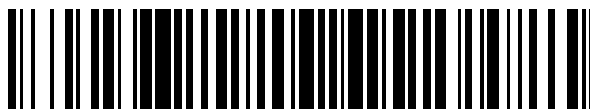


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 910**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2013 PCT/US2013/075189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14093936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2013 E 13863379 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 2931738**

54 Título: **Composiciones que comprenden dinucleótidos cíclicos de purina que tienen estereoquímicas definidas y métodos para su preparación y uso**

30 Prioridad:

13.12.2012 US 201261737006 P
15.03.2013 US 201361790514 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2019

73 Titular/es:

ADURO BIOTECH, INC. (100.0%)
740 Heinz Avenue
Berkeley, CA 94710, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 718 910 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 que comprenden dinucleótidos cíclicos de purina que tienen estereoquímicas definidas y métodos para su preparación y uso

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. 61/737 006, presentada el 13 de diciembre, 2012, y la solicitud provisional de EE.UU. 61/790514, presentada el 15 de marzo, 2013.

Antecedentes de la invención

La siguiente descripción de los antecedentes de la invención se proporciona simplemente para ayudar al lector a la comprensión de la invención y no se admite que describa o constituya técnica anterior de la presente invención.

10 El sistema inmunitario humano en general se puede dividir en dos ramas, denominadas "inmunidad innata" e "inmunidad adaptativa". La rama innata del sistema inmunitario es responsable predominantemente de la respuesta inflamatoria inicial a través de una serie de factores solubles, que incluyen el sistema del complemento y el sistema de quimioquinas/citoquinas; y una serie de tipos de células especializadas que incluyen mastocitos, macrófagos, células dendríticas (DC) y linfocitos citolíticos naturales. En cambio, la rama inmunitaria adaptativa implica una
15 respuesta de anticuerpos retrasada y de duración más larga junto con respuestas de células T CD8+ y CD4+ que tienen una función crítica en la memoria inmunológica contra un antígeno. Una tercera rama del sistema inmunitario se puede definir como que implica células T $\gamma\delta$ y células T con repertorios de receptores de células T limitados tales como células NKT y células MAIT.

Para una respuesta inmunitaria eficaz contra un antígeno, las células presentadoras de antígenos (APC) deben procesar y presentar el antígeno en un contexto de MHC adecuado a una célula T, lo cual dará entonces como
20 resultado la estimulación de células T de células T citotóxicas y células T auxiliares. Después de la presentación de antígenos se debe producir la interacción satisfactoria de moléculas coestimuladoras tanto en las APC como células T o la activación se anulará. El GM-CSF y la IL-12 sirven como moléculas proinflamatorias eficaces en muchos modelos tumorales. Por ejemplo, el GM-CSF induce células precursoras mieloides para la proliferación y diferenciación en células dendríticas (DC) aunque son necesarias señales adicionales para activar su maduración a
25 células presentadoras de antígenos eficaces para la activación de las células T. Las barreras a las terapias inmunitarias eficaces incluyen tolerancia al antígeno al que van dirigidas que puede limitar la inducción de células T CD8 citotóxicas de magnitud y función adecuadas, poco tráfico de células T generadas a los sitios de células malignas y poca resistencia de la respuesta de células T inducida.

30 Las DC que fagocitan desechos de células tumorales procesan el material para la presentación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), regulan por aumento la expresión de moléculas coestimuladoras y migran a los ganglios linfáticos para estimular los linfocitos específicos de tumor. Esta ruta da como resultado la proliferación y activación de células T CD4+ y CD8+ que reaccionan contra antígenos asociados a tumores. Realmente, dichas células se pueden detectar con frecuencia en la sangre, tejidos linfáticos y lesiones malignas de pacientes.

35 Nuevas ideas en los mecanismos que subyacen en la inmunoevasión, junto con regímenes de tratamiento de combinación que potencian la potencia de la vacunación terapéutica sea directa o indirectamente por la combinación con inhibidores de puntos de control inmunitario u otras terapias, han servido de base para el desarrollo de vacunas que inducen inmunidad antitumoral eficaz. Los CDN di-AMP-cíclicos (producidos por *Listeria monocytogenes*) y sus análogos los di-GMP-cíclicos (producidos por *Legionella pneumophila*) son reconocidos por la célula hospedante como un PAMP (patrón molecular asociado a patógeno), que se une al PRR (receptor de reconocimiento de
40 patógenos) conocido como STING. STING es una proteína adaptadora en el citoplasma de células de mamífero hospedantes que activa el eje de señalización de quinasa de unión a TANK (TBK1)-IRF3, dando como resultado la inducción de IFN- β y otros productos génicos dependientes de IRF-3 que activan fuertemente la inmunidad innata. Ahora se reconoce que STING es un componente de la ruta de vigilancia citosólica del hospedante, que detecta la infección con patógenos intracelulares y en respuesta induce la producción de IFN- β , conduciendo al desarrollo de
45 una respuesta inmunitaria protectora adaptativa específica de patógeno que consiste tanto en células T CD4 y CD8 específicas de antígeno, así como en anticuerpos específicos de patógeno. Se describen con cierto detalle ejemplos de dinucleótidos cíclicos de purina, p. ej., en las patentes de EE.UU. n° 7,709,458 y 7,592,326; WO2007/054279; y Yan et al., *Bioorg. Med. Chem Lett.* 18: 5631 (2008).

50 El documento WO 2011/003025 describe métodos para la síntesis de dinucleótidos cíclicos y sus análogos de tiofosfato. El documento US 2007/0281897 describe que los di-GMP cíclicos actúan como un adyuvante y estimulan o potencian la respuesta inmunitaria en un paciente

Sigue habiendo una necesidad de composiciones y métodos mejorados para estrategias inmunológicas para tratar enfermedades tales como el cáncer que pueden ser refractarias a planteamientos terapéuticos tradicionales.

Compendio de la invención

55 Compendio de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Se describen en la presente memoria dinucleótidos cíclicos (CDN) inmunoestimuladores altamente activos que activan las DC a través de un receptor citoplasmático recién descubierto conocido como STING (estimulador de genes de interferón). En particular, los CDN se proporcionan en forma de una composición que comprende uno o más dinucleótidos cíclicos de purina que induce la activación de TBK1 dependiente de STING, en donde los dinucleótidos cíclicos de purina presentes en la composición son estereoisómeros Rp,Rp o Rp,Sp sustancialmente puros, y en particular RpSp sustancialmente puros o diastereoisómeros de CDN tiofosfato Rp,Rp.

En un primer caso, la composición comprende uno o más dinucleótidos cíclicos de purina, en donde los dinucleótidos cíclicos de purina presentes en la composición son diastereoisómeros Rp,Rp o Rp,Sp sustancialmente puros, o sus profármacos o sales farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones, que inducen la activación de TBK1 dependiente de STING, pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y pueden ser útiles como adyuvantes como se describe en la presente memoria. Se prefieren en particular derivados tiofosfato de dinucleótidos cíclicos de purina como se ha descrito en lo que antecede.

En su función como adyuvantes, en ciertas realizaciones las presentes composiciones se pueden usar como adyuvantes en una estrategia terapéutica o profiláctica que usa vacuna(s). Por lo tanto, los diastereoisómeros Rp,Rp o Rp,Sp sustancialmente puros, o sus profármacos o sales farmacéuticamente aceptables, se pueden usar junto con una o más vacunas seleccionadas para estimular una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos predeterminados. Los diastereoisómeros Rp,Rp o Rp,Sp sustancialmente puros, o sus profármacos o sales farmacéuticamente aceptables se pueden proporcionar junto con, o además de, dichas vacunas.

Dicha(s) vacuna(s) puede(n) comprender bacterias o virus inactivados o atenuados que comprenden antígenos de interés, antígenos purificados, vectores de suministro de virus y bacterias vivos genéticamente modificados de forma recombinante para expresar y/o secretar los antígenos, vectores de células presentadoras de antígenos (APC) que comprenden células que se cargan con los antígenos o transfectadas con una composición que comprende un ácido nucleico que codifica los antígenos, vehículos de suministro de antígenos liposomales, o vectores de ácidos nucleicos desnudos que codifican los antígenos. No se pretende que esta lista sea limitante. A modo de ejemplo, dicha(s) vacuna(s) también puede(n) comprender una célula tumoral inactivada que expresa y secreta uno o más ligandos GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70, FLT-3.

Las composiciones de la presente descripción se pueden administrar a individuos que lo necesiten por una variedad de rutas parenterales y no parenterales en formulaciones que contienen excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Las vías preferidas son parenterales, e incluyen, pero no se limitan a una o más de administraciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, intratecal y epidural. La administración particularmente preferida es la administración subcutánea. Las composiciones farmacéuticas preferidas se formulan como emulsiones acuosas o de aceite en agua.

Las composiciones de la presente descripción pueden comprender, o se pueden administrar junto con uno o más componentes farmacéuticamente activos adicionales tales como adyuvantes, lípidos tales como digitonina, liposomas, antagonistas de la ruta de CTLA-4 y PD-1, agentes bloqueadores de la ruta de PD-1, bacterias inactivadas que inducen inmunidad innata (p. ej., *Listeria monocytogenes* inactivada o atenuada), composiciones que median la activación inmunitaria innata a través de receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo (NOD) (NLR), receptores tipo (RIG)-I basados en gen inducible por ácido retinoico (RLR), receptores de lecitina tipo C (CLR), patrones moleculares asociados a patógenos ("PAMP"), agentes quimioterapéuticos, etc.

Como se describe en lo sucesivo, los dinucleótidos cíclicos de purina formulados con uno o más lípidos pueden presentar propiedades mejoradas, que incluyen la actividad de activación de células dendríticas mejoradas. Por lo tanto, la presente descripción se refiere también a una composición que comprende uno o más CDN y uno o más lípidos. En ciertos casos preferidos, uno o más CDN se formulan con digitonina, una formulación liposomal y/o una emulsión de aceite en agua. Una composición puede comprender uno o más de un antagonista de CTLA-4 y un agonista de TLR-4.

En realizaciones preferidas, el uno o más dinucleótidos cíclicos de purina de tiofosfato comprenden un diastereoisómero de tiofosfato Rp,Rp o Rp,Sp sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en de c-di-AMP tiofosfato, c-di-GMP tiofosfato, c-di-IMP tiofosfato, c-AMP-GMP tiofosfato, c-AMP-IMP tiofosfato y c-GMP-IMP tiofosfato o sus combinaciones, incluyendo sus profármacos y sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención proporciona una composición para usar en un método de inducción de una respuesta inmunitaria contra un cáncer o un patógeno en un individuo, comprendiendo la composición uno o más dinucleótidos cíclicos de purina tiofosfatos que son diastereoisómeros Rp,Rp o Rp,Sp sustancialmente puros, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde los dinucleótidos cíclicos de purina comprenden una sustitución del resto 2'-OH de la ribosa por acilo o halógeno. Las vías de administración son parenterales.

En ciertas realizaciones, el método es un método de tratamiento de cáncer. A modo de ejemplo, los diastereoisómeros Rp,Rp o Rp,Sp sustancialmente puros, o sus profármacos o sales farmacéuticamente aceptables, se pueden proporcionar junto con, o además de una o más composiciones de vacuna para el cáncer, que son

conocidas en la técnica. El paciente que recibe dicho tratamiento puede padecer un cáncer seleccionado del grupo que consiste en una célula de cáncer colorrectal, un cáncer escamoso de tracto 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 de una respuesta inmunitaria contra un patógeno.

En la presente invención los dinucleótidos cíclicos tiofosfato inducen la activación de TBK1 dependiente de STING en un individuo, que comprende administrar uno o más dinucleótidos cíclicos de purina que se unen a STING. Las vías de administración son parenterales.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender administrar al mamífero una cantidad eficaz de los CDN sustancialmente puros, o sus profármacos o sales farmacéuticamente aceptables, antes de o después de una terapia primaria administrada a un mamífero para eliminar o matar células de cáncer que expresan el antígeno del cáncer. Las composiciones se pueden proporcionar como una terapia neoadyuvante; sin embargo, en casos preferidos, las composiciones se administran después de la terapia primaria. En diferentes casos, la terapia primaria comprende cirugía para eliminar las células de cáncer del mamífero, terapia de radiación para matar las células de cáncer, o tanto cirugía como terapia de radiación.

En otros casos, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender administrar al mamífero una cantidad eficaz de los CDN sustancialmente puros para el tratamiento de trastornos en los que el cambio de inmunidad Th1 a Th2 confiere beneficio clínico. La inmunidad mediada por células (CMI) está asociada con los linfocitos T CD4⁺ TH1 que producen citoquinas IL-2, interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α . En cambio, la inmunidad humoral está asociada con los linfocitos T CD4⁺ TH2 que producen IL-4, IL-6 y IL-10. La desviación inmunitaria hacia respuestas de TH1 típicamente produce activación de linfocitos células T citotóxicas (CTL), linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos y monocitos. En general, las respuestas Th1 son más eficaces contra patógenos intracelulares

(virus y bacterias que están dentro de células hospedantes) y tumores, mientras que las respuestas Th2 son más eficaces contra bacterias extracelulares, parásitos que incluyen helmintos y toxinas. Además, se espera que la activación de la inmunidad innata normalice el equilibrio del sistema inmunitario de células T auxiliares tipo 1 y 2 (Th1/Th2) y suprima la reacción excesiva de las respuestas de tipo Th2 que producen alergias dependientes de inmunoglobulina E (Ig) y asma alérgico.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 representa una estructura general de CDN.

La fig. 2 representa una estructura de c-di-GMP (compuesto 11A) y c-di-AMP (compuesto 10A).

La fig. 3 representa una estructura de Rp,Rp-c-di-GMP-tiofosfato (compuesto 11B) y Rp,Rp-c-di-AMP-tiofosfato (compuesto 10B).

La fig. 4 representa una estructura de Rp,Sp-c-di-GMP-tiofosfato (compuesto 11C) y Rp,Sp-c-di-AMP-tiofosfato (compuesto 10C).

La fig. 5 representa una estructura de Sp,Sp-c-di-GMP-tiofosfato y Sp,Sp-c-di-AMP-tiofosfato.

La fig. 6 representa un esquema de síntesis para el c-di-AMP y c-di-AMP-tiofosfato.

La fig. 7 representa la inducción de IFN- β en células presentadoras de antígenos por CDN originales y diastereoisómeros de las correspondientes moléculas ditioderivados.

La fig. 8 representa la inducción de IFN- β en células presentadoras de antígeno por diastereoisómeros de CDN después de tratamiento con fosfodiesterasa de veneno de serpiente.

La fig. 9 representa las respuestas de células T CD4 y CD8 específicas de OVA medidas en PBMC a los 10 días después de vacunación junto con tratamiento con CDN.

La fig. 10 representa respuestas de células T CD4 y CD8 específicas de SIVgag medidas en PBMC después de vacunación junto con tratamiento con CDN.

La fig. 11 representa protección inducida por CDN en un modelo murino de estimulación con Listeria-OVA.

La fig. 12 representa la eficacia antitumoral inducida por CDN formulados con GVAX en un modelo de cáncer de próstata murino.

La fig. 13 representa análogos de profármacos de CDN con 2'-O-sustituyente de la presente invención.

La fig. 14 representa la síntesis de análogo de profármaco de CDN con O- o S-sustituyente de la presente invención.

La fig. 15 representa la inducción de IFN- β en una línea celular monocítica humana después de administración de una forma de profármaco de mono-2'-O-miristoil-c-di-GMP del c-di-GMP.

La fig. 16 representa respuestas de células T CD8 específicas de OVA después de vacunación con una forma de profármaco de mono-2'-O-miristoil-c-di-GMP del c-di-GMP.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de inmunoestimuladores dinucleótidos cíclicos (CDN) altamente activos que activan las DC a través de un receptor citoplasmático recientemente descubierto conocido como STING (estimulador de genes de interferón). En particular, los CDN se proporcionan en forma de una composición que comprende uno o más dinucleótidos cíclicos de purina que induce la activación de TBK1 dependiente de STING, en donde los dinucleótidos cíclicos de purina presentes en la composición son estereoisómeros Rp,Rp o Rp,Sp sustancialmente puros, y en particular diastereoisómeros Rp,Rp, o RpSp de CDN tiofosfatos sustancialmente puros.

Los conocimientos recientes sobre el diseño y desarrollo de adyuvantes se basan en un entendimiento fundamental de que las estructuras microbianas conservadas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) son detectadas por receptores de reconocimiento de patrones de la célula hospedante (PRR), lo que desencadena una cascada de señalización descendente que da como resultado la inducción de citoquinas y quimiocinas, y el inicio de una respuesta inmunitaria adaptativa específica. La forma en que el sistema inmunitario es implicado por el complemento PAMP de un microbio determina el desarrollo de una respuesta adaptativa que sea adecuada para combatir que el patógeno invasor cause la enfermedad. Un objetivo del diseño de adyuvante es seleccionar PAMP definidos o moléculas sintéticas específicas para los PRR diseñados para iniciar una respuesta deseada. Los adyuvantes tales como monofosforil lipido A (MPL) y CpG son PAMP reconocidos por receptores tipo Toll (TLR), una clase de PRR transmembrana que señalizan a través de moléculas adaptadoras MyD88 y Trif y median la inducción de citoquinas 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 que están aprobados o pendientes de aprobación por la FDA. Aunque que los TLR presentes en la superficie celular (p. ej., TLR-4) y los endosomas (p. ej., 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 compartimentalización de PRR extracelulares, vacuolares y citosólicos ha conducido a la hipótesis de que el sistema inmunitario innato distingue entre microbios patógenos y no patógenos mediante el control del citosol. Debe ser evidente para un experto en la técnica que los agonistas específicos para PRR que comprenden la ruta de vigilancia citosólica inician el desarrollo de inmunidad protectora contra patógenos intracelulares, y es relevante para el diseño de vacunas. Estos mismos ligandos directores también serán esenciales en el desarrollo de vacunas eficaces que se dirigen a tumores malignos, que se sabe que requieren células T CD4+ y CD8+ específicas de tumor.

La activación de la ruta de vigilancia citosólica (CSP) es unitaria con el desarrollo de la inmunidad protectora contra patógenos intracelulares. La CSP detecta patógenos bacterianos, víricos y protozoarios, que conducen a la activación del eje de señalización de quinasa de unión a TANK (TBK-1)/IRF-3 e inducción de IFN- β y otros genes coregulados. Tanto los ácidos nucleicos víricos como los bacterianos activan esta ruta, y la inducción del IFN- β es independiente de MyD88 y Trif. Aunque se cree a menudo que el interferón de tipo I es principalmente una respuesta antivírica del hospedante, la inducción de IFN- β es una característica 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, mientras que la Lm de tipo natural imprime una potente inmunidad por células T CD4 y CD8 que protege a los ratones contra la estimulación bacteriana, la vacunación con Lm con eliminación de listeriolisina O (LLO) no produce células T funcionales o induce inmunidad protectora. Esta diferencia es una prueba del requisito de la expresión de genes de las células hospedantes y acceso citosólico por Lm para producir inmunidad protectora mediada por células T funcionales. El nivel de IFN- β en células hospedantes infectadas es regulado por bombas de eflujo multifármaco (MDR) de Lm, las cuales secretan moléculas pequeñas estructuralmente no relacionadas, que incluyen antibióticos. El IFN- β no es inducido en células hospedantes infectadas con mutantes LLO de Lm que están confinados en el fagolisosoma. Son inducidos niveles normales de IFN- β en macrófagos MyD88-/- Trif-/- infectados deficientes en toda la señalización mediada por TLR. Estos datos demuestran que, aunque Lm implica a los TLR, en respuesta a la infección con Lm de tipo natural, es necesaria la CSP de la célula hospedante para el desarrollo de inmunidad protectora, correlacionada con la inducción de IFN- β .

La expresión "dinucleótidos cíclicos" ("CDN") como se usa en la presente memoria, se refiere a una clase de moléculas que comprenden enlaces fosfodiéster 2'-5' y/o 3'-5' entre dos nucleótidos de purina. Esto incluye enlaces 2'-5'-2',5', 2'-5'-3',5' y 3',5'-3',5'. Los CDN activan la ruta de vigilancia citosólica a través de la unión directa de dos PRR citosólicos, DDX41 y STING. La respuesta del interferón de tipo I a la infección por Lm y otras bacterias intracelulares, es resultado de la secreción de c-di-AMP o su dinucleótido cíclico (CDN) relacionado, c-di-GMP, y su unión directa a helicasa de caja DDX41 y DEAD (aspartato-glutamato-alanina-aspartato) y STING (estimulador de genes de interferón, *por sus siglas en inglés Stimulator of Interferon Genes*), un receptor recientemente definido de la ruta de vigilancia citosólica. Los CDN son segundos mensajeros expresados por la mayoría de bacterias y regulan

diversos procesos, que incluyen la motilidad y formación de biopelículas. Los CDN se unen con alta afinidad a DDX41, y forman complejo con la proteína adaptadora STING, dando como resultado la activación de la ruta de señalización de TBK1/IRF3, e inducción de IFN- β y otros productos génicos dependientes de IRF-3 que activan fuertemente la inmunidad innata.

Las moléculas de CDN naturales son sensibles a la degradación por fosfodiesterasas que están presentes en células hospedantes, por ejemplo en células presentadoras de antígeno, que absorben formulaciones de vacuna que contienen dichas moléculas de CDN naturales. La potencia de un adyuvante definido puede disminuir por dicha degradación, ya que el adyuvante no podría unirse y activar su objetivo de PRR definido. Una menor potencia del adyuvante se puede medir, por ejemplo, por una menor cantidad de expresión inducida de una molécula característica de la inmunidad innata (p. ej., IFN- β), correlacionada con una potencia de la vacuna más débil, como se define por la magnitud de una respuesta inmunitaria específica de antígeno medida.

