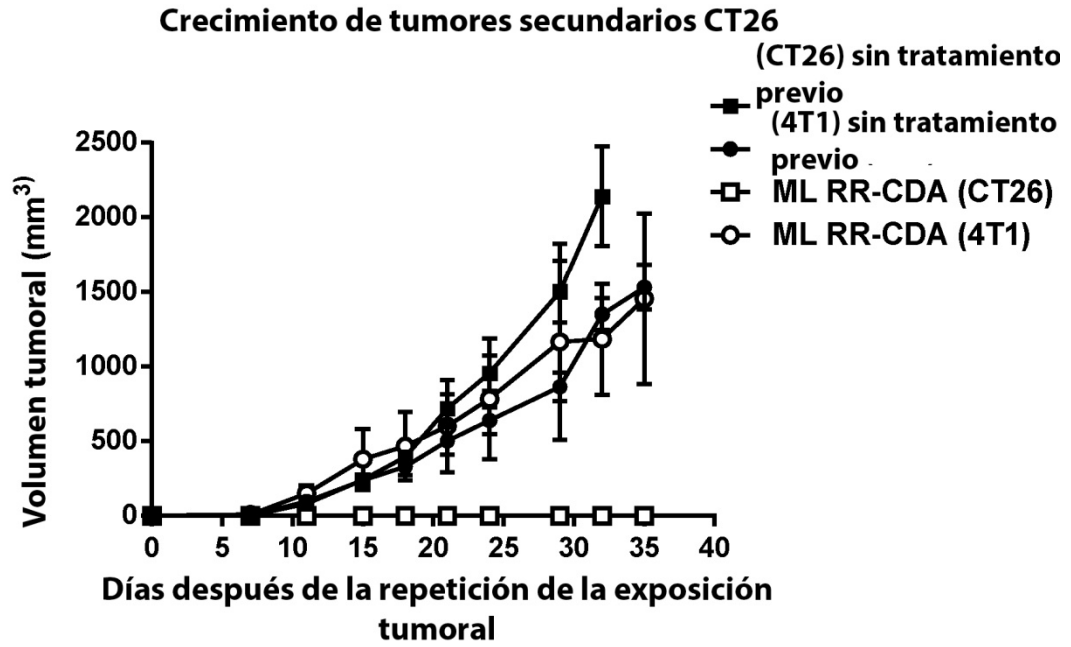


FIG. 22A

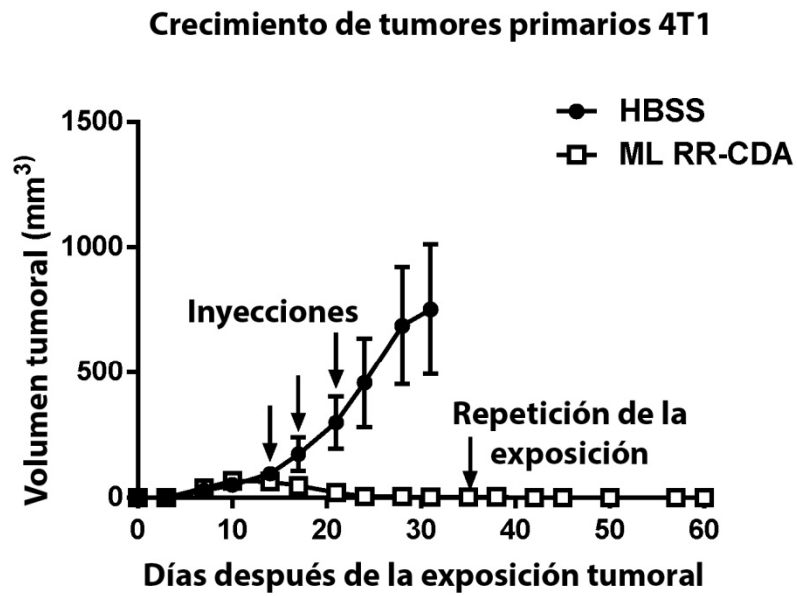


FIG. 22B