En la presente invención, se proporcionan derivados de ditio-difosfato de c-di-AMP y c-di-GMP. El procedimiento de síntesis de dichos derivados de ditio-difosfato de moléculas de c-di-AMP y c-di-GMP da como resultado una mezcla de diastereoisómeros, que incluyen derivados de ditio-difosfato Rp,Rp, Sp,Sp y Rp,Sp de moléculas de c-di-AMP y c-di-GMP. Se ha mostrado previamente que dichas mezclas de diastereoisómeros que contienen derivados de ditio-difosfato Rp, Rp y Rp, Sp de c-di-GMP reclutaban y activaban células inflamatorias en los espacios broncoalveolares cuando se administraban a ratones por vía intranasal. Sin embargo, no había pruebas de que dichos derivados de ditio-difosfato de c-di-GMP proporcionaran ninguna ventaja con respecto a la estimulación de una respuesta inmunitaria, en comparación con las moléculas c-di-GMP originales, y de hecho, dichas preparaciones de ditio-difosfato de c-di-GMP tenían una potencia solo similar o más débil en comparación con las moléculas de c-di-GMP originales.

Definiciones

"Administración" como se usa en la presente memoria en relación con 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 a poner en contacto un ligando, reactivo, placebo, molécula pequeña, agente farmacéutico, agente terapéutico, agente de diagnóstico o composición exógenos con el sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico, y similares. "Administración" se puede referir, p. ej., a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, investigación, placebo y experimentales. El tratamiento de una célula abarca poner en contacto un reactivo con la célula, así como poner en contacto un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. "Administración" también abarca tratamientos in vitro y ex vivo, p. ej., de una célula, por un reactivo, agente de diagnóstico, composición de unión o por otra célula. Por "administrados juntos" se entiende que implica que dos o más agentes se van a administrar en una sola composición. Aunque está contemplada la administración como una sola composición por la presente invención, dichos agentes se pueden suministrar a un solo sujeto como administraciones separadas, que pueden ser al mismo tiempo o diferentes tiempos, y que pueden ser por la misma o diferentes vías de administración.

Un "agonista", en relación con un ligando y receptor, comprende una molécula, combinación de moléculas, un complejo, o una combinación de reactivos, que estimulan el receptor. Por ejemplo, un agonista del factor estimulador de la colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) puede abarcar el GM-CSF, una muteína o derivado de GM-CSF, un péptido mimético de GM-CSF, una molécula pequeña que imita la función biológica de GM-CSF, o un anticuerpo que estimula el receptor de GM-CSF.

Un "antagonista", en relación con un ligando y receptor, comprende una molécula, combinación de moléculas o un complejo, que inhibe, contrarresta, regula por disminución y/o desensibiliza el receptor. "Antagonista" abarca cualquier reactivo que inhiba una actividad constitutiva del receptor. Una actividad constitutiva es una que se pone de manifiesto en ausencia de una interacción ligando/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 del GM-CSF incluye, sin implicar ninguna limitación, un anticuerpo que se une al ligando (GM-CSF) y previene que este se una al receptor, o un anticuerpo que se une al receptor y previene que el ligando se una al receptor, o donde el anticuerpo cierra el receptor en una conformación inactiva.

Como se usa en la presente memoria, un "análogo" o "derivado" con referencia a un péptido, polipéptido o proteína se refiere a otro péptido, polipéptido o proteína que tiene una función similar o idéntica que el péptido, polipéptido o proteína original, pero no comprende necesariamente una secuencia de aminoácidos similar o idéntica o estructura del péptido, polipéptido o proteína original. Un análogo preferiblemente satisface al menos uno de los siguientes: (a) un agente proteínico que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos original (b) un agente proteínico codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones restrictivas con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos original; y (c) un agente proteínico codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos

85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos original.

Las "células presentadoras de antígeno" (APC) son células del sistema inmunitario usadas para la presentación de antígenos a células T. Las APC incluyen células dendríticas, monocitos, macrófagos, células de Kupffer de la zona marginal, microglía, células de Langerhans, células T y células B. Las células dendríticas se encuentran en al menos dos linajes. El primer linaje abarca pre-DC1, DC1 mieloides y DC1 maduras. El segundo linaje abarca células multipotentes progenitoras tempranas de CD34+CD45RA-, células CD34+CD45RA+, células pro-DC2 CD34+CD45RA+CD4+ IL-3Rα+, células pre-DC2 plasmocitoides CD4+CD11c-, DC2 derivadas de DC2 plasmacitoides humanas linfoides y DC2 maduras.

"Atenuación" y "atenuado" abarca una bacteria, virus, parásito, organismo infeccioso, prion, célula tumoral, gen en el organismo infeccioso, y similares, que se modifica para reducir la toxicidad en un hospedante. El hospedante puede ser un hospedante humano o animal, o un organismo, tejido o célula. La bacteria, para dar un ejemplo no limitante, se puede atenuar para reducir la unión a una célula hospedante, para reducir la extensión de una célula hospedante a otra célula hospedante, para reducir el crecimiento extracelular, o para reducir el crecimiento intracelular en una célula hospedante. La atenuación se puede evaluar midiendo, p. ej., un indicio o indicios de toxicidad, la LD₅₀, la tasa de depuración de un órgano o el índice competitivo (véase, p. ej., Auerbuch, et al. (2001) *Infect. Immunity* 69:5953-5957). En general, una atenuación da como resultado un aumento en la LD₅₀ y/o un aumento de la tasa de depuración en al menos 25%; más en general en el menos 50%; lo más generalmente en al menos 100% (2 veces); normalmente en al menos 5 veces; más normalmente en al menos 10 veces; lo más normalmente en al menos 50 veces; a menudo en al menos 100 veces; más a menudo en al menos 500 veces; y lo más a menudo en al menos 1000 veces; habitualmente en al menos 5000 veces; más habitualmente en al menos 10000 veces; y lo más habitualmente en al menos 50000 veces; y lo más a menudo en al menos 100000 veces;

Por "purificado" y "aislado" se entiende que una especie especificada da cuenta de al menos 50%, más a menudo da cuenta de al menos 60%, típicamente da cuenta de al menos 70%, más típicamente da cuenta de al menos 75%, lo más típicamente da cuenta de al menos 80%, habitualmente da cuenta de al menos 85%, más habitualmente da cuenta de al menos 90%, lo más habitualmente da cuenta de al menos 95%, y convenientemente da cuenta de al menos 98% en peso o más, de la especie presente en una composición. Los pesos de agua, tampones, sales, detergentes, agentes reductores, inhibidores de proteasa, estabilizantes (que incluyen una proteína añadida tal como albúmina), y excipientes, en general no se usan en la determinación de la pureza.

Se une "específicamente" o "selectivamente", cuando se refiere a un ligando/receptor, ácido nucleico/ácido nucleico complementario, anticuerpo/antígeno, u otra pareja de unión (p. ej., una citoquina a un receptor de citoquina) (cada uno denominado en general en la presente memoria una "biomolécula diana" o una "diana") indica una reacción de unión que está relacionada con la presencia de la diana en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. La unión específica puede significar, p. ej., que el compuesto de unión, ligando ácido nucleico, anticuerpo o composición de unión derivado del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, del método contemplado, se une a su diana con una afinidad que a menudo es al menos 25% mayor, más a menudo al menos 50% mayor, lo más a menudo al menos 100% (2 veces) mayor, normalmente al menos diez veces mayor, más normalmente al menos 20 veces mayor, y lo más normalmente al menos 100 veces mayor que la afinidad con una molécula no diana.

"Ligando" se refiere a una molécula pequeña, ácido nucleico, péptido, polipéptido, sacárido, polisacárido, glicano, glicoproteína, glicopéptido, o sus combinaciones, que se une a una biomolécula diana. Aunque 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 de agonista o antagonista. La unión específica de un ligando por su diana cognada a menudo se expresa en términos de una "afinidad". En realizaciones preferidas, los ligandos de la presente invención se unen con afinidades entre aproximadamente 10⁴ M⁻¹ y aproximadamente 10⁸ M⁻¹. La afinidad se calcula como $K_d = k_{off}/k_{on}$ (k_{off} es la constante de la velocidad de disociación, k_{on} es la constante de la velocidad de asociación y K_d es la constante de equilibrio).

La afinidad se puede determinar en el equilibrio midiendo la fracción unida (r) de ligando marcado en diferentes concentraciones (c). Los datos se representan gráficamente usando la ecuación de Scatchard: $r/c = K(n-r)$: donde r = moles de ligando unido/moles de receptor en el equilibrio; c = concentración de ligando libre en el equilibrio; K = constante de equilibrio de asociación; y n = número de sitios de unión al ligando por molécula de receptor. Mediante análisis gráfico, se representa r/c en el eje Y frente a r en el eje X produciendo así la gráfica de Scatchard. La medición de la afinidad por el análisis de Scatchard es bien conocido en la técnica. Véase, p. ej., 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 disolución de ligando en una disolución de su diana cognada. Se vigila el calor liberado tras la interacción (ΔH) a lo largo del tiempo. Puesto que se valoran cantidades sucesivas del ligando en la celda de ITC, la cantidad de calor absorbido o liberado está en proporción directa con la cantidad de unión. Cuando el sistema alcanza la saturación, la señal de calor disminuye solo hasta que se observa solo calor de dilución. Se obtiene entonces una curva de unión a partir de una gráfica del calor de cada inyección frente a la relación del ligando y la

pareja de unión en la celda. La curva de unión se analiza con el modelo de unión adecuado para determinar K_B , n y ΔH . Obsérvese que $K_B = 1/K_d$.

El término "sujeto" como se usa en la presente memoria se refiere a un ser humano u organismo no humano. Por lo tanto, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se pueden aplicar tanto a enfermedades humanas como veterinarias. En ciertas realizaciones, los sujetos son "pacientes", es decir, seres humanos que están recibiendo atención médica para una enfermedad o afección. Esto incluye personas con enfermedad no definida en los que se están investigando signos de patología. Se prefieren los sujetos que tienen un diagnóstico existente de un cáncer particular al que se están dirigiendo las composiciones y métodos de la presente invención. Los cánceres preferidos para tratamiento con las composiciones descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a cáncer de próstata, carcinoma renal, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y cáncer de mama.

La "cantidad terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad de un reactivo o composición farmacéutica que es suficiente para mostrar un beneficio en el paciente, es decir, producir una disminución, prevenir o mejorar los síntomas de la afección que se está tratando. Cuando el agente o composición farmacéutica comprende un agente de diagnóstico, una "cantidad de diagnóstico eficaz" se define como una cantidad que es suficiente para producir una señal, 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, género y peso del individuo y respuestas idiosincráticas del individuo. La "cantidad eficaz" abarca, sin limitación, una cantidad que puede mejorar, invertir, mitigar, prevenir o diagnosticar un síntoma o señal de una afección o trastorno médico o un proceso que lo causa. Salvo que se indique otra cosa, explícitamente o por el contexto, una "cantidad eficaz" no está limitada a una cantidad mínima suficiente para mejorar una afección.

"Tratamiento" o "tratar" (con respecto a una afección o una enfermedad) es una estrategia de obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo y preferiblemente resultados clínicos. Para los fines de esta invención, los resultados beneficiosos o deseados con respecto a una enfermedad incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: prevenir una enfermedad, mejorar una afección asociada con una enfermedad, curar una enfermedad, reducir la gravedad de una enfermedad, retrasar el avance de una enfermedad, aliviar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, aumentar la calidad de vida del que padece una enfermedad y/o prolongar la supervivencia. Igualmente, para los fines de esta invención, los resultados beneficiosos o deseados con respecto a una afección incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: prevenir una afección, mejorar una afección, curar una afección, reducir la gravedad de una afección, retrasar el avance de una afección, aliviar uno o más síntomas asociados con una afección, aumentar la calidad de vida del que padece una afección y/o prolongar la supervivencia. Por ejemplo, en realizaciones donde las composiciones descritas en la presente memoria se usan para el tratamiento del cáncer, los resultados beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: reducir la proliferación de (o destruir) células neoplásicas o cancerosas, reducir la metástasis de células neoplásicas encontradas en cánceres, reducir el tamaño de un tumor, disminuir los síntomas que resultan del cáncer, aumentar la calidad de vida de los que padecen el cáncer, disminuir la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, retrasar el avance del cáncer y/o prolongar la supervivencia de pacientes que tienen cáncer. Dependiendo del contexto, el "tratamiento" de un sujeto puede implicar que el sujeto necesita tratamiento, p. ej., en la situación donde el sujeto comprende un trastorno que se espera que mejore por la administración de un reactivo.

Por "purificado" y "aislado" se entiende, cuando se refiere a un polipéptido, que el polipéptido está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas con las que está asociado en la naturaleza. El término "purificado" como se usa en la presente memoria, significa que un polipéptido identificado a menudo da cuenta de al menos 50%, más a menudo da cuenta de al menos 60%, típicamente da cuenta de al menos 70%, más típicamente da cuenta de al menos 75%, lo más típicamente da cuenta de al menos 80%, habitualmente da cuenta de al menos 85%, más habitualmente da cuenta de al menos 90%, lo más habitualmente da cuenta de al menos 95%, y convenientemente da cuenta de al menos 98% en peso o más, del polipéptido presente. Los pesos de agua, tampones, sales, detergentes, agentes de reducción, inhibidores de proteasa, estabilizantes (incluyendo una proteína añadida tal como albúmina) y excipientes, y moléculas que tienen un peso molecular menor de 1000, en general no se usan en la determinación de la pureza del polipéptido. Véase, p. ej., la descripción de pureza en la patente de EE.UU. n° 6090611 expedida a Covacci, et al.

"Péptido" se refiere a una secuencia corta de aminoácidos, donde los aminoácidos están conectados entre sí por enlaces peptídicos. Un péptido se puede encontrar libre o unido a otro resto, tal como una macromolécula, lípido, oligo o polisacárido y/o un polipéptido. Cuando se incorpora un péptido en una cadena de polipéptido, el término "péptido" todavía se puede usar para referirse específicamente a la secuencia corta de aminoácidos. Un "péptido" se puede conectar a otro resto mediante un enlace peptídico o algún otro tipo de conexión. Un péptido es de al menos dos aminoácidos de longitud y en general de menos de aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, donde la longitud máxima está en función de la costumbre o contexto. Los términos "péptido" y "oligopéptido" se pueden usar de forma intercambiable.

"Proteína" en general se refiere a la secuencia de aminoácidos que comprende una cadena de polipéptido. Proteína

también se puede referir a una estructura tridimensional del polipéptido. "Proteína desnaturalizada" se refiere a un polipéptido parcialmente desnaturalizado, que tiene algo de estructura tridimensional residual, o alternativamente, a una estructura tridimensional esencialmente aleatoria, es decir, totalmente desnaturalizada. La invención abarca reactivos y métodos de uso de variantes de polipéptidos, p. ej., que implican glicosilación, fosforilación, sulfatación, formación de enlace disulfuro, desamidación, isomerización, puntos de escisión en el procesamiento de la secuencia señal o líder, cofactores unidos covalente y no covalentemente, variantes oxidadas, y similares. La formación de proteínas unidas por disulfuro está descrita (véase, p. ej., Woycechowsky y Raines (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:533-539; Creighton, et al. (1995) *Trends Biotechnol.* 13:18-23).

"Recombinante" cuando se usa con referencia, p. e., a un ácido nucleico, célula, animal, virus, plásmido, vector, o similar, indica modificación por la introducción de un ácido nucleico exógeno, no natural, alteración de un ácido nucleico natural, o por derivación total o parcial de un ácido nucleico, célula, virus, plásmido o vector recombinante. La proteína recombinante se refiere a una proteína derivada, p. ej., de un ácido nucleico, virus, plásmido o vector recombinante, o similar. "Bacteria recombinante" abarca una bacteria donde el genoma se modifica genéticamente por métodos recombinantes, p. ej., mediante una mutación, eliminación, inserción y/o reordenación. "Bacteria recombinante" también abarca una bacteria modificada para incluir un ácido nucleico extragenómico recombinante, p. ej., un plásmido o un segundo cromosoma, o una bacteria donde se altera un ácido nucleico extragenómico existente.

"Muestra" se refiere a una muestra de un ser humano, animal, placebo o muestra de investigación, p. ej., una célula, tejido, órgano, fluido, gas, aerosol, suspensión, coloide o material coagulado. La "muestra" se puede ensayar in vivo, p. ej., sin retirar del ser humano o animal, o se puede ensayar in vitro. La muestra se puede ensayar después de procesamiento, p. ej., por métodos histológicos. "Muestra" también se refiere, p. ej., a una célula que comprende una muestra de fluido o tejido o una célula separada de una muestra de fluido o tejido. "Muestra" se puede referir también a una célula, tejido, órgano o fluido recién tomada de un ser humano o animal, o a una célula, tejido, órgano o fluido que está procesado o almacenado.

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

El término "anticuerpo" como se usa en la presente memoria, se refiere a un péptido o polipéptido derivado de, modelado después de o sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o sus fragmentos, capaces de unirse específicamente a un antígeno o epítipo. Véase, p. ej. *Fundamental Immunology*, 3ª Edición, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994); *J. Immunol. Methods* 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97. El término anticuerpo incluye partes de unión al antígeno, es decir, "sitios de unión al antígeno", (p. ej., fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de la complementariedad (CDR)) que retienen la capacidad de unirse al antígeno, que incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. También están incluidos los anticuerpos de una sola cadena por referencia en el término "anticuerpo".

Dinucleótidos cíclicos de purina

Como se describe en la presente memoria, la presente invención se refiere al uso de dinucleótidos cíclicos de purina estereoquímicamente purificados que inducen la activación de TBK1 dependiente de STING.

Tanto las células procariotas como las eucariotas usan diferentes moléculas pequeñas para la señalización celular y la comunicación intra e intercelular. Se sabe que los nucleótidos cíclicos, tales como cGMP, cAMP, etc. tienen actividad reguladora y de inicio en células procariotas y eucariotas. A diferencia de las células eucariotas, las células procariotas también usan dinucleótidos cíclicos de purina como moléculas reguladoras. En procariotas, la condensación de dos moléculas de GTP es catalizada por la enzima diguanilato ciclasa (DGC) para dar el c-diGMP, que representa un regulador importante en bacterias.

Trabajos recientes sugieren que los CDN tales como el diGMP cíclico o sus análogos, también pueden estimular o potenciar la respuesta inmunitaria o inflamatoria en un paciente o pueden potenciar la respuesta inmunitaria contra una vacuna sirviendo como adyuvante en mamíferos. La detección citosólica de ADN derivado de patógenos requiere la señalización a través de la quinasa de unión a TANK 1 (TBK1) y su factor de transcripción en dirección descendiente, el factor regulador de IFN 3 (IRF3). Una proteína transmembrana llamada STING (estimulador de genes de IFN; también conocida como MITA, ERIS, MPYS y TMEM173) funciona como el receptor de señalización para estos dinucleótidos cíclicos de purina, produciendo la estimulación del eje de señalización TBK1-IRF3 y una respuesta de interferón de tipo I dependiente de STING. Véase, p. ej., Fig. 1. Burdette et al., *Nature* 478: 515-18, 2011, demostraban que STING se une directamente al monofosfato de diguanilato cíclico, pero no a otros nucleótidos no relacionados o ácidos nucleicos.

El objetivo de la formulación de vacuna típicamente es proporcionar una combinación de antígenos y adyuvantes capaces de generar una población suficiente de células T y/o células B de memoria para reaccionar rápidamente contra un patógeno, célula tumoral, etc., que lleva un antígeno de interés. La descripción en la presente memoria se refiere a métodos para proporcionar composiciones adyuvantes que comprenden uno o más dinucleótidos cíclicos de purina, en donde los dinucleótidos cíclicos de purina presentes en la composición son diastereoisómeros Rp,Rp o Rp,Sp sustancialmente puros, métodos para su fabricación, y métodos para su uso para estimular una respuesta inmunitaria en un animal.

Los dinucleótidos cíclicos de purina preferidos incluyen, pero no se limitan a c-di-AMP, c-di-GMP, c-di-IMP, c-AMP-GMP, c-AMP-IMP y c-GMP-IMP, y sus análogos que incluyen, pero no se limitan a análogos de fosforotioato, denominados en la presente memoria "tiofosfatos". En la fig. 1 se proporciona una estructura general de CDN tiofosfato. En esta figura, B1 y B2 representan el resto de base. Los fosforotioatos son una variante de nucleótidos normales en los que uno o más oxígenos que no forman puente se sustituyen por un azufre. La sulfuración del enlace internucleótido reduce notablemente la acción de endo y exonucleasas, incluyendo de 5' a 3' y de 3' a 5' exonucleasa ADN POL 1, nucleasas S1 y PI, RNasas, nucleasas del suero y fosfodiesterasa de veneno de serpiente. Además, aumenta el potencial para atravesar la membrana lipídica.

Un enlace fosforotioato es inherentemente quiral. El experto en la técnica reconocerá que los fosfatos en esta estructura pueden existir en las formas R o S. Por lo tanto, son posibles las formas Rp,Rp, Sp,Sp, y Rp,Sp. En cada caso, se prefieren los diastereoisómeros Rp,Rp y Rp,Sp sustancialmente puros de estas moléculas. Se representan ejemplos de dichas moléculas de CDN tiofosfatos en las figuras 2-6 en la presente memoria, que muestran las formas de tiofosfato del monofosfato de Rp,Rp-c-di-adenosina; monofosfato de Rp,Sp-c-di-adenosina; monofosfato de Rp,Rp-c-di-guanosina y monofosfato de Rp,Sp-c-di-guanosina. En estas figuras, se muestra la estereoquímica del centro de fosfato como R o S, según sea adecuado.

Los dinucleótidos cíclicos de purina preferidos incluyen formas con 2'-O-sustituyente de CDN, y en particular de CDN tiofosfato. La estabilidad y biodisponibilidad adicionales se pueden proporcionar por la sustitución del 2'-OH del resto de ribosa. Un ejemplo de dichos análogos con 2'-O-sustituyente se muestra en la fig. 11. Los grupos sustituyentes posibles en la presente memoria incluyen sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo (-C(O)R_{aa}), carboxilo (-C(O)O-R_{aa}), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxi sustituido (-O-R_{aa}), arilo, aralquilo, radical heterocíclico, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (-N(R_{bb})(R_{cc})), imino (=NR_{bb}), amido (-C(O)N(R_{bb})(R_{cc})) o -N(R_{bb})C(O)R_{aa}, azido (-N₃), nitró (-NO₂), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc})) o -N(R_{bb})C(O)OR_{aa}, ureido (-N(R_{bb})C(O)-N(R_{bb})(R_{cc})), tioureido (-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc})), guanidinilo (-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})), amidinilo (-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})) o -N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})), tiol (-SR_{bb}), sulfínilo (-S(O)R_{bb}), sulfonilo (-S(O)₂R_b) y sulfonamidilo (-S(O)₂N(R_{bb})(R_{cc})) o -N(R_{bb})S(O)₂R_{bb}). En donde cada uno de R_{aa}, R_{bb} y R_{cc} es, independientemente, H, un grupo funcional químico opcionalmente unido o un grupo sustituyente adicional con una lista preferida que incluye sin limitación, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo. Los sustituyentes seleccionados dentro de los compuestos descritos en la presente memoria están presentes en un grado recursivo.

Otros dinucleótidos cíclicos de purina preferidos más, también incluyen las formas de CDN con S-sustituyente, y en particular CDN tiofosfatos, que pueden proporcionar ventajosamente profármacos con mejor biodisponibilidad. El término "profármaco" como se usa en la presente memoria se refiere a una modificación de los compuestos contemplados, en donde el compuesto modificado se convierte de nuevo dentro del cuerpo (p. ej., en una célula diana u órgano diana) en la forma no modificada por reacciones enzimáticas o no enzimáticas. En ciertas realizaciones, el hidroxilo en una ribosa comprende un grupo lábil del profármaco. Los profármacos pueden modificar las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas de fármacos. Los profármacos tradicionales se clasifican como fármacos que son activados por transformación que experimentan in vivo para formar el fármaco activo. Las razones para el desarrollo de profármacos típicamente son poca solubilidad acuosa, inestabilidad química, baja biodisponibilidad oral, falta de penetración en la barrera hematoencefálica, y alto metabolismo de primer paso asociado con el fármaco original. Los restos de los profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en "Prodrugs and Targeted Delivery," J. Rautico, Ed., John Wiley & Sons, 2011.

Se muestra en la fig. 12 un ejemplo de dichos análogos profármacos. Esta forma de profármaco con mejor liofilicidad se puede escindir en formas activas por la acción de esterases presentes en organismos diana. Los grupos sustituyentes posibles en la presente memoria incluyen sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo (-C(O)R_{aa}), carboxilo (-C(O)O-R_{aa}), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxi sustituido (-O-R_{aa}), arilo, aralquilo, radical heterocíclico, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (-N(R_{bb})(R_{cc})), imino (=NR_{bb}), amido (-C(O)N(R_{bb})(R_{cc})) o -N(R_{bb})C(O)R_{aa}, azido (-N₃), nitró (-NO₂), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc})) o -N(R_{bb})C(O)OR_{aa}, ureido (-N(R_{bb})C(O)-N(R_{bb})(R_{cc})), tioureido (-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc})), guanidinilo (-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})), amidinilo (-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})) o -N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})), tiol (-SR_{bb}), sulfínilo (-S(O)R_{bb}), sulfonilo (-S(O)₂R_b) y sulfonamidilo (-S(O)₂N(R_{bb})(R_{cc})) o -N(R_{bb})S(O)₂R_{bb}). En donde cada uno de R_{aa}, R_{bb} y R_{cc} es, independientemente, H, un grupo funcional químico opcionalmente unido o un grupo sustituyente adicional con una lista preferida que incluye sin limitación, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo. Los sustituyentes seleccionados dentro de los compuestos descritos en la presente memoria están presentes en un grado recursivo. Los sustituyentes preferidos

incluyen metilo, isopropilo y t-butilo. Las formas de profármacos de nucleótidos son conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Nucleotide Prodrugs for HCV Therapy, Sofia, M.J., *Antiviral Chem and Chemother* ., 2011, 22: 23-49; Nucleoside, Nucleotide, and Non-Nucleoside Inhibitors of Hepatitis C Virus NS5B RNA - Dependent RNA - Polymerase, Sofia, M.J., et al., *J. Med. Chem.*, 2012, 55: 2481-2531.

- 5 El término "alquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado saturado, que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, n-hexilo, octilo, decilo, dodecilo, y similares. Los grupos alquilo típicamente incluyen de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferido de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. La expresión "alquilo inferior" como se usa en la presente memoria, incluye de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo como se usan en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyente adicionales.

- 15 El término "alquenilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, sin limitación, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, dienos tales como 1,3 -butadieno y similares. Los grupos alquenilo típicamente incluyen de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferido de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquenilo como se usan en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyente adicionales.

- 20 El término "alquinilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, sin limitación, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, y similares. Los grupos alquinilo típicamente incluyen de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferido de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquinilo como se usan en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyente adicionales.

- 30 El término "acilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical formado por eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general $-C(O)-X$ donde X típicamente es alifático, alicíclico o aromático. Los ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfinilos aromáticos, sulfinilos alifáticos, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos y similares. Los grupos acilo, como se usa en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

- 35 El término "alicíclico" se refiere a un sistema de anillos cíclico en donde el anillo es alifático. El sistema de anillos puede comprender uno o más anillos en donde al menos un anillo es alifático. Los alicíclicos preferidos incluyen anillos que tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 átomos de carbono en el anillo. Alicíclico, como se usa en la presente memoria, puede incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

- 40 El término "alifático", como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono, en donde la saturación entre cualesquiera dos átomos de carbono es un enlace sencillo, doble o triple. Un grupo alifático preferiblemente contiene de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferido de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Dichos grupos alifáticos interrumpidos por heteroátomos incluyen sin limitación, polialcoxis, tales como polialquilenglicoles, poliaminas y poliiminas. Los grupos alifáticos, como se usa en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

- 45 El término "alcoxi", como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno en donde el átomo de oxígeno se usa para unir el grupo alquilo a una molécula original. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen sin limitación, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, n-pentoxi, neopentoxi, n-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi, como se usa en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

- 50 El término "aminoalquilo" como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical alquilo C_1-C_n sustituido. La parte de alquilo del radical forma un enlace covalente con una molécula principal. El grupo amino puede estar situado en cualquier posición y el grupo aminoalquilo puede estar sustituido con un grupo sustituyente adicional en las partes de alquilo y/o amino.

- 55 Los términos "aralquilo" y "arilalquilo," como se usan en la presente memoria, se refieren a un grupo aromático que está unido covalentemente a un radical alquilo C_1-C_n . La parte de radical alquilo del grupo aralquilo (o arilalquilo) resultante forma un enlace covalente con una molécula original. Los ejemplos incluyen, sin limitación, bencilo, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo, como se usa en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyente adicionales unidos al alquilo, al arilo o ambos grupos que forman el grupo radical.

Los términos "arilo" y "aromático", como se usan en la presente memoria, se refieren a radicales de sistemas de anillos carbocíclicos, mono o policíclicos, que tienen uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo, y similares. Los sistemas de anillos de arilo tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Los grupos arilo, como se usa en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

Los términos "halogeno-" y "halógeno", como se usan en la presente memoria, se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

Los términos "heteroarilo" y "heteroaromático", como se usan en la presente memoria, se refieren a un radical que comprende un anillo aromático mono o policíclico, sistema de anillos o sistema de anillos condensados, en donde al menos uno de los anillos es aromático, e incluye uno o más heteroátomos. Heteroarilo se pretende también que incluya sistemas de anillos condensados donde uno o más de los anillos condensados no contienen heteroátomos. Los grupos heteroarilo típicamente incluyen un átomo en el anillo seleccionado de azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo y similares. Los radicales heteroarilo pueden estar unidos a una molécula original directamente o a través de un resto conector tal como un grupo alifático o heteroátomo. Los grupos heteroarilo, como se usa en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

El término "heteroarilalquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo heteroarilo como se ha definido previamente que además incluye un radical alquilo C₁-C₁₂ unido covalentemente. La parte de radical alquilo del grupo heteroarilalquilo resultante puede formar un enlace covalente con una molécula original. Los ejemplos incluyen sin limitación, piridinilmetilo, pirimidinilmetilo, naftiridinilpropilo y similares. Los grupos heteroarilalquilo, como se usa en la presente memoria, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales en una o ambas partes del heteroarilo o alquilo.

Como se ha indicado antes, los dinucleótidos cíclicos de purina preferidos también incluyen formas de profármacos de CDN, y en particular CDN tiofosfatos. Los profármacos pueden modificar las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas de fármacos. Los profármacos tradicionales se clasifican como fármacos que son activados por transformación que experimentan in vivo para formar el fármaco activo. Las razones para el desarrollo de profármacos típicamente son poca solubilidad acuosa, inestabilidad química, baja biodisponibilidad oral, falta de penetración en la barrera hematoencefálica, y alto metabolismo de primer paso asociado con el fármaco original. Los restos de los profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en "Prodrugs and Targeted Delivery," J. Rautico, Ed., John Wiley & Sons, 2011.

La expresión "sustancialmente puro" como se usa en la presente memoria en relación con dinucleótidos cíclicos de purina, se refiere a una forma Rp,Rp o Rp,Sp que es al menos 75% pura con respecto a otras posibles estereoquímicas en los centros quirales indicados en las figuras anteriores. A modo de ejemplo, un "Rp,Rp c-di-GMP tiofosfato sustancialmente puro" sería al menos 75% puro con respecto a las formas Rp,Sp y Sp,Sp del c-di-GMP tiofosfato. En realizaciones preferidas, un dinucleótido cíclico de purina sustancialmente puro es al menos 85% puro, al menos 90% puro, al menos 95% puro, al menos 97% puro y al menos 99% puro. Aunque una preparación de dinucleótido cíclico de purina sustancialmente puro es "estereoquímicamente puro", no significa que indique que todos los CDN dentro de la preparación que tienen una estereoquímica particular en esos centros quirales sean por lo demás idénticos. Por ejemplo, una preparación de dinucleótido cíclico de purina sustancialmente puro puede contener una combinación de Rp,Rp c-di-GMP tiofosfato y Rp,Rp c-di-AMP tiofosfato y ser todavía una preparación de dinucleótido cíclico de purina sustancialmente puro. Dicha preparación puede incluir también otros componentes como se describen en lo sucesivo, que son ventajosos para el tratamiento del paciente, con la condición de que todos los CDN dentro de la preparación tengan una estereoquímica particular en estos centros quirales.

Las composiciones de CDN descritas en la presente memoria se pueden administrar a un hospedante, solas o en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para inducir, modificar o estimular una respuesta inmunitaria adecuada. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, respuesta inmunitaria específica, respuesta inmunitaria no específica, respuesta tanto específica como no específica, respuesta innata, respuesta inmunitaria primaria, inmunidad adaptativa, respuesta inmunitaria secundaria, respuesta inmunitaria de memoria, activación celular inmunitaria, proliferación celular inmunitaria, diferenciación celular inmunitaria y expresión de citoquinas. En algunos casos, las composiciones de CDN se administran conjuntamente con una o más composiciones adicionales que incluyen vacunas dirigidas a estimular una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos predeterminados; adyuvantes; antagonistas de la ruta de CTLA-4 y PD-1, lípidos, liposomas, agentes quimioterapéuticos, líneas celulares inmunomoduladoras, etc.

Las composiciones de CDN se pueden administrar antes, después y/o junto con una composición terapéutica o profiláctica adicional. Estas incluyen, sin limitación, molécula coestimuladora B7, interleuquina-2, interferón-γ, GM-CSF, antagonistas de CTLA-4, ligando OX-40/OX-40, ligando CD40/CD40, sargramostim, levamisol, virus vaccinia, Bacille Calmette-Guerin (BCG), liposomas, alumbre, adyuvante completo o incompleto de Freund, endotoxinas detoxificadas, aceites minerales, sustancias tensioactivas tales como lipolecitina, polioles plurónicos, polianiones,

péptidos, y emulsiones de aceite o hidrocarburo. Se prefieren los excipientes para inducir una respuesta inmunitaria de células T que estimulen preferiblemente una respuesta de células T citolíticas frente a una respuesta de anticuerpos, aunque también se pueden usar los que estimulan ambos tipos de respuesta. En casos en los que el agente es un polipéptido, se puede administrar el propio polipéptido o un polinucleótido que codifica el polipéptido. El excipiente 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 células B. Otras células presentadoras de antígeno profesionales incluyen monocitos, células de Kupffer de la zona marginal, microglía, células de Langerhans, células dendríticas interdigitantes, células dendríticas foliculares y células T. También se pueden usar células presentadoras de antígenos facultativas. Los ejemplos de células presentadoras de antígenos facultativas incluyen astrocitos, células foliculares, endotelio y fibroblastos. El vehículo puede ser una célula bacteriana que está transformada para expresar el polipéptido o para suministrar un polinucleótido que posteriormente es expresado en células del individuo vacunado. Se pueden añadir adyuvantes, tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, para aumentar la capacidad de la vacuna para producir, potenciar o prolongar una respuesta inmunitaria. Materiales adicionales, tales como citoquinas, quimioquinas y secuencias de ácidos nucleicos bacterianas, como CpG, un agonista de receptor tipo toll (TLR) 9 así como agonistas adicionales para TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 8, TLR9, incluyendo lipoproteínas, LPS, monofosforil lípido A, ácido lipoteicoico, imiquimod, resiquimod, usados separados o en combinación con las composiciones descritas también son potenciales 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 técnica puede llevar a cabo experimentación rutinaria para determinar el mejor adyuvante para usar.

Los métodos para la coadministración 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, New York, NY; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA).

Adyuvantes

Además del(los) dinucleótido(s) cíclico(s) de purina descrito(s) antes, las composiciones pueden comprender además una o más sustancias adicionales que, debido a su naturaleza adyuvante, pueden actuar para estimular el sistema inmunitario para responder contra los antígenos del cáncer presentes en la(s) célula(s) tumoral(es) inactivada(s). Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a lípidos, liposomas, bacterias inactivadas que inducen inmunidad innata (p. ej., *Listeria monocytogenes* inactivada o atenuada), composiciones que median la activación inmunitaria innata a través de los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo (NOD) (NLR), receptores tipo (RIG)-I basados en gen inducible por ácido retinoico (RLR), y/o receptores de lectina tipo C (CLR). Los ejemplos de PAMP incluyen lipoproteínas, lipopolipéptidos, peptidoglicanos, zimosán, lipopolisacárido, porinas de *Neisseria*, flagelina, profilina, galactoceramida, dipéptido de muramilo. Los péptidoglicanos, lipoproteínas y ácidos lipoteicoicos son componentes de las paredes celulares de las Gram positivas. Los lipopolisacáridos son expresados por la mayoría de las bacterias, siendo un ejemplo MPL. La flagelina se refiere al componente estructural de los flagelos bacterianos que es secretada 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 peptidoglicano bioactivo común a todas las bacterias. No se pretende que esta lista sea limitante. Las composiciones de adyuvantes preferidas se describen más adelante.

Antagonistas de la ruta de CTLA-4 y PD-1

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

Ipilimumab (YervoyTM) y tremelimumab son anticuerpos monoclonales humanizados que se unen al CTLA4 humano y previenen su interacción con CD80 y CD86. Los estudios en fase I y II que usan ipilimumab y tremelimumab han demostrado actividad clínica en pacientes con cáncer. Otros inmunomoduladores negativos a los que se puede dirigir una estrategia similar incluyen la muerte celular programada 1, atenuador de linfocitos B y T, factor de crecimiento transformante beta β , interleuquina-10, y factor de crecimiento endotelial vascular.

La PD-1 es otro regulador negativo de la respuesta inmunitaria adaptativa que es expresada en células T activadas. La PD-1 se une a B7-H1 y B7-DC, y la implicación de PD-1 suprime la activación de células T. Se han demostrado efectos antitumorales con el bloqueo de la ruta de la PD-1. Se ha descrito en la bibliografía que BMS-936558, MK3475, CT-011, AMP-224 y MDX-1106 son ejemplos de bloqueadores de la ruta de PD-1 que pueden ser útiles en la presente invención.

Agonistas de TLR

La expresión "receptor tipo Toll" (o "TLR") como se usa en la presente memoria, se refiere a un miembro de la familia de receptores tipo Toll de proteínas o uno de sus fragmentos que detecta un producto microbiano y/o inicia una respuesta inmunitaria adaptativa. En una realización, un TLR activa una célula dendrítica (DC). Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de receptores de reconocimiento de patrones que se identificaron inicialmente como detectores del sistema inmunitario innato que reconocen patógenos microbianos. Los TLR comprenden una familia de moléculas conservadas que se extienden a través de la membrana que contienen un ectodominio de repeticiones ricas en leucina, un dominio transmembrana y un dominio TIR intracelular (Toll/IL-1R). Los TLR reconocen diferentes estructuras en microbios, a menudo denominadas PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos). La unión del ligando a los TLR produce una cascada de rutas de señalización intracelular que inducen la producción de factores implicados en la inflamación e inmunidad.

En seres humanos, se han identificado diez TLR. Los TLR que son expresados en la superficie celular incluyen TLR-1, -2, -4, -5, y -6, mientras que TLR-3, -7/8, y -9 son expresados en el compartimento del ER. Los subconjuntos de células dendríticas humanas se pueden identificar basándose en diferentes patrones de expresión de TLR. A modo de ejemplo, el subconjunto de DC mieloides o "convencionales" (mDC) expresa los TLR 1-8 cuando son estimuladas, y se produce una cascada de marcadores de activación (p. ej., CD80, CD86, MHC clase I y II, CCR7), citoquinas proinflamatorias y quimioquinas. Como resultado de esta estimulación y expresión resultante es el cebado de células T CD4+ y CD8+ específicas de antígeno. Estas DC adquieren una capacidad potenciada para recoger antígenos y presentarlos en una forma adecuada a las células T. En cambio, el subconjunto de DC plasmacitoides (pDC) expresan solo TLR7 y TLR9 tras activación, con una activación resultante de células NK así como células T. Puesto que las células tumorales que mueren pueden afectar de forma adversa a la función de las DC, se ha sugerido que la activación de DC con agonistas de TLR puede ser beneficiosa para el cebado de la inmunidad antitumoral en una estrategia de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer. También se ha sugerido que el tratamiento satisfactorio del cáncer de mama usando radiación y quimioterapia requiere la activación de TLR4.

Los agonistas de TLR conocidos en la técnica y que son útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a 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;

poli(ácido ribosínico):poli(ácido ribocitídico) (Poly I:C), un agonista de TLR-3;

poliadenosina-poli(ácido uridílico) (poly AU), un agonista de TLR-3;

Poli(ácido inosínico)-Poli(ácido citidílico) estabilizado con poli-L-lisina y carboximetilcelulosa (Hiltonol®), un agonista de TLR-3 ;

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 hidrato de carbono asociado con la mucina MUC1 en una serie de células de cáncer humano y un agonista de TLR-4;

imiquimod, un agonista de TLR-7;

resiquimod, un agonista de TLR-7/8;

loxoribina, un agonista de TLR-7/8; y

dinucleótido de CpG no metilado (CpG-ODN), un agonista de TLR-9.

Debido a sus cantidades de adyuvantes, los agonistas de TLR se usan preferiblemente en combinaciones con otras vacunas, adyuvantes y/o inmunomoduladores, y se pueden combinar en diferentes combinaciones. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los dinucleótidos cíclicos de purina que se unen a STING e inducen la activación de TBK1 dependiente de STING y una célula tumoral inactivada que expresa y secreta una o más citoquinas que estimulan la inducción, reclutamiento y/o maduración de células dendríticas, como se describe en la presente memoria, se

pueden administrar junto con uno o más agonistas de TLR para fines terapéuticos.

Lípidos y liposomas

Los liposomas son vesículas formadas a partir de una ("unilaminar") o más ("multilaminar") capas de fosfolípidos. Debido al carácter anfipático de los bloques estructurales de fosfolípidos, los liposomas típicamente comprenden una capa hidrófila que presenta una capa externa hidrófila y que encierra un núcleo hidrófilo. La versatilidad de los liposomas en la incorporación de componentes hidrófilos/hidrófobos, su naturaleza no tóxica, biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad adyuvante, inducción de inmunidad celular, propiedad de liberación sostenida y la absorción rápida por macrófagos, los hace candidatos atractivos para el suministro de antígenos.

El documento WO2010/104833, describe preparaciones de liposomas que comprenden:

a) un vehículo acuoso;

b) liposomas que comprenden

(i) dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),

(ii) dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dimiristoiltrimetilamonio-propano ("DMTAP"), o tanto DMPG como DMTAP,

y

(iii) al menos un derivado de esteroil; y

c) uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos unidos covalentemente a entre 1% y 100% de dicho al menos un derivado de esteroil.

Dichas formulaciones de liposomas, denominadas en la presente memoria VesiVax®; (Molecular Express, Inc.), con o sin el(los) "polipéptido(s) o hidrato(s) de carbono inmunogénicos" mencionados antes, pueden contener uno o más componentes adicionales tales como peptidoglicano, lipopéptido, lipopolisacárido, monofosforil lípido A, ácido lipoteicoico, resiquimod, imiquimod, flagelina, oligonucleótidos que contienen motivos de CpG no metilados, beta-galactosilceramida, dipéptido de muramilo, ácido retinoico todo-trans, ARN vírico bicatenario, proteínas de choque térmico, bromuro de dioctadecildimetilamonio, tensioactivos catiónicos, agonistas de receptores tipo toll, dimiristoiltrimetilamonio-propano, y agonistas de receptores tipo nod. Ventajosamente, estas formulaciones de liposomas se pueden usar para suministrar uno o más dinucleótidos cíclicos de purina de acuerdo con la presente invención.

Además, aunque las formulaciones de liposomas descritas antes usan un "derivado de esteroide" como un anclaje para unir un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico a un liposoma, el esteroide se puede proporcionar simplemente como un esteroide no conjugado tal como colesterol.

Los métodos adecuados para preparar liposomas a partir de mezclas de lípidos son bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., 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 tratamiento con ultrasonidos descritos en los mismos. Un método de ejemplo para preparar liposomas para usar en la presente invención, que comprende secar una mezcla de lípidos, seguido de hidratación en un vehículo acuoso y tratamiento con ultrasonidos para formar liposomas, se describe en el documento WO2010/104833.