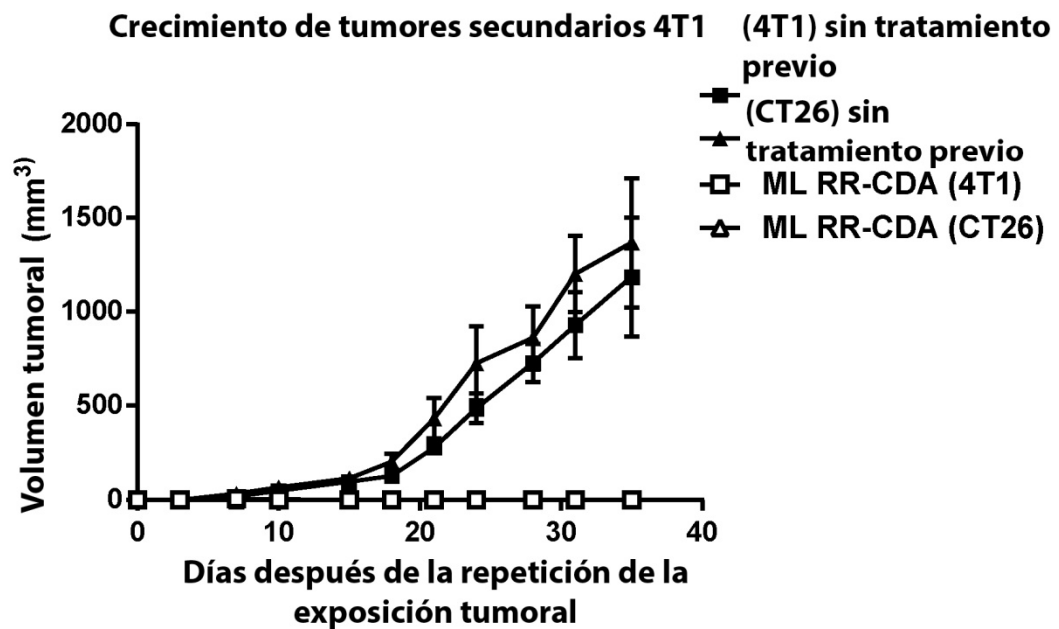


FIG. 23A

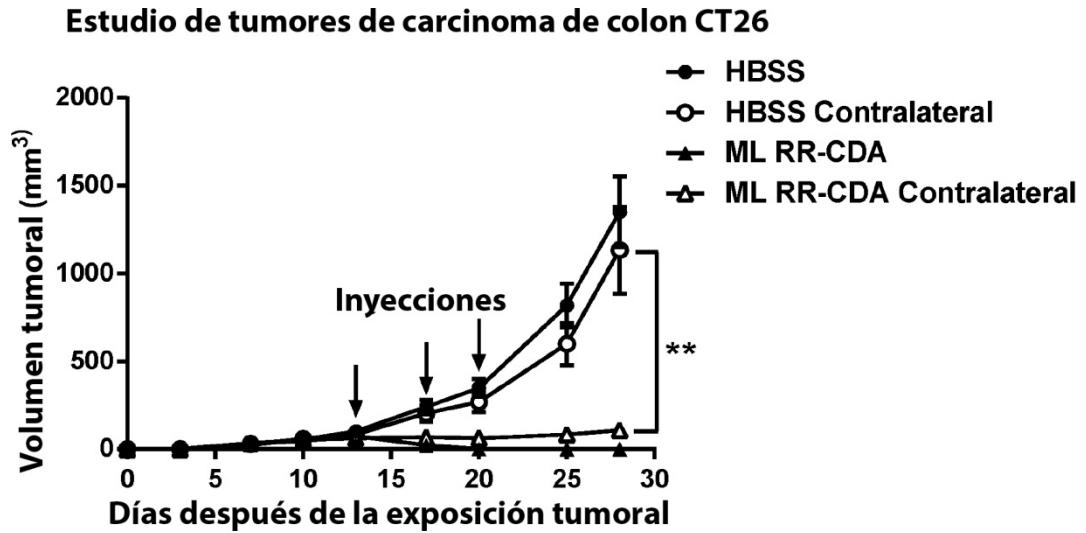


FIG. 23B

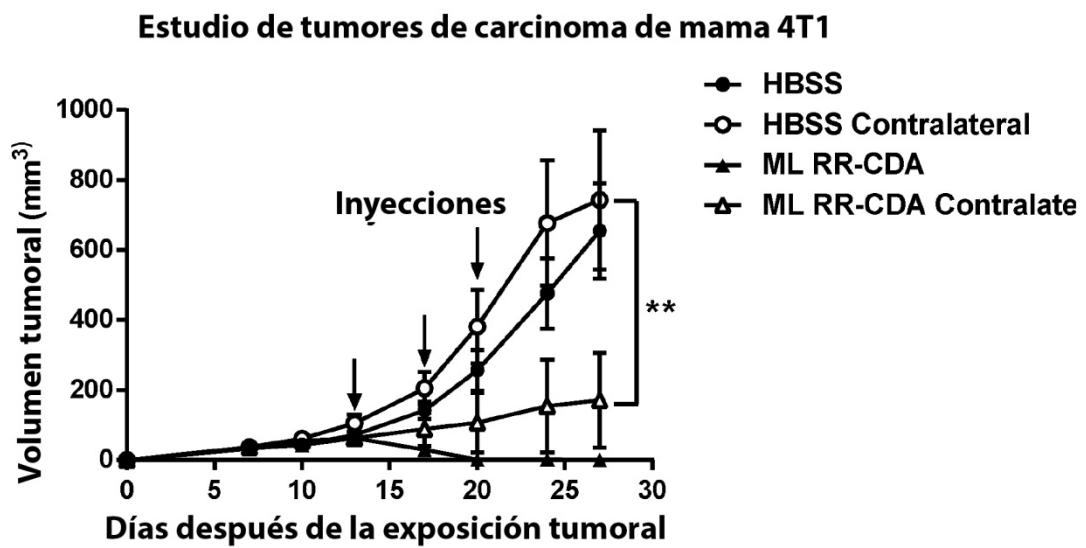