En ciertas realizaciones, los liposomas se proporcionan dentro de un intervalo de tamaño medio particular. El tamaño de los liposomas se puede seleccionar, por ejemplo, por extrusión de un vehículo acuoso que comprende liposomas a través de membranas que tienen un tamaño de poros preseleccionado y recogiendo el material que fluye a través de la membrana. En realizaciones preferidas, los liposomas se seleccionan para que sean sustancialmente entre 50 y 500 nm de diámetro, más preferiblemente sustancialmente entre 50 y 200 nm de diámetro, y lo más preferiblemente sustancialmente entre 50 y 150 nm de diámetro. El término "sustancialmente", como se usa en la presente memoria, en este contexto significa que al menos 75%, más preferiblemente 80%, y lo más preferiblemente al menos 90% de los liposomas están dentro del intervalo indicado.

Otros adyuvantes lipídicos y tipo lípidos que pueden ser útiles en la presente invención incluyen emulsiones de aceite en agua (ac/ag) (véase, p. ej., Muderhwa et al., *J. Pharmaceut. Sci.* 88: 1332-9, 1999), VesiVax®; TLR (Molecular Express, Inc.), digitonina (véase, p. ej., la patente de EE.UU. 5698432), y lípidos de glucopiranosilo (véase, p. ej., la solicitud de patente de Estados Unidos 20100310602).

Agentes quimioterapéuticos

En realizaciones adicionales, los métodos además implican administrar al sujeto una cantidad eficaz de uno o más

productos quimioterapéuticos como un tratamiento adicional. En ciertas realizaciones, uno o más agentes quimioterapéuticos se seleccionan de acetato de abiraterona, altretamina, anhidrovinblastina, auristatina, bexaroteno, bicalutamida, BMS 184476, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-metoxifenil)benzenosulfonamida, bleomicina, N,N-dimetil-L-valil-L-valil-N-metil-L-valil-L-proli-1-Lprolina-t-butilamida, caquectina, cemadotina, clorambucilo, ciclofosfamida, 3',4'-dideshidro-4'-desoxi-8'-norvin-caleukoblastina, docetaxol, doxetaxel, ciclofosfamida, carboplatino, carmustina, cisplatino, criptoficina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, daunorubicina, decitabina dolastatina, doxorubicina (adriamicina), etopósido, 5-fluorouracilo, finasteride, flutamida, hidroxurea e hidroxureataxanos, ifosfamida, liarozol, lonidamina, lomustina (CCNU), MDV3100, mecloretamina (mostaza nitrogenada), melfalán, isetionato de mivobulina, rizoxina, sertenef, estreptozocina, mitomicina, metotrexato, taxanos, nilutamida, onapristona, paclitaxel, prednimustina, procarbazona, RPR109881, fosfato de estramustina, tamoxifeno, tasonermina, taxol, tretinoina, vinblastina, vincristina, sulfato de vindesina y vinflunina.

Líneas celulares inmunomoduladoras

Por "célula tumoral inactivada" se entiende una célula tumoral (sea "autóloga" o "alógena" respecto al paciente) que se ha tratado para prevenir la división de las células. Para los fines de la presente invención, dichas células conservan su inmunogenicidad y su actividad metabólica. Dichas células tumorales se modifican genéticamente para expresar un transgén que es expresado dentro de un paciente como parte de la terapia del cáncer. Por lo tanto, una composición o vacuna de la descripción comprende células neoplásicas (p. ej., tumorales) que son autólogas o alogénicas respecto al paciente que experimenta el tratamiento y lo más preferiblemente del mismo tipo de la célula tumoral que afecta al paciente. Por ejemplo, a un paciente que padece un melanoma se le administrará típicamente una célula genéticamente modificada derivada de un melanoma. Los métodos para inactivar células tumorales tales como el uso de irradiación, son bien conocidos en la técnica.

Las células tumorales inactivadas se administran al paciente junto con una o más moléculas o agentes coestimuladores. Un agente coestimulador preferido comprende una o más citoquinas que estimulan la inducción, reclutamiento y/o maduración de células dendríticas. Los métodos para evaluar dichos agentes coestimuladores son bien conocidos en la bibliografía. La inducción y maduración de DC se evalúa típicamente por la mayor expresión de determinadas moléculas de membrana tales como CD80 y CD86 y/o secreción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-12 e interferones de tipo I, después de estimulación.

En casos preferidos, se modifican las propias células tumorales inactivadas para expresar y secretar una o más citoquinas que estimulan la inducción, reclutamiento y/o maduración de células dendríticas. La presente descripción se describe en términos de ejemplo con respecto al uso de GM-CSF. Por lo tanto, a modo de ejemplo, la célula tumoral puede expresar un transgén que codifica el GM-CSF como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5,637,483, 5,904,920, 6,277,368 y 6,350,445, así como en la publicación de patente de EE.UU. nº 20100150946. Una forma de células de cáncer genéticamente modificadas que expresan GM-CSF o una "vacuna celular que expresa citoquinas" para el tratamiento del cáncer pancreático, se describe en las patentes de EE.UU. nº 6,033,674 y 5,985,290.

Otras citoquinas adecuadas que pueden ser expresadas por dichas células tumorales inactivadas y/o células espectadoras (*bystander*) en lugar de, o junto con el GM-CSF incluyen, pero no se limitan a uno o más de ligando CD40, IL-12, CCL3, CCL20 y CCL21. No se pretende que esta lista sea limitante.

Aunque se prefiere que las células tumorales inactivadas administradas al sujeto expresen una o más citoquinas de interés, la línea celular tumoral puede estar acompañada de una línea de células espectadoras inactivadas que expresan y secretan una o más citoquinas que estimulan la inducción, reclutamiento y/o maduración de células dendríticas. La línea de células espectadoras puede proporcionar todas las citoquinas que estimulan la inducción, reclutamiento y/o maduración de células dendríticas, o puede añadir citoquinas que estimulan la inducción, reclutamiento y/o maduración de células dendríticas expresadas y secretadas por las células tumorales inactivas. A modo de ejemplo, las líneas de células espectadoras que expresan citoquinas inmunomoduladoras se describen en las patentes de EE.UU. nº 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 factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)" se entiende una citoquina o su fragmento que tiene actividad inmunomoduladora y que tiene al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia de aminoácidos con el nº de acceso en GenBank AAA52122.1.

Vacunas

En algunas realizaciones, las composiciones de CDN se administran conjuntamente con una o más vacunas dirigidas a estimular una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos predeterminados. Se citan en la siguiente tabla ejemplos de antígenos diana que pueden ser útiles en la invención. El antígeno diana también puede ser un fragmento o polipéptido de fusión que comprende una parte inmunológicamente activa de los antígenos citados en la tabla. No se pretende que esta lista sea limitante.

Tabla 1. Antígenos

Antígeno	Referencia
Antígenos tumorales	
Mesotelina	GenBank nº de acceso NM_005823; U40434; NM_013404; BC003512 (véase también, p. ej., Hassan, et al. (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:3937-3942; Muminova, et al. (2004) <i>BMC Cancer</i> 4:19; Iacobuzio-Donahue, et al. (2003) <i>Cancer Res.</i> 63:8614-8622).
Proteína asociada al tumor de Wilms-1 (Wt-1), incluyendo isoforma A; isoforma B; isoforma C; isoforma D.	WT-1 isoforma A (GenBank nº de acceso NM_000378: NP_000369). WT-1 isoforma B (GenBank nº de acceso NM_024424: NP_077742). WT-1 isoforma C (GenBank nº de acceso NM_024425: NP_077743). WT-1 isoforma D (GenBank nº de acceso NM_024426: NP_077744).
Enzima quimiotriptica del estado córneo (SCCE), y sus variantes.	GenBank nº de acceso NM_005046; NM_139277; AF332583. Véase también, p. ej., Bondurant, et al. (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:3446-3454; Santin, et al. (2004) <i>Gynecol. Oncol.</i> 94:283-288; Shigemasa, et al. (2001) <i>Int. J. Gynecol. Cancer</i> 11:454-461; Sepehr, et al. (2001) <i>Oncogene</i> 20:7368-7374.
Proteína A relacionada con cadena de MHC de clase I (MICA); Proteína A relacionada con cadena de MHC de clase I (MICB);	Véase, p. ej., Groh, et al. (2005) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102:6461-6466; GenBank nº de acceso NM_000247; BC_016929; AY750850; NM_005931.
Gastrina y péptidos derivados de gastrina; receptor de gastrina/CCK-2 (también conocido como CCK-B).	Harris, et al. (2004) <i>Cancer Res.</i> 64:5624-5631; Gilliam, et al. (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, p. ej., carcinoma hepatocelular y melanoma).	GenBank nº de acceso NM_004484. Nakatsura, et al. (2003) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 306:16-25; Capurro, et al. (2003) <i>Gastroenterol.</i> 125:89-97; Nakatsura, et al. (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:6612-6621).
Proteína similar a coactosina.	Nakatsura, et al. (2002) <i>Eur. J. Immunol.</i> 32:826-836; Laheru y Jaffee (2005) <i>Nature Reviews Cancer</i> 5:459-467.
Antígeno de citoblastos de la próstata (PSCA).	GenBank nº de acceso AF043498; AR026974; AR302232 (véase también, p. ej., Argani, et al. (2001) <i>Cancer Res.</i> 61:4320-4324; Christiansen, et al. (2003) <i>Prostate</i> 55:9-19; Fuessel, et al. (2003) 23:221-228).
Fosfatasa ácida prostática (PAP); Antígeno prostático específico (PSA); PSM; PSMA.	Small, et al. (2000) <i>J. Clin. Oncol.</i> 18:3894-3903; Altwein y Luboldt (1999) <i>Urol. Int.</i> 63:62-71; Chan, et al. (1999) <i>Prostate</i> 41:99-109; Ito, et al. (2005) <i>Cancer</i> 103:242-250; Schmittgen, et al. (2003) <i>Int. J. Cancer</i> 107:323-329; Millon, et al. (1999) <i>Eur. Urol.</i> 36:278-285.
Antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata (STEAP).	Véase, p. ej., Machlenkin, et al. (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442; GenBank nº de acceso NM_018234; NM_001008410; NM_182915; NM_024636; NM_012449; BC011802.
Antígeno tumoral de carcinoma de próstata-1 (PCTA-1).	Véase, p. ej., Machlenkin, et al. (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442; GenBank nº de acceso L78132.
Gen inductor del tumor de próstata-1 (PTI-1).	Véase, p. ej., Machlenkin, et al. (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442).
Gen específico de la próstata con homología con el receptor acoplado a proteína G.	Véase, p. ej., Machlenkin, et al. (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442).
Prostasa (una serina proteasa regulada por andrógenos).	Véase, p. ej., Machlenkin, et al. (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442; GenBank nº de acceso BC096178; BC096176; BC096175.

Antígeno	Referencia
Antígenos tumorales	
Proteinasa 3.	GenBank nº de acceso X55668.
Antígenos de cáncer testicular, p. ej., 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.	GenBank nº de acceso NM_001327 (NY-ESO-1) (véase también, p. ej., Li, et al. (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:1809-1814; Chen, et al. (2004) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i> 101(25):9363-9368; Kubuschok, et al. (2004) <i>Int. J. Cancer.</i> 109:568-575; Scanlan, et al. (2004) <i>Cancer Immun.</i> 4:1; Scanlan, et al. (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047; Scanlan, et al. (2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164; Dalerba, et al. (2001) <i>Int. J. Cancer</i> 93:85-90; Ries, et al. (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, et al. (2001) <i>Cancer Res.</i> 61:6682-6687; Lee, et al. (2003) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 100:2651-2656; Sarcevic, et al. (2003) <i>Oncology</i> 64:443-449; Lin, et al. (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, et al. (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:3157-3165; Scarcella, et al. (1999) <i>Clin. Cancer Res.</i> 5:335-341.
HIP1R; LMNA; KIAA1416; Seb4D; KNSL6; TRIP4; MBD2; HCAC5; MAGEA3.	Scanlan, et al. (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047.
familia DAM de genes, p. ej., DAM-1; DAM-6.	Fleishhauer, et al. (1998) <i>Cancer Res.</i> 58:2969-2972.
RCAS1.	Enjoji, et al. (2004) <i>Dig. Dis. Sci.</i> 49:1654-1656.
RU2.	Van Den Eynde, et al. (1999) <i>J. Exp. Med.</i> 190:1793-1800.
CAMEL.	Slager, et al. (2004) <i>J. Immunol.</i> 172:5095-5102; Slager, et al. (2004) <i>Cancer Gene Ther.</i> 11:227-236.
Antígenos asociados con el cáncer de colon, p. ej., 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, et al. (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047.
N-Acetilglucosaminil-transferasa V (GnT-V).	Dosaka-Akita, et al. (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:1773-1779.
Factor de elongación 2 mutado (ELF2M).	Renkvist, et al. (2001) <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 50:3-15.
HOM-MEL-40/SSX2	Neumann, et al. (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 112:661-668; Scanlan, et al. (2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164.
BRDT.	Scanlan, et al. (2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164.
SAGE; HAGE.	Sasaki, et al. (2003) <i>Eur. J. Surg. Oncol.</i> 29:900-903.
RAGE.	Véase, p. ej., Li, et al. (2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 164:1389-1397; Shirasawa, et al. (2004) <i>Genes to Cells</i> 9:165-174.
MUM-1 (melanoma ubicuo mutado); MUM-2; MUM-2 mutación Arg-Gly; MUM-3.	Gueguen, et al. (1998) <i>J. Immunol.</i> 160:6188-6194; Hirose, et al. (2005) <i>Int. J. Hematol.</i> 81:48-57; Baurain, et al. (2000) <i>J. Immunol.</i> 164:6057-6066; Chiari, et al. (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:5785-5792.
Antígeno de proteína de fusión LDLR/FUT de melanoma.	Wang, et al. (1999) <i>J. Exp. Med.</i> 189:1659-1667.
Series NY-REN de antígenos de cáncer renal.	Scanlan, et al. (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047; Scanlan, et al. (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:456-464.

Antígeno	Referencia
Antígenos tumorales	
Series NY-BR de antígenos de cáncer de mama, p. ej., NY-BR-62; NY-BR-75; NY-BR-85; NY-BR-62; NY-BR-85.	Scanlan, et al. (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047; Scanlan, et al. (2001) <i>Cancer Immunity</i> 1:4.
BRCA-1; BRCA-2.	Stolier, et al. (2004) <i>Breast J.</i> 10:475-480; Nicoletto, et al. (2001) <i>Cancer Treat Rev.</i> 27:295-304.
Proteína de fusión DEK/CAN.	Von Lindern, et al. (1992) <i>Mol. Cell. Biol.</i> 12:1687-1697.
Ras, p. ej., ras de tipo natural, ras con mutaciones en los codones 12, 13, 59 o 61, p. ej., mutaciones G12C; G12D; G12R; G12S; G12V; G13D; A59T; Q61H. K-RAS; H-RAS; N-RAS.	GenBank nº de acceso P01112; P01116; M54969; M54968; P01111; P01112; K00654. véase también, p. ej., GenBank nº de acceso M26261; M34904; K01519; K01520; BC006499; NM_006270; NM_002890; NM_004985; NM_033360; NM_176795; NM_005343.
BRAF (una isoforma de RAF).	Tannapfel, et al. (2005) <i>Am. J. Clin. Pathol.</i> 123:256-2601; Tsao y ober (2005) <i>Dermatol. Clin.</i> 23:323-333.
Antígenos de melanoma, incluyendo antígenos de células de melanoma HST-2.	GenBank nº de acceso NM_206956; NM_206955; NM_206954; NM_206953; NM_006115; NM_005367; NM_004988; AY148486; U10340; U10339; M77481. Véase, p. ej, Suzuki, et al. (1999) <i>J. Immunol.</i> 163:2783-2791.
Survivina	GenBank nº de acceso AB028869; U75285 (véase también, p. ej., Tsuruma, et al. (2004) <i>J. Translational Med.</i> 2:19 (11 páginas); Pisarev, et al. (2003) <i>Clin. Cancer Res.</i> 9:6523-6533; Siegel, et al. (2003) <i>Br. J. Haematol.</i> 122:911-914; Andersen, et al. (2002) <i>Histol. Histopathol.</i> 17:669-675).
MDM-2	NMu002392; NM_006878 (véase también, p. ej., Mayo, et al. (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, et al. (2003) <i>Br. J. Cancer</i> 89:1934-1939; Fang, et al. (2004) <i>World J. Gastroenterol.</i> 10:3394-3398.
NA88-A.	Moreau-Aubry, et al. (2000) <i>J. Exp. Med.</i> 191:1617-1624.
Histona desacetilasas (HDAC), p. ej., HDAC5.	Waltregny, et al. (2004) <i>Eur. J. Histochem.</i> 48:273-290; Scanlan, et al. (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047.
Ciclofilina B (Cyp-B).	Tamura, et al. (2001) <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 92:762-767.
CA 15-3; CA 27.29.	Clinton, et al. (2003) <i>Biomed. Sci. Instrum.</i> 39:408-414.
Proteína de choque térmico Hsp70.	Faure, et al. (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 108:863-870.
Familia de GAGE/PAGE, p. ej., PAGE-1; PAGE-2; PAGE-3; PAGE-4; XAGE-1; XAGE-2; XAGE-3.	Brinkmann, et al. (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, et al. (2000) <i>Int. J. Cancer</i> 87:55-60; Scanlan, et al. (2001) <i>Cancer Immun.</i> 1:4.
Kinesina 2; Factor modulador 1 del elemento TATA; proteína tumoral D53; NY	Scanlan, et al. (2001) <i>Cancer Immun.</i> 30:1-4.
Alfa-fetoproteína (AFP)	Grimm, et al. (2000) <i>Gastroenterol.</i> 119:1104-1112.

Antígeno	Referencia
Antígenos tumorales	
SART1; SART2; SART3; ART4.	Kumamuru, et al. (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 108:686-695; Sasatomi, et al. (2002) <i>Cancer</i> 94:1636-1641; Matsumoto, et al. (1998) <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 89:1292-1295; Tanaka, et al. (2000) <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 91:1177-1184.
Antígeno expresado con preferencia en el melanoma (PRAME).	Matsushita, et al. (2003) <i>Leuk. Lymphoma</i> 44:439-444; Oberthuer, et al. (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:4307-4313.
Antígeno carcinoembrionario (CEA), péptido agonista potenciador de CAP1-6D.	GenBank nº de acceso M29540; E03352; X98311; M17303 (véase también, p. ej., Zaremba (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:4570-4577; Sarobe, et al. (2004) <i>Curr. Cancer Drug Targets</i> 4:443-454; Tsang, et al. (1997) <i>Clin. Cancer Res.</i> 3:2439-2449; Fong, et al. (2001) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 98:8809-8814).
HER-2/neu.	Disis, et al. (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, et al. (2005) <i>Respiration</i> 72:68-73; Ericson, et al. (2003) <i>Mol. Cancer Res.</i> 1:654-664.
TEL; AML1; TEL/AML1.	Stams, et al. (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:2974-2980.
Telomerasa (TERT).	Nair, et al. (2000) <i>Nat. Med.</i> 6:1011-1017.
707-AP.	Takahashi, et al. (1997) <i>Clin. Cancer Res.</i> 3:1363-1370.
Anexina, p. ej., Anexina II.	Zimmerman, et al. (2004) <i>Virchows Arch.</i> 445:368-374.
BCR/ABL; BCR/ABL p210; BCR/ABL p190; CML-66; CML-28.	Cobaldda, et al. (2000) <i>Blood</i> 95:1007-1013; Hakansson, et al. (2004) <i>Leukemia</i> 18:538-547; Schwartz, et al. (2003) <i>Semin. Hematol.</i> 40:87-96; Lim, et al. (1999) <i>Int. J. Mol. Med.</i> 4:665-667.
BCL2; BLC6; proteína CD10.	Iqbal, et al. (2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 165:159-166.
CDC27 (este es un antígeno de melanoma).	Wang, et al. (1999) <i>Science</i> 284:1351-1354.
Proteína de esperma 17 (SP17); 14-3-3-zeta; MEMD; KIAA0471; TC21.	Arora, et al. (2005) <i>Mol. Carcinog.</i> 42:97-108.
Proteínas relacionadas con tirosinasa 1 y 2 (TRP-1 y TRP-2).	GenBank nº de acceso NM_001922. (véase también, p. ej., Bronte, et al. (2000) <i>Cancer Res.</i> 60:253-258).
Gp100/pmel-17.	GenBank Acc. Nos. AH003567; U31798; U31799;U31807; U31799 (véase también, p. ej., Bronte, et al. (2000) <i>Cancer Res.</i> 60:253-258).
TARP.	Véase, p. ej., Clifton, et al. (2004) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 101:10166-10171; Virok, et al. (2005) <i>Infection Immunity</i> 73:1939-1946.
Proteínas relacionadas con tirosinasa 1 y 2 (TRP-1 y TRP-2).	GenBank nº de acceso NM_001922. (véase también, p. ej., Bronte, et al. (2000) <i>Cancer Res.</i> 60:253-258).
Receptor de melanocortina 1 (MC1R); MAGE-3; gp100; tirosinasa; dopacroma tautomerasa (TRP-2); MART-1.	Salazar-Onfray, et al. (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:4348-4355; Reynolds, et al. (1998) <i>J. Immunol.</i> 161:6970-6976; Chang, et al. (2002) <i>Clin. Cancer Res.</i> 8:1021-1032.
MUC-1; MUC-2.	Véase, p. ej., Davies, et al. (1994) <i>Cancer Lett.</i> 82:179-184; Gambus, et al. (1995) <i>Int. J. Cancer</i> 60:146-148; McCool, et al. (1999) <i>Biochem. J.</i> 341:593-600.
Spas-1.	Solicitud de patente publicada de EE.UU. nº 20020150588 de Allison, et al.

Antígeno	Referencia
Antígenos tumorales	
CASP-8; FLICE; MACH.	Mandrizzato, et al. (1997) <i>J. Exp. Med.</i> 186:785-793.
CEACAM6; CAP-1.	Duxbury, et al. (2004) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 317:837-843; Morse, et al. (1999) <i>Clin. Cancer Res.</i> 5:1331-1338.
HMGB1 (una proteína de unión a ADN y citoquina).	Brezniceanu, et al. (2003) <i>FASEB J.</i> 17:1295-1297.
ETV6/AML1.	Codrington, et al. (2000) <i>Br. J. Haematol.</i> 111:1071-1079.
Formas mutantes y de tipo natural de poliposis adenomatosa coli (APC); beta-catenina; c-met; p53; E-caderina; ciclooxygenasa-2 (COX-2).	Clements, et al. (2003) <i>Clin. Colorectal Cancer</i> 3:113-120; Gulmann, et al. (2003) <i>Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.</i> 11:230-237; Jungck, et al. (2004) <i>Int. J. Colorectal. Dis.</i> 19:438-445; Wang, et al. (2004) <i>J. Surg. Res.</i> 120:242-248; Abutaily, et al. (2003) <i>J. Pathol.</i> 201:355-362; Liang, et al. (2004) <i>Br. J. Surg.</i> 91:355-361; Shirakawa, et al. (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:4342-4348.
Antígeno de carcinoma de células renales unido por mAB G250.	Mulders, et al. (2003) <i>Urol. Clin. North Am.</i> 30:455-465; Steffens, et al. (1999) <i>Anticancer Res.</i> 19:1197-1200.
EphA2	Véase, p. ej., publicación de patente de EE.UU. nº 2005/0281783 A1; Genbank nº de acceso NM_004431 (humano); Genbank nº de acceso NM_010139 (ratón); Genbank nº de acceso AB038986 (pollo, secuencia parcial); GenBank nº de acceso NP_004422, AAH37166, y AAA53375 (humano); GenBank nº de acceso NP_034269 (ratón), AAH06954 (ratón), XP_345597 (rata) y BAB63910 (pollo).
EGFRvIII	Véase, p. ej., WO/2012/068360
Antígenos de <i>Francisella tularensis</i>	
<i>Francisella tularensis</i> A y B.	Genoma completo de la subespecie Schu S4 (GenBank nº de acceso AJ749949); de la subespecie Schu 4 (GenBank nº de acceso NC_006570). Proteína de la membrana externa (43 kDa) Bevanger, et al. (1988) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 27:922-926; Porsch-Ozcuremez, et al. (2004) <i>Clin. Diagnostic. Lab. Immunol.</i> 11:1008-1015). Los componentes antigénicos de <i>F. tularensis</i> incluyen, p. ej., 80 antígenos, que incluyen las chaperoninas de 10 kDa y 60 kDa (Havlasova, et al. (2002) <i>Proteomics</i> 2:857-86), nucleósido difosfato quinasa, isocitrato deshidrogenasa, proteína de unión a ARN Hfq, la chaperona ClpB (Havlasova, et al. (2005) <i>Proteomics</i> 5:2090-2103). véase también, p. ej., Oyston y Quarry (2005) Antonie Van Leeuwenhoek 87:277-281; Isherwood, et al. (2005) <i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i> 57:1403-1414; Biagini, et al. (2005) <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 382:1027-1034.
Antígenos de la malaria	
Proteína circumsporozoito (CSP); SSP2; HEP17; orólogos Exp-1 encontrados en <i>P. falciparum</i> ; y LSA-1.	Véase, p. ej., Haddad, et al. (2004) <i>Infection Immunity</i> 72:1594-1602; Hoffman, et al. (1997) <i>Vaccine</i> 15:842-845; Oliveira-Ferreira y Daniel-Ribeiro (2001) <i>Mem. Inst. Oswaldo Cruz</i> , Rio de Janeiro 96:221-227. CSP (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AB 121024). SSP2 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AF249739). LSA-1 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso Z30319).
Proteína de la superficie del eritrocito en forma de anillo infectado (RESA); proteína de superficie del merozoíto 2 (MSP2); Spf66; proteína de superficie del merozoíto 1 (MSP1); 195A; BVp42.	Véase, p. ej., Stirnadel, et al. (2000) <i>Int. J. Epidemiol.</i> 29:579-586; Krzych, et al. (1995) <i>J. Immunol.</i> 155:4072-4077. Véase también, Good, et al. (2004) <i>Immunol. Rev.</i> 201:254-267; Good, et al. (2004) <i>Ann. Rev. Immunol.</i> 23:69-99. MSP2 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso X96399; X96397). MSP1 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso X03371). RESA (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso X05181; X05182).

Antígeno de membrana apical 1 (AMA1).	Véase, p. ej., Gupta, et al. (2005) <i>Protein Expr. Purif.</i> 41:186-198. AMA1 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso A'13; AJ494905; AJ490565).
---------------------------------------	--

Virus y antígenos víricos	
Hepatitis A	GenBank nº de acceso, p. ej., NC_001489; AY644670; X83302; K02990; M14707.
Hepatitis B	Genoma completo (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AB214516; NC_003977; AB205192; AB205191; AB205190; AJ748098; AB198079; AB198078; AB198076; AB074756).
Hepatitis C	Genoma completo (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_004102; AJ238800; AJ238799; AJ132997; AJ132996; AJ000009; D84263).
Hepatitis D	GenBank nº de acceso, p. ej. NC_001653; AB118847; AY261457.
Papilomavirus humano, incluyendo todos los subtipos 200+ (clasificados en 16 grupos), tales como los subtipos de riesgo alto 16,18,30,31,33,45.	Véase, p. ej., Trimble, et al. (2003) <i>Vaccine</i> 21:4036-4042; Kim, et al. (2004) <i>Gene Ther.</i> 11:1011-1018; Simon, et al. (2003) <i>Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.</i> 109:219-223; Jung, et al. (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, et al. (2004) <i>Virology</i> 324:17-24; Hussain y Paterson (2005) <i>Cancer Immunol. Immunother.</i> 54:577-586; Molijn, et al. (2005) <i>J. Clin. Virol.</i> 32 (Suppl. 1) S43-S51. GenBank nº de acceso AY686584; AY686583; AY686582; NC_006169; NC_006168; NC_006164; NC_001355; NC_001349; NC_005351; NC_001596).
Virus linfotrófico de células T humanas (HTLV) tipos I y II, que incluyen el HTLV tipo I subtipos Cosmopolita, de África central y de Australia-Melanesia, y el HTLV tipo II subtipos lia, lib, lic y lid.	Véase, p. ej., Capdepon, et al. (2005) <i>AIDS Res. Hum. Retrovirus</i> 21:28-42; Bhigjee, et al. (1999) <i>AIDS Res. Hum. Retrovirus</i> 15:1229-1233; Vandamme, et al. (1998) <i>J. Virol.</i> 72:4327-4340; Vallejo, et al. (1996) <i>J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.</i> 13:384-391. HTLV tipo I (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY563954; AY563953. HTLV tipo II (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso L03561; Y13051; AF139382).
Coronaviridae, incluyendo Coronavirus, tales como SARS-coronavirus (SARS-CoV), y Torovirus.	Véase, p. ej., Brian and Baric (2005) <i>Curr. Top. Microbiol. Immunol.</i> 287:1-30; Gonzalez, et al. (2003) <i>Arch. Virol.</i> 148:2207-2235; Smits, et al. (2003) <i>J. Virol.</i> 77:9567-9577; Jamieson, et al. (1998) <i>J. Infect. Dis.</i> 178:1263-1269 (GenBank nº de acceso AY348314; NC_004718; AY394850).
Virus de la rubeola.	GenBank nº de acceso NC_001545; AF435866.
Virus de las paperas, incluyendo los genotipos A, C, D, G, H e I.	Véase, p. ej., Orvell, et al. (2002) <i>J. Gen. Virol.</i> 83:2489-2496. Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY681495; NC_002200; AY685921; AF201473.
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, p. ej., Brown, et al. (2003) <i>J. Virol.</i> 77:8973-8984. GenBank nº de acceso AY421768; AY790926; X67706.
Virus de coxsackie B, incluyendo los subtipos 1-6.	Véase, p. ej., Ahn, et al. (2005) <i>J. Med. Virol.</i> 75:290-294; Patel, et al. (2004) <i>J. Virol. Methods</i> 120:167-172; Rezig, et al. (2004) <i>J. Med. Virol.</i> 72:268-274. GenBank nº de acceso X05690.

Virus y antígenos víricos	
Enterovirus humanos que incluyen, p. ej., enterovirus humano A (HEV-A, CAV2 a CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16 y EV71) y que incluyen también 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, p. ej., Oberste, et al. (2004) <i>J. Virol.</i> 78:855-867. Enterovirus humano A (GenBank nº de acceso NC_001612); enterovirus humano B (NC_001472); enterovirus humano C (NC_001428); enterovirus humano D (NC_001430). Enterovirus de simio A (GenBank nº de acceso NC_003988).
Poliovirus que incluyen PV1, PV2 y PV3.	Véase, p. ej., He, et al. (2003) <i>J. Virol.</i> 77:4827-4835; Hahsido, et al. (1999) <i>Microbiol. Immunol.</i> 43:73-77. GenBank nº de acceso AJ132961 (tipo 1); AY278550 (tipo 2); X04468 (tipo 3).
Virus de la encefalitis viral, que incluyen encefalitis equina, encefalitis equina venezolana (VEE) (que incluyen los subtipos IA, IB, IC, ID, IIIC, IIID), encefalitis equina oriental (EEE), encefalitis equina occidental (WEE), encefalitis de St. Louis, encefalitis del Valle de Murray (australiana), encefalitis japonesa, y encefalitis transmitida por garrapatas.	Véase, p. ej., Hoke (2005) <i>Mil. Med.</i> 170:92-105; Estrada-Franco, et al. (2004) <i>Emerg. Infect. Dis.</i> 10:2113-2121; Das, et al. (2004) <i>Antiviral Res.</i> 64:85-92; Aguilar, et al. (2004) <i>Emerg. Infect. Dis.</i> 10:880-888; Weaver, et al. (2004) <i>Arch. Virol. Suppl.</i> 18:43-64; Weaver, et al. (2004) <i>Annu. Rev. Entomol.</i> 49:141-174. Encefalitis equina oriental (GenBank nº de acceso NC_003899; AY722102); encefalitis equina occidental (NC_003908).
Herpesvirus humanos, que incluyen citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), herpesvirus humano-1 (HHV-1), HHV-2, HHV-3, HHV-4, HHV-5, HHV-6, HHV-7, HHV-8, virus del herpes B, virus del herpes simple tipos 1 y 2 (HSV-1, HSV-2), y virus de varicela zóster (VZV).	Véase, p. ej., Studahl, et al. (2000) <i>Scand. J. Infect. Dis.</i> 32:237-248; Padilla, et al. (2003) <i>J. Med. Virol.</i> 70 (Suppl. 1) S103-S110; Jankittivong y Langlais (1998) <i>Oral Surg. Oral Med.</i> 85:399-403. GenBank nº NC_001806 (herpesvirus 1); NC_001798 (herpesvirus 2); X04370 y NC_001348 (herpesvirus 3); NC_001345 (herpesvirus 4); NC_001347 (herpesvirus 5); X83413 y NC_000898 (herpesvirus 6); NC_001716 (herpesvirus 7). Los herpesvirus humanos tipos 6 y 7 (HHV-6; HHV-7) se describen, p. ej., en Padilla, et al. (2003) <i>J. Med. Virol.</i> 70 (Suppl. 1)S103-S110. El herpesvirus humano 8 (HHV-8), incluyendo los subtipos A-E, se describen, p. ej., en Treurnicht, et al. (2002) <i>J. Med. Virol.</i> 66:235-240.
HIV-1 incluyendo el grupo M (incluyendo los subtipos A a J) y grupo O (incluyendo cualquier subtipo diferenciable) (HIV-2, incluyendo los subtipos A-E).	Véase, p. ej., Smith, et al. (1998) <i>J. Med. Virol.</i> 56:264-268. véase también, p. ej., GenBank nº de acceso DQ054367; NC_001802; AY968312; DQ011180; DQ011179; DQ011178; DQ011177; AY588971; AY588970; AY781127; AY781126; AY970950; AY970949; AY970948; X61240; AJ006287; AJ508597; y AJ508596.
Virus de Epstein-Barr (EBV), incluyendo los subtipos A y B.	Véase, p. ej., Peh, et al. (2002) <i>Pathology</i> 34:446-450. Virus de Epstein-Barr cepa B95-8 (GenBank nº de acceso V01555).
Reovirus, incluyendo los serotipos y cepas 1, 2 y 3, tipo 1 Lang, tipo 2 Jones y tipo 3 Dearing.	Véase, p. ej., Barthold, et al. (1993) <i>Lab. Anim. Sci.</i> 43:425-430; Roner, et al. (1995) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 92:12362-12366; Kedl, et al. (1995) <i>J. Virol.</i> 69:552-559. GenBank nº de acceso K02739 (proteína de superficie del gen sigma-3).
Subtipos de citomegalovirus (CMV) que incluyen los CMV subtipos I-VII.	Véase, p. ej., Chern, et al. (1998) <i>J. Infect. Dis.</i> 178:1149-1153; Vilas Boas, et al. (2003) <i>J. Med. Virol.</i> 71:404-407; Trincado, et al. (2000) <i>J. Med. Virol.</i> 61:481-487. GenBank nº de acceso X17403.
Rinovirus, incluyendo todos los serotipos.	Rinovirus humano 2 (GenBank nº de acceso X02316); Rinovirus humano B (GenBank nº de acceso NC_001490); Rinovirus humano 89 (GenBank nº de acceso NC_001617); Rinovirus humano 39 (GenBank nº de acceso 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.

Virus y antígenos víricos	
Filovirus, incluyendo el virus de Marburg y virus del ébola, y cepas tales como Ébola-Sudán (EBO-S), Ébola-Zaire (EBO-Z), y Ébola-Reston (EBO-R).	Véase, p. ej., Geisbert y Jahrling (1995) <i>Virus Res.</i> 39:129-150; Hutchinson, et al. (2001) <i>J. Med. Virol.</i> 65:561-566. Virus de Marburg (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_001608). Virus del ébola (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_006432; AY769362; NC_002549; AF272001; AF086833).
Arenaviruses, incluyendo el virus de coriomeningitis linfocítica (LCM), virus de Lassa, virus Junin y virus Machupo.	Virus Junin, segmento S (GenBank nº de acceso NC_005081); virus Junin, segmento L (GenBank nº de acceso NC_005080).
Virus de la rabia.	Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_001542; AY956319; AY705373; AF499686; AB128149; AB085828; AB009663.
Arbovirus, incluyendo virus del Nilo occidental, virus del dengue 1 a 4, virus de la fiebre por garrapatas de Colorado, virus Sindbis, Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, y similares.	Virus del dengue tipo 1 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AB195673; AY762084). Virus del dengue tipo 2 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_001474; AY702040; AY702039; AY702037). Virus del dengue tipo 3 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY923865; AT858043). Virus del dengue tipo 4 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY947539; AY947539; AF326573). Virus Sindbis (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_001547; AF429428; J02363; AF103728). Virus del Nilo occidental (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_001563; AY603654).
Poxvirus incluyendo orthopoxvirus (virus de la viruela, virus de la viruela del mono, virus vaccinia, virus de la viruela vacuna), yatapoxvirus (virus tanapox, virus del tumor de mono de Yaba), parapoxvirus, y molluscipoxvirus.	Virus de la viruela (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_001611; Y16780; X72086; X69198).
Fiebre amarilla.	Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_002031; AY640589; X03700.
Hantavirus, que incluyen los serotipos Hantaan (HTN), Seoul (SEO), Dobrava (DOB), Sin Nombre (SN), Puumala (PUU) y Dobrava-like Saaremaa (SAAV).	Véase, p. ej., Elgh, et al. (1997) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 35:1122-1130; Sjolander, et al. (2002) <i>Epidemiol. Infect.</i> 128:99-103; Zeier, et al. (2005) <i>Virus Genes</i> 30:157-180. GenBank nº de acceso NC_005222 y NC_005219 (Hantavirus). véase también, p. ej., GenBank nº de acceso NC_005218; NC_005222; NC_005219.
Flavivirus, incluyendo el virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus del Nilo occidental, y virus de la fiebre amarilla.	Véase, p. ej., Mukhopadhyay, et al. (2005) <i>Nature Rev. Microbiol.</i> 3:13-22. GenBank nº de acceso NC_001474 y AY702040 (Dengue). GenBank nº de acceso NC_001563 y AY603654.
Virus del sarampión.	Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AB040874 y AY486084.
Virus parainfluenza humanos (HPV), incluyendo HPV tipos 1-56.	Virus parainfluenza humano 2 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AB176531; NC003443). Virus parainfluenza humano 3 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso NC_001796).
Virus influenza, incluyendo los virus influenza tipos A, B y C.	Nucleocápside de influenza (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY626145). Hemaglutinina de influenza (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY627885; AY555153). Neuraminidasa de influenza (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY555151; AY577316). Proteína 2 de la matriz de influenza (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY626144). Proteína básica 1 de influenza (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY627897). Proteína de polimerasa ácida de influenza (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY627896). Nucleoproteína de influenza (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY627895).

Virus y antígenos víricos	
Subtipos del virus influenza A, p. ej., virus porcinos (SIV): H1N1 influenza A y virus influenza porcino.	Hemaglutinina de H1N1 (GenBank nº de acceso S67220). Proteína de la matriz del virus influenza A (GenBank nº de acceso AY700216). Nucleoproteína de virus influenza A H5H1 (GenBank nº de acceso AY646426). Hemaglutinina de H1N1 (GenBank nº de acceso D00837). Véase también, GenBank nº de acceso BD006058; BD006055; BD006052. Véase también, p. ej., Wentworth, et al. (1994) <i>J. Virol.</i> 68:2051-2058; Wells, et al. (1991) <i>J.A.M.A.</i> 265:478-481.
Virus sincitial respiratorio (RSV), incluyendo el subgrupo A y subgrupo B.	Virus sincitial respiratorio (RSV) (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY353550; NC_001803; NC001781).
Rotaviruses, incluyendo los rotavirus humanos A a E, rotavirus bovinos, rotavirus de mono rhesus y reclasificaciones de RVV humano.	Rotavirus humano C segmento 8 (GenBank nº de acceso AJ549087); proteína de la cápside exterior de la cepa del rotavirus humano G9 (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso DQ056300); proteína 4 no estructural de la cepa del rotavirus humano B (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY548957); proteína de la cápside interior principal de la cepa del rotavirus humano A (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY601554).
Poliomavirus, incluyendo el virus 40 de simio (SV40), virus JC (JCV) y virus BK (BKV).	Véase, p. ej., Engels, et al. (2004) <i>J. Infect. Dis.</i> 190:2065-2069; Vilchez y Butel (2004) <i>Clin. Microbiol. Rev.</i> 17:495-508; Shivapurkar, et al. (2004) <i>Cancer Res.</i> 64:3757-3760; Carbone, et al. (2003) <i>Oncogene</i> 2:5173-5180; Barbanti-Brodano, et al. (2004) <i>Virology</i> 318:1-9) (genoma completo de SV40 en, p. ej., GenBank nº de acceso NC_001669; AF168994; AY271817; AY271816; AY120890; AF345344; AF332562).
Coltivirus, incluyendo virus de la fiebre de garrapatas de Colorado, virus Eyach.	Attoui, et al. (1998) <i>J. Gen. Virol.</i> 79:2481-2489. Segmentos del virus Eyach (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso 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 Montaña Nevada (SMA) y Saaporo.	Virus de Montaña Nevada (Véase, p. ej., GenBank nº de acceso AY134748).
Parvoviridae, incluyendo dependovirus, parvovirus (incluyendo parvovirus B19) y erythrovirus.	Véase, p. ej., Brown (2004) <i>Dev. Biol. (Basel)</i> 118:71-77; Alvarez-Lafuente, et al. (2005) <i>Ann. Rheum. Dis.</i> 64:780-782; Ziyaeyan, et al. (2005) <i>Jpn. J. Infect. Dis.</i> 58:95-97; Kaufman, et al. (2005) <i>Virology</i> 332: 189-198.

- Otros organismos para los que se conocen en la técnica los antígenos adecuados incluyen, pero no se limitan a *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A), *Streptococcus agalactia* (estreptococos del grupo B), *Streptococcus pneumonia*, *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 pneumonia*, especies de *Clostridium* (incluyendo *C. difficile*), *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. No se pretende que esta lista sea limitante.

Composiciones farmacéuticas

- El término "farmacéutico" como se usa en la presente memoria se refiere a una sustancia química dirigida a usar en la cura, tratamiento o prevención de una enfermedad y la cual está sometida a un procedimiento de aprobación por la Administración de Medicamentos y Alimentos de EE.UU. (o su equivalente no EE.UU.) como un fármaco con prescripción o de venta sin receta. Se pueden encontrar detalles sobre las 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 and Marti-Mestres, Pharmaceutical Emulsions and Suspensions: 2ª Edición (Marcel Dekker, Inc, New York).

Para los fines de esta descripción, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por una variedad de

medios que incluyen la vía oral, parenteral, pulverizador por inhalación, tópica o rectal en formulaciones que contienen excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. El término parenteral como se usa en la presente memoria incluye, pero no se limita a inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intradérmicas, intratecales y epidurales con una variedad de técnicas de infusión. La inyección intraarterial e intravenosa, como se usa en la presente memoria, incluye la administración a través de catéteres. También está contemplada la administración por endoprótesis intracoronaria y depósitos intracoronarios. El término oral como se usa en la presente memoria incluye, pero no se limita a ingestión oral, o suministro por una vía sublingual o bucal. La administración oral incluye bebidas fluidas, barritas energéticas, así como formulaciones en píldoras.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para el método de administración previsto. Cuando se usan para uso oral por ejemplo, se pueden preparar comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas o de aceite, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones previstas para uso oral se pueden preparar 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 saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el fin de proporcionar una preparación sabrosa. Los comprimidos que contienen un fármaco mezclado con el excipiente farmacéuticamente aceptable no tóxico, que son adecuados para la fabricación de comprimidos, son aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio o sodio, lactosa, fosfato de calcio o sodio; agentes de granulación y disgregación, tales como almidón de maíz o ácido alginico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes; tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos, o se pueden recubrir por técnicas conocidas que incluyen el recubrimiento entérico, recubrimiento colónico o la microencapsulación para retrasar la disgregación y adsorción en el tracto gastrointestinal y/o proporcionar una acción sostenida a lo largo de un periodo más prolongado. Por ejemplo, se puede usar un material de retardo en el tiempo tal como el monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

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

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como suspensiones acuosas mezcladas con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga, y agentes de dispersión o humectantes tales como un fosfático natural (p. ej., lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileño con un ácido graso (p. ej., estearato polioxietilénico), un producto de condensación de un óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (p. ej., heptadecaetilenoxietanol), un producto de condensación de un óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhidrido de hexitol (p. ej., monooleato de sorbitán polioxietilénico). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular por suspensión del principio activo en un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones orales pueden contener un agente espesante, tal como cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los expuestos antes, y agentes saborizantes para proporcionar una preparación oral sabrosa. Estas composiciones se pueden conservar por la adición de un antioxidante tal como el ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables de la descripción adecuados para preparar una suspensión acuosa por 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 dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados se ilustran mediante los descritos antes. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción 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 no naturales, tales como goma arábiga y goma de tragacanto, fosfátidos naturales, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhidridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitán y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de sorbitán polioxietilénico. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y saborizantes.