FIG. 24A

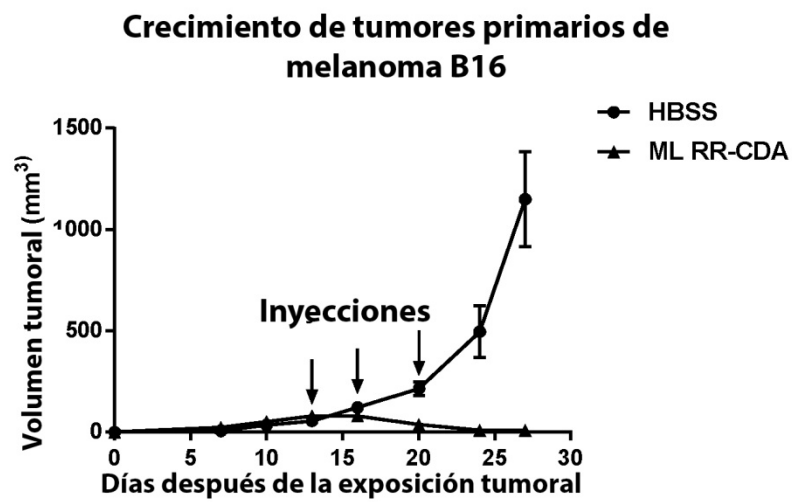


FIG. 24B

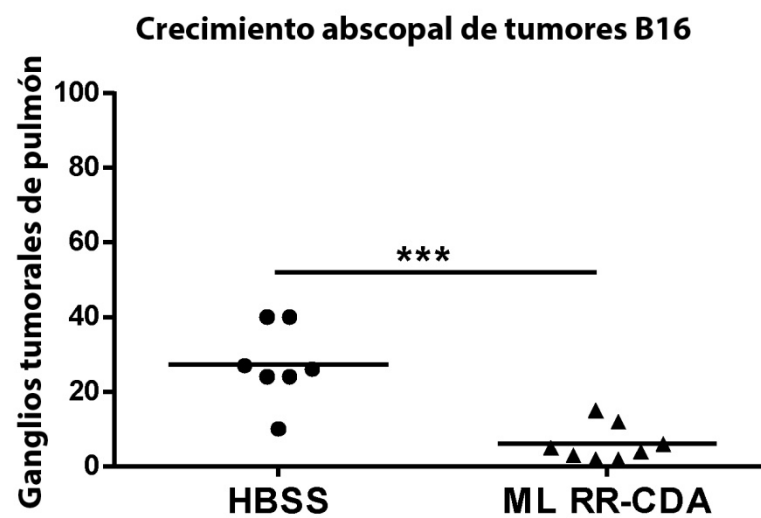


FIG. 24C