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

Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado antes. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una disolución en 1,3-butanodiol o preparada como un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están el agua, disolución de Ringer y disolución isotónica de cloruro sódico. Además, se pueden usar de manera convencional aceites fijos estériles como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede usar cualquier aceite fijo blando incluyendo mono y diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar igualmente ácidos grasos tales como el ácido oleico, en la preparación de productos inyectables.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con el material vehículo para producir una forma farmacéutica individual variará dependiendo del hospedante tratado y el modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación de liberación en el tiempo prevista para administración oral a seres humanos puede contener de aproximadamente 20 a 500 mg del material activo mezclado con una cantidad adecuada y conveniente de material excipiente que puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 95% de las composiciones totales. Se prefiere que la composición farmacéutica se prepare para que proporcione cantidades fácilmente medibles para la administración. Típicamente, una cantidad eficaz para administrar 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 peso del sujeto (p. ej., un mamífero tal como un ser humano), la afección precisa que requiere tratamiento y su gravedad, la vía de administración, y en última instancia será a discreción del médico o veterinario que atiende. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico usado, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del individuo que se va a tratar; el tiempo y vía de administración; la velocidad de excreción; otros fármacos que se han administrado previamente; y la gravedad de la afección particular sometida a terapia, como entenderán bien los expertos en la técnica.

Como se ha indicado antes, las formulaciones de la descripción adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, en forma de un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar como un bolo, electuario o pasta.

Un comprimido se puede hacer por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos por compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma fluida libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante (p. ej., povidona, gelatina, hidroxipropilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (p. ej., glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada) tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos por moldeo se pueden hacer en una máquina adecuada usando una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos opcionalmente se pueden recubrir o ranurar y se pueden formular para proporcionar liberación lenta o controlada del principio activo que se use en los mismos, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en diferentes proporciones 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 distintas del 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 el 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 excipiente líquido adecuado.

Las formulaciones para la administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen además del principio activo excipientes como los que se sabe en la técnica que son adecuados.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles, isotónicas, acuosa y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado liofilizado (congelado-secado) que requiere solo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las disoluciones y suspensiones para inyección se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la clase descrita previamente.

Como se usa en la presente memoria, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a: acetato, piridina, amonio, piperazina, dietilamina, nicotinamida, fórmico, urea, sodio, potasio, calcio, magnesio, cinc, litio, cinámico, metilamino, metanosulfónico, pícrico, tartárico, trietilamino, dimetilamino y tris(hidoximetil)aminometano. Los expertos en la técnica conocen sales farmacéuticamente aceptables adicionales.

- 5 Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se está tratando, la salud general del paciente, la vía y dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Se encuentra disponible una guía para los métodos de tratamiento y diagnóstico (véase, p. ej., 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., London, Reino Unido).

- 10 Se puede dar una cantidad eficaz en una dosis, pero no está restringido a una dosis. Por lo tanto, la administración puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más, administraciones de la composición farmacéutica. Cuando hay más de una administración de una composición farmacéutica en los presentes métodos, las administraciones se pueden espaciar en intervalos de tiempo de un minuto, dos minutos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más minutos, en 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, etc. En el contexto de horas, el término "aproximadamente" significa más o menos cualquier intervalo de tiempo dentro de 30 minutos. Las administraciones también pueden estar separadas en 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 combinaciones de los mismos. La invención no está limitada a intervalos de dosis que están separados de forma equivalente en el tiempo, sino que abarca dosis en intervalos no equivalentes.

- Está disponible para la invención una pauta posológica 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. 25 Las pautas posológicas abarcan un periodo de tiempo total 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 posológicas anteriores. El ciclo se puede repetir aproximadamente, p. ej., 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. Puede haber un intervalo sin administración entre un ciclo, donde el intervalo puede ser aproximadamente, p. ej., 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. 30

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

- 40 Como se ha indicado, las composiciones de la presente invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas para el suministro parenteral o enteral. Una composición farmacéutica típica para administrar a un animal comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como disoluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares. Véase, p. ej., Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15ª Ed., Easton ed., Mack Publishing Co., pág. 1405-1412 y 1461- 1487 (1975); *The National Formulary XIV*, 14ª Ed., 45 American Pharmaceutical Association, Washington, DC (1975). Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los excipientes acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro sódico, dextrosa de Ringer, etc. Los vehículos intravenosos incluyen restablecedores de fluidos y 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 la experiencia rutinaria en la técnica. 50

- Las administraciones repetidas de una vacuna particular (refuerzo homólogo) han demostrado eficacia para el refuerzo de las respuestas humorales. Dicho procedimiento puede no ser eficaz para el refuerzo de la inmunidad celular porque la inmunidad previa al vector tiende a impartir presentación del antígeno robusta y la generación de 55 señales inflamatorias adecuadas. Una estrategia para evitar este problema ha sido la administración secuencial de vacunas que usan diferentes sistemas de suministro de antígeno (refuerzo heterólogo). En un régimen de refuerzo heterólogo, al menos un suministro de sensibilización o refuerzo comprende suministrar composiciones de células tumorales inactivadas/dinucleótidos cíclicos de purina descritos en la presente memoria. El grupo heterólogo del régimen puede comprender el suministro 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 se han tratado con alguna condición de desnaturalización para hacerlas ineficaces en el montaje de una invasión patógena;

5 antígenos purificados, que típicamente son antígenos producidos de forma natural purificados de un cultivo celular del patógeno o una muestra de tejido que contiene el patógeno o una versión recombinante del mismo;

vectores de suministro víricos o bacterianos vivos diseñados de forma recombinante para expresar y/o secretar antígenos en las células hospedantes del sujeto. Estas estrategias se basan en la atenuación (p. ej., por modificación genética) de vectores víricos o bacterianos para que no sean patógenos ni tóxicos.

10 vectores de células presentadoras de antígeno (APC), tales como un vector de células dendríticas (DC), que comprende células que se cargan con un antígeno, o transfectadas con una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el antígeno (p. ej., Provenge®; (Dendreon Corporation) para el tratamiento de cáncer de próstata metastásico resistente a la castración);

vehículos de suministro de antígenos liposomales; y

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

20 Se puede administrar una vacuna de sensibilización y una vacuna de refuerzo por una cualquiera o una combinación de las siguientes rutas. 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" abarca, pero no se limita a diferentes sitios en el cuerpo, por ejemplo, un sitio que es oral, no oral, enteral, parenteral, rectal, intranodal (ganglio linfático), intravenosa, arterial, subcutáneo, intramuscular, intratumor, peritumor, intratumor, infusión, mucosal, nasal, en el espacio cefalorraquídeo o líquido cefalorraquídeo, etc., así como por diferentes modos, por ejemplo, oral, intravenoso e intramuscular.

25 Una dosis eficaz de una vacuna de sensibilización o refuerzo se puede dar en una dosis, pero no está restringido a una dosis. Por lo tanto, la administración puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, 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 se pueden espaciar en intervalos de tiempo de un minuto, dos minutos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más minutos, en intervalos de
30 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, etc. En el contexto de horas, el término "aproximadamente" significa más o menos cualquier intervalo de tiempo dentro de 30 minutos. Las administraciones también pueden estar separadas en 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
35 combinaciones de los mismos. La invención no se limita a intervalos de administración que están espaciados de forma equivalente en el tiempo, sino que abarca intervalos que no son equivalentes, tales como un programa de sensibilización que consiste en la administración a los 1 día, 4 días, 7 días y 25 días, solo por proporcionar un ejemplo no limitante.

Referencias

- 40 1 Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N. y Friede, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. Trends in immunology 30, 23-32, doi:10.1016/j.it.2008.09.006 (2009).
- 2 Dubensky, T. W., Jr. y Reed, S. G. Adjuvants for cancer vaccines. Seminars in immunology 22, 155-161, doi:10.1016/j.smim.2010.04.007 (2010).
- 45 3 Kastenmuller, K. et al. Protective T cell immunity in mice following protein-TLR7/8 agonist-conjugate immunization requires aggregation, type I IFN, and multiple DC subsets. The Journal of clinical investigation 121, 1782-1796, doi:10.1172/JCI45416 (2011).
- 4 Coffman, R. L., Sher, A. y Seder, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. Immunity 33, 492-503, doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002 (2010).
- 50 5 Burdette, D. L. et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. Nature 478, 515-518, doi:10.1038/nature10429 (2011).
- 6 Woodward, J. J., Iavarone, A. T. y Portnoy, D. A. c-di-AMP secreted by intracellular Listeria monocytogenes activates a host type I interferon response. Science 328, 1703-1705, doi:10.1126/science.1189801 (2010).
- 7 Ishikawa, H. y Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling.

Nature 455, 674-678, doi:10.1038/nature07317 (2008).

8 McWhirter, S. M. et al. A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. The Journal of experimental medicine 206, 1899-1911, doi:10.1084/jem.20082874 (2009).

9 Bahjat, K. S. et al. (2005).

5 10 Bahjat, K. S. et al. Cytosolic Entry Controls CD8⁺-T-Cell Potency during Bacterial Infection. Infection and immunity 74, 6387-6397 (2006).

11 Crimmins, G. T. et al. *Listeria monocytogenes* multidrug resistance transporters activate a cytosolic surveillance pathway of innate immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2008).

10 12 O'Riordan, M., Yi, C. H., Gonzales, R., Lee, K. D. y Portnoy, D. A. Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 13861-13866 (2002).

15 13 Schwartz, K. T. et al. Hyperinduction of host beta interferon by a *Listeria monocytogenes* strain naturally overexpressing the multidrug efflux pump MdrT. Infection and immunity 80, 1537-1545, doi:10.1128/IAI.06286-11 (2012).

14 Davies, B. W., Bogard, R. W., Young, T. S. y Mekalanos, J. J. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. Cell 149, 358-370, doi:10.1016/j.cell.2012.01.053 (2012).

20 15 Witte, C. E. et al. Innate immune pathways triggered by *Listeria monocytogenes* and their role in the induction of cell-mediated immunity. Advances in immunology 113, 135-156, doi:10.1016/B978-0-12-394590-7.00002-6 (2012).

16 Desmet, C. J. y Ishii, K. J. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. Nature reviews. Immunology 12, 479-491, doi: 10.1038/nri3247 (2012).

17 Rappuoli, R., Mandl, C. W., Black, S. y De Gregorio, E. Vaccines for the twenty-first century society. Nature reviews. Immunology 11, 865-872, doi:10.1038/nri3085 (2011).

25 18 Iwasaki, A. y Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science 327, 291-295, doi: 10.1126/science. 1183021 (2010).

19 Kawai, T. y Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nature immunology 11, 373-384, doi:10.1038/ni.1863 (2010).

30 20 Einstein, M. H. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. Human vaccines 5, 705-719 (2009).

21 Ahmed, S. S., Plotkin, S. A., Black, S. y Coffman, R. L. Assessing the safety of adjuvanted vaccines. Science translational medicine 3, 93rv92, doi:10.1126/scitranslmed.3002302 (2011).

35 22 Vance, R. E., Isberg, R. R. y Portnoy, D. A. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. Cell host & microbe 6, 10-21, doi:10.1016/j.chom.2009.06.007 (2009).

23 Barber, G. N. STING-dependent signaling. Nature immunology 12, 929-930, doi:10.1038/ni.2118 (2011).

24 Leber, J. H. et al. Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. PLoS pathogens 4, e6 (2008).

40 25 Jin, L. et al. MPYS is required for IFN response factor 3 activation and type I IFN production in the response of cultured phagocytes to bacterial second messengers cyclic-di-AMP and cyclic-di-GMP. J Immunol 187, 2595-2601, doi:10.4049/jimmunol. 1100088 (2011).

26 Lauvau, G. et al. Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. Science 294, 1735-1739 (2001).

45 27 Bahjat, K. S. et al. Suppression of cell-mediated immunity following recognition of phagosome-confined bacteria. PLoS pathogens 5, e1000568, doi:10.1371/journal.ppat. 1000568 (2009).

28 Tamayo, R., Pratt, J. T. y Camilli, A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. Annual review of microbiology 61, 131-148, doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093426 (2007).

- 29 Sauer, J. D. et al. The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infection and immunity* 79, 688-694, doi:10.1128/IAI.00999-10 (2011).
- 5 30 Barber, G. N. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunological reviews* 243, 99-108, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01051.x (2011).
- 31 Tanaka, Y. y Chen, Z. J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Science signaling* 5, ra20, doi:10.1126/scisignal.2002521 (2012).
- 32 Ebensen, T. et al. Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant. *Vaccine* 29, 5210-5220, doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.026 (2011).
- 10 33 Ebensen, T. et al. The bacterial second messenger cyclic diGMP exhibits potent adjuvant properties. *Vaccine* 25, 1464-1469, doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.033 (2007).
- 34 Ebensen, T., Schulze, K., Riese, P., Morr, M. y Guzman, C. A. The bacterial second messenger cdiGMP exhibits promising activity as a mucosal adjuvant. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 14, 952-958, doi:10.1128/CVI.00119-07 (2007).
- 15 35 Libanova, R. et al. The member of the cyclic di-nucleotide family bis-(3', 5')-cyclic dimeric inosine monophosphate exerts potent activity as mucosal adjuvant. *Vaccine* 28, 2249-2258, doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.045 (2010).
- 36 Madhun, A. S. et al. Intranasal c-di-GMP-adjuvanted plant-derived H5 influenza vaccine induces multifunctional Th1 CD4+ cells and strong mucosal and systemic antibody responses in mice. *Vaccine* 29, 4973-4982, doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.094 (2011).
- 20 37 Hu, D. L. et al. c-di-GMP as a vaccine adjuvant enhances protection against systemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *Vaccine* 27, 4867-4873, doi:10.1016/j.vaccine.2009.04.053 (2009).
- 38 Karaolis, D. K. et al. Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. *Infection and immunity* 75, 4942-4950, doi:10.1128/IAI.01762-06 (2007).
- 25 39 Ogunniyi, A. D. et al. c-di-GMP is an effective immunomodulator and vaccine adjuvant against pneumococcal infection. *Vaccine* 26, 4676-4685, doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.099 (2008).
- 40 Karaolis, D. K. et al. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J Immunol* 178, 2171-2181 (2007).
- 41 Wille-Reece, U. et al. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *The Journal of experimental medicine* 203, 1249-1258 (2006).
- 42 Adler-Moore, J. et al. Characterization of the murine Th2 response to immunization with liposomal M2e influenza vaccine. *Vaccine* 29, 4460-4468, doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.040 (2011).
- 30 43 Fujii, G., Ernst, W. y Adler-Moore, J. The Vesivax system: a method for rapid vaccine development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 1968-1980 (2008).
- 44 Gaffney, B. L., Veliath, E., Zhao, J. y Jones, R. A. One-flask syntheses of c-di-GMP and the [Rp,Rp] and [Rp,Sp] thiophosphate analogues. *Organic letters* 12, 3269-3271, doi:10.1021/ol101236b (2010).
- 35 45 Zhang, Z., Gaffney, B. L. y Jones, R. A. c-di-GMP displays a monovalent metal ion-dependent polymorphism. *Journal of the American Chemical Society* 126, 16700-16701, doi:10.1021/ja0449832 (2004).
- 46 Suzuki, N., Oyama, K.-i. y Tsukamoto, M. Practical Synthesis of Cyclic Bis(3'-5')diadenylic Acid (c-di-AMP). *Chemistry Letters* 40, 1113-1114, doi:10.1246/c1.2011.1113 (2011).
- 47 Hyodo, M., Sato, Y. y Hayakawa, Y. Synthesis of cyclic bis(3'-5')diguanylic acid (c-di-GMP) analogs. *Tetrahedron* 62, 3089-3094, doi:10.1016/j.tet.2006.01.025 (2006).
- 40 48 Yan, H., Wang, X., KuoLee, R. y Chen, W. Synthesis and immunostimulatory properties of the phosphorothioate analogues of cdiGMP. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18, 5631-5634, doi:10.1016/j.bmcl.2008.08.088 (2008).
- 49 Ross, P. et al. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *The Journal of biological chemistry* 265, 18933-18943 (1990).
- 45 50 Grajkowski, A., Cieslak, J., Gapeev, A., Schindler, C. y Beaucage, S. L. Convenient synthesis of a propargylated cyclic (3'-5') diguanylic acid and its "click" conjugation to a biotinylated azide. *Bioconjugate chemistry* 21, 2147-

- 2152,doi:10.1021/bc1003857 (2010).
- 51 Zhao, J., Veliath, E., Kim, S., Gaffney, B. L. y Jones, R. A. Thiophosphate analogs of c-di-GMP: impact on polymorphism. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 28, 352-378, doi:10.1080/15257770903044523 (2009).
- 52 Battistini, C., Fustinoni, S., Brasca, M. y Borghi, D. Stereoselective synthesis of cyclic dinucleotide phosphorothioates. *Tetrahedron*, 1115-1132 (1993).
- 53 Hayakawa, Y. A facile synthesis of cyclic bis(3' → 5')diguanlylic acid. *Tetrahedron* 59, 6465-6471, doi:10.1016/s0040-4020(03)01045-7 (2003).
- 54 Coughlin, J. E. et al. Orally bioavailable anti-HBV dinucleotide acyloxyalkyl prodrugs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20, 1783-1786,doi:10.1016/j.bmcl.2010.01.010 (2010).
- 10 55 Ouyang, S. et al. Structural Analysis of the STING Adaptor Protein Reveals a Hydrophobic Dimer Interface and Mode of Cyclic di-GMP Binding. *Immunity*, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.019 (2012).
- 56 Baldwin, S. L. et al. The importance of adjuvant formulation in the development of a tuberculosis vaccine. *J Immunol* 188, 2189-2197,doi:10.4049/jimmunol.1102696 (2012).
- 15 57 Lee, A. W. et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocytederived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20 Suppl 4, A8-A22 (2002).
- 58 Lubong Sabado, R. et al. In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4 T cells in acute HIV-1 infection. *PloS one* 4, e4256, doi:10.1371/journal.pone.0004256 (2009).
- 59 Skoberne, M. et al. KBMA *Listeria monocytogenes* is an effective vector for DC-mediated induction of antitumor immunity. *The Journal of clinical investigation* (2008).
- 20 60 Jin, L. et al. Identification and characterization of a loss-of-function human MPYS variant. *Genes and immunity* 12, 263-269, doi:10.1038/gene.2010.75 (2011).
- 61 Schmidt, N. W. et al. Memory CD8 T cell responses exceeding a large but definable threshold provide long-term immunity to malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14017-14022 (2008).
- 25 62 Pham, N. L. et al. Exploiting cross-priming to generate protective CD8 T-cell immunity rapidly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12198-12203, doi:10.1073/pnas.1004661107 (2010).
- 63 Badovinac, V. P., Messingham, K. A., Jabbari, A., Haring, J. S. y Harty, J. T. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nature medicine* 11, 748-756 (2005).
- 30 64 Harty, J. T. y Badovinac, V. P. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nature reviews. Immunology* 8, 107-119 (2008).
- 65 Coler, R. N. et al. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PloS one* 6, e16333, doi:10.1371/journal.pone.0016333 (2011).
- 35 66 Singh, S., Briles, W. E., Lupiani, B. y Collisson, E. W. Avian influenza viral nucleocapsid and hemagglutinin proteins induce chicken CD8+ memory T lymphocytes. *Virology* 399, 231-238, doi:10.1016/j.virol.2009.12.029 (2010).
- 67 Singh, S. et al. Non-replicating adenovirus vectors expressing avian influenza virus hemagglutinin and nucleocapsid proteins induce chicken specific effector, memory and effector memory CD8(+) T lymphocytes. *Virology* 405, 62-69, doi:10.1016/j.virol.2010.05.002 (2010).
- 40 68 Tewari, K. et al. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multifunctional CD4+ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. *Vaccine* 28, 7256-7266,doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.098 (2010).
- 69 Wille-Reece, U. et al. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15190-15194, doi:10.1073/pnas.0507484102 (2005).
- 45 70 Seder, R. A., Darrah, P. A. y Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature reviews. Immunology* 8, 247-258 (2008).
- 71 Wille-Reece, U., Wu, C. Y., Flynn, B. J., Kedl, R. M. y Seder, R. A. Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+ T cell responses. *J*

Immunol 174, 7676-7683 (2005).

72 Jones et al., US20120178710.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención.

5 Ejemplo 1. Métodos generales

Los disolventes anhidros y reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos en fase de disolución se adquirieron y manipularon en argón o nitrógeno seco usando técnica anhidra. Las reacciones de acoplamiento de amidita y ciclaciones se llevaron a cabo en acetonitrilo o piridina anhidro en argón o nitrógeno seco. Los materiales de partida para todas las reacciones en piridina seca se secaron por concentración (tres veces) de la piridina. La cromatografía ultrarrápida en gel de sílice preparativa se llevó a cabo usando sílice de Fluka 60Å calidad de alta pureza o Merck calidad 9385 usando gradientes de metanol en diclorometano. Se llevó a cabo la HPLC analítica en un sistema de HPLC Varian ProStar 210 con un detector de matriz de fotodiodos ProStar 330 que controla a 254 nm en una columna Varian Microsorb 100-10 C₁₈ 250x4.6 mm usando gradientes de TEAA 10 mM y acetonitrilo con un caudal de 1.0 ml/min. La HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema de HPLC Shimadzu preparativo LC20-AP, equipado con un detector de UV/Vis SPD-20A que controla a 254 nm en una columna Varian Microsorb 60-8 C-18 41.6 x 250 mm usando gradientes de TEAA 10 mM y acetonitrilo con un caudal de 50 ml/min. Las extracciones en fase sólida usando C-18 Sep-Pak (Waters) se llevaron a cabo con una carga de ~3 % (p/p). El análisis por LC/MS (ESI/APCI) se obtuvo en un instrumento Shimadzu 2010EV de cuadrupolo sencillo con detección de PDA, MS y ELSD usando un HPLC analítico Shimadzu LC20D. Los espectros de masas de FT-ICR de alta resolución se obtuvieron de WM Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory en la Yale University en New Haven, CT. Los espectros de RMN de ¹H y ³¹P se adquirieron en un espectrómetro Bruker 400 MHz o un Varian Inova 500 MHz. Los RMN de ³¹P se hicieron con referencia indirecta respecto al dioxano en D₂O.

La asignación de los dinucleótidos cíclicos purificados por HPLC y derivados se resumen en la tabla 1 y se describen con detalle en los ejemplos.

25

Tabla 1:

Tiempos de retención en HPLC de fase inversa (min) y desplazamientos químicos de ³¹P (ppm) a 25°C de sales de trietilamonio (10a, 10b, 10c, 11a, 11b, 11c, 12, 13)

compuesto	tiempo de retención	³¹ Pδ
c-ci-AMP 10a	8.2*	-1.74
ditio [Rp,Sp] c-di-AMP 10c	12.1*	54.54, 54.84, 55.92 (relación de integración 1.0 : 0.9 : 0.1)
ditio [Rp,Sp] c-di-AMP 10b	14.4*	54.41
c-ci-GMP 11a	6.9*	-1.24
ditio [Rp,Sp] c-di-GMP 11c	11.0*	54.77, 56.00 (relación de integración 1:1)
ditio [Rp,Sp] c-di-GMP 11b	13.2*	54.87
C ₁₄ -acil-c-di-GMP 12	13.7§	-1.37, -2.06 (relación de integración 1:1)
C ₁₄ -acil-ditio [Rp,Rp] c-di-GMP 13	15.3§	56.46, 56.66 (relación de integración 1:1)

*Gradiente de HPLC: de 2 a 20% de CH₃CN en TEAA 10 mM a lo largo de 20 min con caudal de 1 ml/min.

§Gradiente de HPLC: de 2 a 80% (CH₃CN en TEAA 10 mM a lo largo de 20 min con caudal de 1 ml/min.

Ejemplo 2. Síntesis de 10a.

La siguiente síntesis de di-AMP cíclico se describe esquemáticamente en la fig. 6 y es una modificación de una síntesis de di-GMP cíclico descrita por Gaffney et al. (One-flask synthesis of c-di-GMP and the [Rp,Rp] and [Rp,Sp] thiophosphate analogues. *Organic Letters* 12, 3269-3271 (2010)).

30

a) Fosfitilación de 1 con 2-cloro-5,6-benzo-1,3,2-dioxafosforin-4-ona (2) y extracción sólido-líquido con CH₂Cl₂/hexano (1:1) para dar el 5'-DMT- 3'-H-fosfonato 4.

A una disolución de 1 (3.94 g, 5 mmol) en 15 ml de dioxano anhidro y 5 ml de piridina seca se añadieron con agitación 5.6 ml (7.0 mmol) de una disolución madre 1.25 M en dioxano de 2-cloro-5,6-benzo-1,3,2-dioxafosforin-4-ona (2). Después de 15 min la reacción se inactivó con 1 ml de agua y la mezcla se vertió en 10 ml de NaHCO₃ 0.25 M seguido de extracción con acetato de etilo (3 x 15 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dar 3.8 g. El sólido se trituró con 100 ml de CH₂Cl₂/hexano (1:1), se filtró y el sólido residual se secó para dar un polvo blanco fino (3.5 g) que se desplazaba como una mancha en la TLC (R_f=0.1) eluyendo con CH₃OH en CH₂Cl₂ con trietilamina al 0.5%, al 5%.

b) Destritilación mediante bisulfato sódico absorbido en gel de sílice (NaHSO₄-SiO₂) y precipitación del 5'-OH-3'-H-fosfonato (5).

A una disolución de 4 (1.74 g, 2 mmol) en 85 ml diclorometano y 0.072 ml de agua (4 mmol) se añadieron 0.55 g de NaHSO₄-SiO₂ (2.4 mmol H⁺/g de NaHSO₄-SiO₂). La reacción se completó después de agitación a temperatura ambiente durante 35 minutos (TLC en MeOH en CH₂Cl₂ con TEA al 0.5%, al 10%). El NaHSO₄-SiO₂ se separó por filtración y se lavó (3x 5 ml) con CH₂Cl₂. Se añadieron 100 ml de hexano:tolueno (1:1), se agitó con vórtice durante 5 minutos y el disolvente se decantó (repetido dos veces). La evaporación dio 0.92 g de 5 en forma de un sólido. La HPLC analítica indicaba pureza de 96.4%. La LC/MS en modo negativo confirmaba m/z (M-1) 548.2 (calculado para C₂₃H₃₁N₅O₇PSi: 548.2).

c) Acoplamiento, oxidación y destritilación.

La DMT-rA(bz)-βCE-TBDMS-fosforamidita (3) (3.5 g, 3.6 mmol) se coevaporó 3 veces con 20 ml de acetonitrilo seco, dejando la última vez un volumen de aproximadamente 10 ml, al que se le añadieron diez tamices moleculares de 3 Å. La disolución se dejó bajo argón seco.

Se evaporaron 1.6 g de H-fosfonato (5) tres veces de CH₃CN anhidro, dejando la última vez 100 ml. Esta disolución se añadió a la disolución de fosforamidita seca mediante jeringa, seguido de 1.4 g de trifluoroacetato de piridinio (que se había secado por evaporación de 3 x 20 ml de piridina anhidra). Después de 20 min se añadieron 3 ml de hidroperóxido de terc-butilo 5.5 M y se agitó durante 30 min. Después de enfriar en un baño de hielo, se añadieron 0.3 g de NaHSO₃ en 1 ml de agua y la mezcla se agitó durante 5 min. Después se evaporó el disolvente y el residuo se recogió en 20 ml de (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2). Los tamices se separaron por filtración y el disolvente se cambió a 81 ml de CH₂Cl₂. Se añadieron NaHSO₄-SiO₂ (513 mg) y agua (65 microlitros) y la reacción se agitó durante 40 min. La mezcla se filtró a través de Celite, la almohadilla se lavó con CH₂Cl₂, y el filtrado se evaporó para dar 7a bruto. La LC/MS en modo negativo confirmaba m/z (M-1) 1148.5 (calculado para C₄₉H₆₄N₁₁O₁₄P₂Si₂: 1148.37).

d) Ciclación de dímero lineal (7a) y oxidación para dar 8a.

Al compuesto 7a bruto (secado por evaporación de piridina anhidra dejando 100 ml después de la evaporación final) se añadió DMOCP (1.9 g, 10.15 mmol). Después de 12 min, la reacción se inactivó con agua (2,3 g) seguido inmediatamente por la adición de yodo (0.96 g, 3.78 mmol). La mezcla de reacción se vertió en 400 ml de agua que contenía 0.6 g de NaHSO₃. Después de 5 min de agitación, se añadieron 11.2 g de NaHCO₃ en porciones y la disolución se agitó durante 5 min. La mezcla se repartió dos veces con 500 ml de acetato de etilo/éter (3:2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄), y se evaporaron. Se añadió tolueno (3x10 ml) y se evaporó para separar la piridina residual para dar 2.37 g de 8a en forma de un sólido amarillo-marrón. La LC/MS en modo negativo confirmaba m/z (M-1) 1146.6 (calculado para C₄₉H₆₂N₁₁O₁₄P₂Si₂: 1146.4).

e) Desprotección de 8a bruto con hidróxido amónico concentrado para dar 9a bruto y HPLC prep. para dar 9a en forma pura.

A 600 mg de 8a en un tubo de presión de vidrio de paredes gruesas de 200 ml se añadieron 40 ml de metanol y 40 ml de amoníaco acuoso concentrado, y la mezcla resultante se agitó a 50°C durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo se lavó con acetato de etilo (3 x 10 ml) para dar 510 mg de 9a bruto.

Se aplicó una porción de 102 mg de 9a bruto en 4 ml de CH₃CN en acetato de trietilamonio 10 mM al 20% a una columna de HPLC prep. y se eluyó usando un gradiente de acetonitrilo y acetato de trietilamonio 10 mM en agua (20→50% de CH₃CN a lo largo de 20 minutos con un caudal de 50 ml/min). Las fracciones de HPLC que contenían 9a puro se combinaron, se evaporaron para separar el CH₃CN y se liofilizaron para separar el resto del agua y el tampón volátil para dar 32 mg de 9a puro como la sal de bis-trietilamonio. La LC/MS en modo negativo confirmaba m/z (M-1) 885.5 (calculado para C₃₂H₅₁N₁₀O₁₂P₂Si₂: 885.3). (También se podía posponer la purificación por HPLC prep. hasta después de la última etapa como se describe en las series de c-di-GMP y ditio-c-di-GMP más adelante).

f) Desprotección de los grupos TBS de 9a con trihidrofluoruro de trietilamina, neutralización con TEAB y extracción en fase sólida con C-18 Sep-Pak para dar 10a puro como la sal de bis-trietilamonio.

A 20 mg de 9a se añadieron 0.25 ml de trihidrofluoruro de trietilamina. La mezcla se puso en un agitador durante 48 h momento en el que un análisis por HPLC de una muestra de 10 microlitros neutralizada con 100 microlitros de bicarbonato de trietilamonio 1 M, indicaba el consumo del material de partida y la aparición de un solo producto

nuevo. Después, la mezcla de reacción se añadió gota a gota con agitación a un volumen 10x de bicarbonato de trietilamonio 1 M enfriado. Después, la disolución neutralizada se cargó en una Waters C-18 Sep-Pak, y después de lavar la columna con 6 volúmenes de acetato de trietilamonio 10 mM, el producto se eluyó con CH₃CN:acetato de trietilamonio (1:1). El CH₃CN se separó por evaporación en rotavapor y la muestra acuosa se liofilizó hasta sequedad para dar 14 mg de 10a en forma de la sal de bis-trietilamonio. El análisis por HRMS de 10a en modo negativo confirma m/z (M-H) 657.0985 (calculado para C₂₀H₂₃N₁₀O₁₂P₂: 657.0978). RMN ¹H (D₂O) 45°C δ(ppm) 8.34 (s,2H), 8.11 (s,2H), 6.15 (s,2H), 4.34 (m, 4H), 4.15 (m,2H), 3.77 (m, 2H), 3.19 (q, J=7Hz), 1.27(t, J=7Hz). RMN ³¹P (D₂O) 25°C. δ(ppm) - 1.74.

Ejemplo 3. Síntesis de 10b y 10c.

10 La siguiente síntesis se describe esquemáticamente en la fig. 6.

a) Hidrólisis de la DMT-rA(bz)-βCE-TBDMS-fosforamidita (3) disponible en el mercado, β-eliminación y cromatografía en sílice del 5'-DMT-3'-H-fosfonato (4) resultante:

15 A una disolución de DMT-rA(bz)-βCE-TBDMS-fosforamidita (3) (11 g , 11.1 mmol) en 50 ml de acetonitrilo se añadió agua (0.36 ml, 20 mmol, 1.8 equiv) y trifluoroacetato de piridinio (2.3 g, 11.9 mmol, 1.07 equiv) Después de agitar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente se añadió terc-butilamina (50 ml) y se continuó agitando durante 10 minutos adicionales. Después la mezcla se concentró hasta una espuma que se recogió en diclorometano y se aplicó a una columna de gel de sílice con un gradiente de MeOH en diclorometano de 5% a 10%. Las fracciones de la columna que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para dar el 5'-DMT-3'- H-fosfonato (4) en forma de una espuma (6.68 g, 7.8 mmol, 70% de rendimiento)

20 b) Destritilación y precipitación del 5'-OH-3'-H-fosfonato (5):

25 A una disolución de 4 (6.68 g, 7.8 mmol) en 60 ml de diclorometano y 1.4 ml de agua (78 mmol, 10 equiv) se añadió una porción de 100 ml de ácido dicloroacético en diclorometano al 6% (73 mmol, 9.35 equiv). Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos, se añadió piridina (11.2 ml, 139 mmol, 1.9 equiv basado en el DCA) para inactivar el ácido y la mezcla se concentró para dar 5 en forma de un vidrio amarillo/naranja. El vidrio se recogió en aproximadamente 20 ml de diclorometano y se añadió gota a gota con agitación a 500 ml de hexano:éter dietílico 7:3 para precipitar el 5'-OH-3'-H-fosfonato (5) deseado. El líquido sobrenadante se separó por decantación del precipitado (la mayor parte del cual formaba una goma que se pegaba a las paredes del matraz) y se secó a presión reducida para formar una suspensión granular. Esta suspensión se evaporó tres veces con 40 ml de acetonitrilo seco, dejando la última vez aproximadamente 12 ml.

30 c) Preparación de una disolución seca de fosforamidita (3) en acetonitrilo, acoplamiento con el 5'-OH-3'-H-fosfonato (5), y sulfuración del tiofosfato dímero lineal (6b), y destritilación a 7b.

La DMT-rA(bz)-βCE-TBDMS-fosforamidita (3) (9.08 g, 9.36 mmol, 1.2 equiv basado en el H-fosfonato (5) se coevaporó tres veces con 40 ml de acetonitrilo seco, dejando la última vez un volumen de aproximadamente 20 ml, al que se le añadieron entonces diez tamices moleculares de 3 Å. La disolución se dejó bajo argón seco.

35 A la disolución de la fosforamidita (3) se añadió 5 (de b) con agitación en argón seco. Después de agitar 10 minutos a temperatura ambiente, la mitad de la mezcla de reacción (por conversión a los análogos ditio) se transfirió en atmósfera de argón a un segundo recipiente de reacción, y se añadió 3-((N,N-dimetilaminometiliden)amino-3H-1,2,4-ditiazol-5-ona (0.88 g, 4.29 mmol, 1.1 equivalentes). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente la reacción se detuvo poniéndola en un congelador a -20°C. Mientras se almacenaba en el congelador durante >48 h se separó de la disolución un precipitado amarillo. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta una espuma (3.9 g), se disolvió en 50 ml de CH₂Cl₂ y se trató con 100 ul de agua seguido inmediatamente de 800 mg de NaHSO₄-sílice. La mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y se filtró para separar la sílice. Después se añadieron sesenta ml de hexano al filtrado y se separó de la disolución una fase inferior de aceite. El aceite se separó y se evaporó para dar 3.1 g de 7b bruto.

45 d) Ciclación del dímero lineal (7b), sulfuración y cromatografía en sílice para dar una mezcla de 8b y 8c.

50 7b (3.05 g, 2.6 mmol) se secó por evaporación en piridina anhidra (se añadieron 200 ml de piridina y se evaporó en rotavapor para dejar 120 ml) seguido de adición de DMOCF (1.68 g, 9.1 mmol, 3.5 equiv). Después de 12 minutos, la reacción se inactivó con agua (1.63 g, 91 mmol) seguido inmediatamente de la adición de 0.675 g (3.0 mmol, 1.2 equiv) de 3-H-1,2-benzoditiol-3-ona. La mezcla de reacción se vertió en 500 ml de bicarbonato sódico 0.25 M y después se extrajo 2 x 500 ml con acetato de etilo/éter dietílico (3:2). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄), y se evaporaron a vacío. Se añadió tolueno (3x10 ml) y se evaporó para separar la piridina residual. El residuo se aplicó a una columna de sílice y se eluyó con un gradiente de CH₃OH en CH₂Cl₂ de 0 a 10% para dar un total de 1.47 g que contenían principalmente los diastereoisómeros 8b y 8c.

55 e) Desprotección de la mezcla de 8b y 8c con hidróxido amónico concentrado para dar 9b y 9c, y separación por HPLC prep. para dar 9b y 9c en forma pura.

A 230 mg de una mezcla de 8b y 8c en un tubo de presión de vidrio se añadieron 16 ml de metanol seguido de 16 ml de amoníaco acuoso concentrado, y la mezcla resultante se agitó a 50°C durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo se lavó con acetato de etilo (3 x 10 ml) para dar 210 mg de una mezcla bruta de 9b y 9c. El análisis por LC/MS en modo negativo para la mezcla 9b/9c confirmó m/z (M-1) 917 (calculado para $C_{32}H_{51}N_{10}O_{10}P_2S_2Si_2$: 917.2).

Separación de la mezcla de 9b/9c por HPLC prep. Se aplicó una porción de 105 mg de la mezcla bruta de 9b y 9c en 4 ml de CH_3CN en acetato de trietilamonio 10 mM al 30% a una columna de HPLC prep. y se eluyó usando un gradiente de acetonitrilo y acetato de trietilamonio 10 mM (30->50% de CH_3CN a lo largo de 20 minutos con un caudal de 50 ml/min). Las fracciones de HPLC que contenían 9b puro se separaron de las que contenían 9c puro. Las fracciones combinadas se evaporaron para separar el CH_3CN y se liofilizaron para separar el agua que quedaba y el tampón volátil para dar 18 mg de 9b y 14 mg de 9c como las sales de bis-trietilamonio.

f) Desprotección de los grupos TBS de 9b con trihidrofluoruro de trietilamina, neutralización con TEAB y extracción en fase sólida (SPE) con una C-18 Sep-Pak para dar 10b puro como la sal de bis-trietilamonio.

A 8 mg de 9b se añadieron 0.4 ml de trihidrofluoruro de trietilamina. La mezcla se puso en un agitador durante 16 h momento en el que un análisis por HPLC de una muestra de 5 microlitros neutralizada con 100 microlitros de bicarbonato de trietilamonio 1 M (TEAB), indicaba el consumo del material de partida y la aparición de un solo producto nuevo. Después, la mezcla de reacción se añadió gota a gota con agitación a un volumen ~10x de bicarbonato de trietilamonio 1 M enfriado. Después, la disolución neutralizada se cargó en una Waters C-18 Sep-Pak, y después de lavar la columna con 6 volúmenes de acetato de trietilamonio 10 mM, el producto se eluyó con CH_3CN : acetato de trietilamonio 10 mM (1:5). El CH_3CN se separó por evaporación en rotavapor y la muestra acuosa se liofilizó hasta sequedad para dar 6 mg de 10b en forma de la sal de bis-trietilamonio. El análisis por HRMS de 10b en modo negativo confirma m/z (M-H) 689.0526 (calculado para $C_{20}H_{23}N_{10}O_{10}P_2S_2$: 689.0521). RMN 1H (D_2O) 35°C δ (ppm) 8.39 (s, 2H), δ 8.16 (s, 2H), δ 6.16 (s, 2H), δ 4.97-5.03(m, 2H), δ 4.78 (m, 2H), δ 4.50-4.55 (m, 4H), δ 4.04-4.08 (m, 2H), δ 3.20 (q, J=7Hz), δ 1.27(t, J=7Hz). RMN ^{31}P (D_2O) 25°C. δ (ppm) 54.41.

g) Desprotección de los grupos TBS de 9c con trihidrofluoruro de trietilamina, neutralización con TEAB y extracción en fase sólida con C-18 Sep-Pak para dar 10c puro como la sal de bis-trietilamonio.

A 6 mg de 9c se añadieron 0.3 ml de trihidrofluoruro de trietilamina. La mezcla se puso en un agitador durante 16 h y un tratamiento de una pequeña parte alícuota como en (f) indicaba el consumo del material de partida y la aparición de un solo producto nuevo. Después, la mezcla de reacción se añadió gota a gota con agitación a un volumen ~10x de bicarbonato de trietilamonio 1 M enfriado. Después, la disolución neutralizada se cargó en una Waters C-18 Sep-Pak, y después de lavar la columna con 6 volúmenes de acetato de trietilamonio 10 mM, el producto se eluyó con CH_3CN : acetato de trietilamonio 10 mM (1:5). El CH_3CN se separó por evaporación en rotavapor y la muestra acuosa se liofilizó hasta sequedad para dar 4 mg de 10c en forma de la sal de bis-trietilamonio. El análisis por HRMS de 10c en modo negativo confirma m/z (M-H) 689.0524 (calculado para $C_{20}H_{23}N_{10}O_{10}P_2S_2$: 689.0521). RMN 1H (D_2O) 35°C δ (ppm) 8.50 (s, 2H), δ 8.37 (s, 2H), δ 8.20 (s, 2H), δ 8.10 (s, 2H), δ 6.17 (s, 2H), δ 6.14 (s, 2H), δ 5.06-5.07(m, 2H), δ 4.96-5.02 (m, 2H), δ 4.87-4.93 (m, 2H), δ 4.75 (m, 2H), δ 4.34-4.56 (m, 10H), δ 3.98-4.13(m, 2H), δ 3.20 (q, J=7Hz), δ 1.27(t, J=7Hz). RMN ^{31}P (D_2O) 25°C. δ (ppm) 54.54, 54.84, 55.92 (minoritario).

Ejemplo 4. Síntesis de (11a), (11b) y (11c).

11a, 11b y 11c se sintetizaron como describen Gaffney et al. con la adición de purificación por HPLC prep. del producto final (ilustrado a continuación) en lugar de recristalización, con el fin de lograr purezas de $\geq 97\%$ para el ensayo biológico. Alternativamente, la purificación por HPLC prep. se puede llevar a cabo después de las etapas de ciclación y desprotección como se han descrito para las series de adenosina en la fig. 6, ejemplos 2 y 3.

11a

Se aplicó una porción de 100 mg de 11a en 3 ml de acetato de trietilamonio 10 mM a una columna de HPLC prep. y se eluyó usando un gradiente de acetonitrilo y acetato de trietilamonio 10 mM en agua (gradiente de 0% a 10% de CH_3CN a lo largo de 22 minutos con un caudal de 50 ml/min). Las fracciones de HPLC que contenían 11a puro se combinaron y el CH_3CN se separó por evaporación en rotavapor y la muestra acuosa que quedaba se liofilizó hasta sequedad para dar 40 mg de 11a puro en forma de la sal de bis-trietilamonio. El análisis por HRMS de 11a en modo negativo como m/z (M-H) 689.0893 (calculado para $C_{20}H_{23}N_{10}O_{14}P_2$: 689.0876). RMN 1H (D_2O) 45°C δ (ppm) 8.05 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.90 (m, 2H), 4.76 (m, 2H), 4.41 (m, 2H), 4.33 (m, 2H), 4.09 (m, 2H), 3.19 (q, J=7Hz, 6H), 1.28(t, J=7Hz, 9H). RMN ^{31}P (D_2O) 25°C. δ (ppm) -1.24.

11b

Se aplicó una porción de 100 mg de 11b enriquecido en 3 ml de CH_3CN en acetato de trietilamonio 10 mM al 6% a una columna de HPLC prep. y se eluyó usando un gradiente de acetonitrilo y acetato de trietilamonio 10 mM en agua (gradiente de 6% a 18% de CH_3CN a lo largo de 22 minutos con un caudal de 50 ml/min). Las fracciones de HPLC que contenían el 11b puro se combinaron y el CH_3CN se separó por evaporación en rotavapor y la muestra acuosa

que quedaba se liofilizó hasta sequedad para dar 40 mg (40% de rendimiento) de 11b puro en forma de la sal de bis-trietilamonio. El análisis por HRMS de 11b en modo negativo confirmaba m/z (M-H) 721.0446 (calculado para $C_{20}H_{23}N_{10}O_{12}P_2S_2^-$: 721.0419). RMN 1H (D_2O) 45°C δ 8.05 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 5.03 (m, 2H), 4.77(m, 4H), 4.10 (m, 2H), 4.08 (m, 2H), 3.19 (q, $J=7Hz$, 6H), 1.28(t, $J=7Hz$, 9H). RMN ^{31}P (D_2O) 25°C. δ 54.87.

5 11c

Se aplicaron 60 mg de 11c enriquecido en 3 ml de CH_3CN en acetato de trietilamonio 10 mM al 6% a una columna de HPLC prep. y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo y acetato de trietilamonio 10 mM en agua (gradiente de 6% a 18% de CH_3CN a lo largo de 22 minutos con un caudal de 50 ml/min). Las fracciones de HPLC que contenían el 11c puro se combinaron y el CH_3CN se separó por evaporación en rotavapor y la muestra acuosa que quedaba se liofilizó hasta sequedad para dar 30 mg (50% de rendimiento) de 11c puro en forma de la sal de bis-trietilamonio. El análisis por HRMS de 11c en modo negativo confirmaba m/z (M-2H) 360.0171 (calculado para $C_{20}H_{22}N_{10}O_{12}P_2S_2^{2-}$: 360.0173). RMN 1H (D_2O) 55°C δ (ppm) 8.13 (s,2H), 8.03 (s,2H), 5.97 (m,2H), 5.06-5.12 (ancho, 4H), 4.98-5.00 (m,2H), 4.81-4.83 (m, 2H), 4.04-4.08 (m, 4H), 3.20 (q, $J=7Hz$), 1.27(t, $J=7Hz$). RMN ^{31}P (D_2O) 25°C. δ (ppm) 54.77, 56.00.

15 Ejemplo 5. Inducción de interferón por CDN

Para determinar el nivel relativo de IFN- β en células presentadoras de antígeno inducido por cada una de las moléculas derivadas de Rp, Rp ditio c-di-GMP con respecto a las moléculas de c-di-GMP no modificadas como una característica de la potencia adyuvante, 1×10^5 células DC2.4, una línea de células dendríticas de ratón restringidas H-2b derivadas de ratón, se incubaron con 5, 20 y 100 μM de moléculas de c-di-GMP, Rp, Rp y Rp, o Sp ditio-difosfato c-di-GMP, así como c-di-AMP, Rp, Rp o Rp, Sp ditio-difosfato c-di-AMP o HBSS durante 30 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Después de 30 minutos, las células se lavaron y sustituyó por medio RPMI que contenía FBS al 10%. Para medir el nivel de IFN- β inducido, se recogieron los líquidos de cultivo celular de cada muestra después de 4 horas y se añadieron 10 μl a células indicadoras de luciferasa 5×10^4 L929-ISRE cultivadas en medio RPMI + FBS al 10%. El nivel relativo de producción de IFN- β se determinó midiendo las unidades de luz relativas (RLU) después de 4 horas de incubación.

Como se muestra en la fig. 7, los diastereoisómeros Rp, Rp ditio c-di-GMP y Rp, Rp ditio c-di-AMP inducían niveles significativamente mayores de IFN- β que cualquiera de las moléculas de dinucleótidos cíclicos no modificados c-di-GMP o c-di-AMP. Además, el nivel de IFN- β inducido por los diastereoisómeros Rp, Sp ditio c-di-GMP y Rp, Sp ditio c-di-AMP era menor que el nivel inducido por los diastereoisómeros tanto Rp, Rp ditio c-di-GMP como Rp, Rp ditio c-di-AMP así como las moléculas c-di-GMP y c-di-AMP naturales. Estos resultados demuestran que las preparaciones purificadas de diastereoisómeros Rp, Rp ditio c-di-GMP y el Rp, Rp ditio c-di-AMP activan más profundamente la respuesta inmunitaria innata que las moléculas de c-di-GMP y c-di-AMP no modificadas así como los derivados ditio Rp, Sp. Los derivados Rp, Sp tanto de c-di-GMP como de c-di-AMP activaban poco la respuesta inmunitaria innata. Será evidente para el experto en la técnica que las realizaciones preferidas para los adyuvantes son los dinucleótidos cíclicos Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP o Rp, Rp ditio-difosfato c-di-AMP, debido a sus propiedades de mayor activación de la respuesta inmunitaria innata, como se muestra por la magnitud de la expresión de IFN- β inducida, en comparación con las moléculas de Rp, Sp ditio-difosfato c-di-GMP o Rp, Sp ditio-difosfato c-di-AMP o c-di-GMP o c-di-AMP.

Ejemplo 6. Degradación de CDN por fosfodiesterasas

Un mecanismo para aumentar la potencia de los derivados de Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP y c-di-AMP en comparación con los c-di-GMP y c-di-AMP naturales no modificados, puede ser la resistencia de los derivados modificados con ditio a la degradación por las fosfodiesterasas de las células hospedantes. Como ensayo para este mecanismo, se incubaron moléculas de Rp, Rp ditio c-di-GMP, c-di-GMP no modificado y también Rp, Rp ditio c-di-AMP y c-di-AMP, con y sin 1 mg de fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD) durante la noche a 37°C. Después de este periodo de incubación, la enzima SVPD en las reacciones se inactivó y se retiró por incubación a 100°C durante 10 minutos y después las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos. Para ensayar la capacidad relativa de las muestras para activar la inmunidad innata, medida por el nivel de expresión de IFN- β , 1×10^5 células DC2.4 se incubaron con 100 μM de derivados de Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP y c-di-AMP y c-di-GMP y c-di-AMP naturales no modificados procesados de muestras incubadas con estas preparaciones de dinucleótidos cíclicos durante 30 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Después de 30 minutos, las células se lavaron y se reemplazó el medio por RPMI que contenía FBS al 10% y se incubó durante otras 4 h. Los fluidos de los cultivos después se recogieron, y se añadieron 10 μl de estos fluidos a 5×10^4 células indicadoras de luciferasa L929-ISRE cultivadas en medio RPMI que contenía FBS al 10%. El nivel relativo de la expresión de IFN- β se determinó midiendo las unidades relativas de luz (RLU) después de 4 horas de incubación en la línea celular indicadora.

Como se muestra en la fig. 8, el nivel de expresión de IFN- β en células que contenían Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP ("RR-CDG") o Rp, Rp ditio-difosfato c-di-AMP ("RR-CDA") era equivalente, independientemente de si los dinucleótidos cíclicos se incubaron con SVPD. En cambio, el nivel de expresión de IFN- β era significativamente menor en cultivos que contenían c-di-GMP ("CDG") o c-di-AMP ("CDA") que se habían incubado previamente con

SVPD, en comparación con cultivos que contenían c-di-GMP o c-di-AMP que no se habían incubado con esta enzima. Además, en los cultivos que contenían dinucleótidos cíclicos no incubados con SVPD, el nivel de expresión de IFN- β era mayor con Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP o Rp, Rp ditio-difosfato c-di-AMP en comparación con c-di-GMP o c-di-AMP. Estos datos apoyan además la mayor potencia del Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP o Rp, Rp ditio-difosfato c-di-AMP en comparación con c-di-GMP o c-di-AMP.

Ejemplo 7. Inducción de respuesta inmunitaria por CDN

Para ensayar la mayor inmunogenicidad in vivo de las moléculas Rp, Rp ditio c-di-GMP con respecto a las c-di-GMP no modificadas, se midieron las respuestas de células T CD4+ y CD8+ específicas de OVA en PBMC a los 10 días después de vacunación conjuntamente con el tratamiento con CDN. Las vacunas se prepararon combinando 10 μ g de proteína OVA (EndoFit OVA, InVivogen) y Addavax (2% de escualeno final) con bien 25 μ g o 5 μ g de dinucleótido cíclico, en un volumen total de 100 μ l. Se inmunizaron grupos de cinco ratones C57BL/6 hembra (H-2b) una vez por vía subcutánea (s.c) en la base de la cola con las preparaciones de vacuna, y las respuestas de células T CD4+ y CD8+ específicas de OVA en el compartimento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se determinaron por análisis de ELISpot 10 días más tarde. 1 x 10⁵ PBMC y 1 x 10⁵ células alimentadoras esplenocitos aisladas de ratones C57BL/6 que no habían recibido tratamiento previo, de la edad correspondiente, no se estimularon o se estimularon con 1 μ M de péptido de MHC de clase II (OVA265-280 TEWTSSNVMEERKIKV) o péptido MHC de clase I (OVA257-264 SIINFEKL) durante la noche y se midieron las células formadoras de mancha de IFN- γ , como se ha descrito previamente.

Como se muestra en la fig. 9, las respuestas de células T CD4+ y CD8+ específicas de OVA eran de mayor magnitud en ratones inmunizados con vacunas que contenían Rp, Rp ditio c-di-GMP en comparación con c-di-GMP no modificado, en formulaciones que contenían la misma cantidad de adyuvante dinucleótido cíclico. Además, la magnitud de las respuestas de células T CD8+ específicas de antígeno era mayor en ratones inmunizados con formulaciones de vacuna que contenían 5 μ g de Rp, Rp ditio c-di-GMP, en comparación con ratones inmunizados con formulaciones de vacuna que contenían bien 5 μ g o 25 μ g de c-di-GMP no modificado.

Ejemplo 8. Inducción de respuestas de células T por CDN

Para evaluar más la inmunogenicidad de las moléculas Rp, Rp ditio c-di-GMP en comparación con las c-di-GMP no modificadas, se midieron las respuestas de células T CD8+ y CD4+ específicas de SIV gag. Se inmunizaron cinco ratones C57BL/6 por grupo por vía subcutánea dos veces con 1 μ g de Rp, Rp ditio c-di-GMP o control de solución salina formulados en escualeno en agua al 2% con 10 μ g de proteína SIV gag. Las vacunaciones se separaron 20 días y los bazo se recogieron seis días después de la segunda vacunación. Se midieron las respuestas inmunitarias contra epítomos de células T CD8 (AL11, SIV gag₃₁₂₋₃₂₂, A) y CD4 (DD13, SIV gag₃₀₀₋₃₁₂, B) específicas de SIV gag por ensayo de IFN γ por ELISpot. Se escanearon las placas y se contaron las células formadoras de mancha (SFC) usando un analizador ImmunoSpot (CTL).

Como se muestra en la figura 10, los animales inmunizados con RR c-di-GMP inducían respuestas significativamente mayores de células T CD8 y CD4 específicas de SIV gag en comparación con los animales que recibieron el control de solución salina. Estos resultados demuestran que las formulaciones de vacuna con el derivado de RR c-di-GMP puede inducir respuestas de células T CD4 y CD8 específicas de SIV gag in vivo. El experto en la técnica reconocerá que se prefieren las formulaciones de vacunas que contienen Rp, Rp ditiofosfato c-di-GMP o Rp, Rp ditiofosfato c-di-AMP, puesto que dichos dinucleótidos cíclicos tienen mayor potencia como se muestra por la mayor magnitud de las respuestas inmunitarias inducidas mediante vacuna, y también la mayor magnitud de las respuestas inmunitarias inducidas mediante vacuna con niveles de dosis de adyuvante comparativamente menores.

Ejemplo 9. Inducción de inmunidad protectora por CDN

Para establecer la inmunogenicidad potenciada y la inmunidad protectora que la acompaña inducida por Rp, Rp ditio c-di-GMP con respecto a c-di-GMP no modificado se valoraron las respuestas de células T CD8 específicas de OVA medidas en PBMC y la inmunidad protectora contra estímulo bacteriano letal. Se prepararon vacunas combinando 10 μ g de proteína OVA (EndoFit OVA, InVivogen) y Addavax (2% de escualeno final) con 25 μ g de dinucleótido cíclico, en un volumen total de 100 μ l. Se inmunizaron grupos de cinco ratones C57BL/6 hembra (H-2^b) dos veces por vía subcutánea (s.c.) en la base de la cola con las preparaciones de vacuna. El intervalo entre las inmunizaciones de sensibilización y de refuerzo era 36 días. La magnitud de las fases tanto de memoria como de expansión de las respuestas de células T CD8 específicas de OVA₂₅₇ en PBMC se cuantificó por análisis de tinción de citoquinas intracelular (ICS) tanto a los 27 días después de la vacunación de refuerzo como a los 3 días después de la estimulación con una 2x dosis letal dosis (LD)₅₀ (1 x 10⁵ unidades formadoras de colonia; CFU) de *Listeria monocytogenes* de tipo natural que expresan OVA (WT Lm-OVA). Para el análisis de ICS, 1 x 10⁵ PBMC de ratones de ensayo combinadas con 1 x 10⁵ células alimentadoras esplenocitos aisladas de ratones C57BL/6 que no han recibido tratamiento previo de edad correspondiente, no se estimularon o se estimularon con 1 μ M de péptido MHC de clase I (OVA₂₅₇₋₂₆₄ SIINFEKL) durante 5 h en presencia de Brefeldina A, y se midió la producción de IFN- γ por citometría de flujo en un instrumento BD FACSVerse.

Como se muestra en la fig. 11A, ratones inmunizados con vacunas con adyuvante Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP generaban una magnitud mayor de células T CD8 de memoria específicas de OVA, en comparación con ratones inmunizados con vacunas con adyuvante c-di-GMP no modificado. Las células T CD8 de memoria específicas de OVA inducidas por inmunización con vacunas con adyuvante Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP se expandían con una magnitud mayor después de estimulación con patógeno que expresa el antígeno OVA cognado, en comparación con el nivel de expansión de células T CD8 de memoria específicas de OVA en ratones inmunizados con vacunas con adyuvante c-di-GMP no modificado. La gráfica de FACS mostrada en la fig. 11B demuestra que la magnitud de células T CD8 de memoria específicas de OVA se aproximaba a 30% de la población de células T CD8 totales en PBMC de ratones inmunizados con vacunas con adyuvante Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP. El patrón referencial para la inmunización eficaz es ensayar si una vacuna candidata puede conferir protección contra la posterior estimulación con un patógeno virulento. Para ensayar la eficacia relativa de vacunas con adyuvante Rp, Rp ditio c-di-GMP y c-di-GMP no modificado, los ratones se estimularon con una inyección intravenosa de una dosis 2X LD₅₀ (1×10^5 CFU) de *Listeria monocytogenes* de tipo natural que expresa OVA (WT Lm-OVA) a los 27 días después de inmunización de sensibilización. Tres días después, se determinó la inmunidad protectora mediante cultivo en placa de diluciones de homogeneizados de bazo recogidos de ratones de ensayo a los 3 días después de estimulación con WT Lm-OVA en medio agar infusión cerebro-corazón, y se cuantificó el número de colonias después de incubación durante la noche a 37°C. La fig. 11C muestra que la inmunización de ratones con vacunas con adyuvante Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP proporcionó protección completa (por debajo del límite de detección, LOD) contra la estimulación de patógeno virulento. Será evidente para el experto en la técnica que las realizaciones preferidas para los adyuvantes son los dinucleótidos cíclicos Rp, Rp ditio-difosfato c-di-GMP o Rp, Rp ditio-difosfato c-di-AMP, debido a sus propiedades que les confieren una profunda potencia de vacuna, como se muestra por la inducción de la alta magnitud del grupo de linfocitos T CD8 de memoria que se expande tras la estimulación con el antígeno cognado y proporciona protección completa contra la estimulación con patógeno virulento.

Ejemplo 10. Inducción de inmunidad antitumoral eficaz por los CDN

La eficacia antitumoral in vivo relativa de los derivados Rp, Rp ditio c-di-AMP y c-di-AMP no modificado se evaluó en un modelo de cáncer de próstata subcutáneo de ratón. Las moléculas derivadas se formularon con 1×10^6 células de tumor de próstata murino TRAMP-C2 completas irradiadas que expresan GM-CSF (GVAX). Se implantaron en grupos de 5 ratones C57BL/6 macho 1×10^5 células tumorales TRAMP-C2 por vía subcutánea en la almohadilla de la pata. Los días 4 y 11 después de implantación del tumor, se administraron a los ratones vacunas subcutáneas en el flanco de solo GVAX o GVAX formulado con RR-CDA o CDA, y en comparación con el control de HBSS. El crecimiento tumoral se controló mediante calibres, y se calculó el volumen tumoral.

Como se muestra en la fig. 12, el día 52 después de implantación del tumor, los ratones vacunados con GVAX + RR-CDA demostraron inhibición del crecimiento tumoral significativa en comparación con el control de HBSS, con mayor eficacia antitumoral en comparación con GVAX solo o GVAX formulado con el derivado de c-di-AMP no modificado. Estos datos demuestran la mayor potencia antitumoral de la molécula derivada de Rp, Rp ditio c-di-AMP en comparación con la molécula de c-di-AMP no modificada en un modelo de cáncer de próstata murino.

Ejemplo 11. Formas de profármacos de CDN

Las estrategias de profármacos proporcionan un método atractivo para facilitar el reparto en la bicapa de células o liposomas de suministro. La acilación del 2'-OH de la ribosa de c-di-GMP, c-di-AMP y análogos ditio con ácidos carboxílicos C-12 a C-18 podría servir como un profármaco valioso. Se muestran dos ejemplos en la fig. 13 y se describen en el ejemplo.

(a) Síntesis de mono-2'-O-miristoil-c-di-GMP 12 a partir de 11a.

A la sal de bistrilaminato de 11a (8 mg, 9.0 micromoles) se añadieron 0.3 ml de DMF, 30 de microlitros de piridina y 15 mg de anhídrido mirístico (34 micromoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h y después se calentó a 60°C durante 0.5 h. La masa del producto principal 12 se confirmó por LC/MS en modo negativo, con m/z (M-1) 889 (calculado para $C_{34}H_{49}N_{10}O_{15}P_2^-$: 899.3). Después de evaporación, el residuo se recogió en CH₃CN en hasta 30% en TEAA 10 mM, se filtró y se purificó en una columna de HPLC de 20 mm prep C-18 con elución con gradiente (CH₃CN en TEAA 10 mM de 30 a 60% a lo largo de 20 min con un caudal de 20 ml/min). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, se evaporaron en el rotavapor y se liofilizaron para dar 3 mg de mono-2'-O-miristoil-c-di-GMP (12). El análisis por HRMS de 12 en modo negativo confirma m/z (M-2) 449.1389 (calculado para $C_{34}H_{48}N_{10}O_{15}P_2^-$: 449.1393). RMN ¹H (DMSO + D₂O al 1%) 25°C δ(ppm) 7.98 (s, 2H), 5.98 (s, 1H), 5.73 (d, 1H), 5.66 (s, 1H), 4.74 (d, 2H), 4.54 (s, 1H), 4.23 (s, 1H), 3.81-3.99 (ancho, 4H), 2.55 (s, 2H), 1.44 (s, 2H), 0.85 (t, 3H). (Los picos de RMN a 10.61, 7.33 y 6.55 en DMSO solo se intercambiaron con la adición de D₂O al 1%). Los metilenos del grupo miristoilo estaban enmascarados por el DMSO a campo alto de los picos de acetato de trietilamonio. La RMN estaba de acuerdo con la monoacetilación en 2'-OH. RMN ³¹P (D₂O) 25°C. δ(ppm) -1.37, -2.06.

(b) Síntesis de mono-2'-O-miristoil [Rp,Rp] ditiofosfato c-di-GMP (13) a partir de 11b.

A la sal de bistrilaminato de 11b (12 mg, 13.0 micromoles) se añadieron 0.3 ml de DMF, 30 de microlitros de piridina,

- 15 mg de anhídrido mirístico (34 micromoles) y DMAP catalítico. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y después se calentó a 60°C durante 2 h. El disolvente se separó por evaporación en rotavapor y el residuo se recogió en MeOH al 50% en TEAA 10 mM, se filtró y se purificó en una columna de HPLC de 20 mm prep C-18 (MeOH al 50% en TEAA 10 mM isocrático durante 5 min seguido de gradiente hasta 100% de MeOH durante 10 min y después 100% de MeOH durante 10 min). El producto deseado eluía tarde en este sistema metanólico. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, se evaporaron en el rotavapor y después se liofilizaron para dar 4 mg de mono-2'-O-miristoil [Rp,Rp] ditiofosfato c-di-GMP (13). El análisis por HRMS de 13 en modo negativo confirma m/z (M-2) 465.1148 (calculado para $C_{34}H_{48}N_{10}O_{13}P_2S_2$: 465.1165). RMN 1H (DMSO + 1% D_2O) 25°C δ (ppm) 8.01 (s, 2H), 5.97 (d, 1H), 5.73 (d, 2H), 5.71 (m, 2H), 5.00 (m, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.56 (m, 1H), 4.10-4.18 (m, 4H), 3.97 (m, 2H), 3.84-3.87 (m, 1H), 3.16 (s, 1H), 3.05 (d, 2H), 1.47 (ancho, 2H), 0.85 (t, 3H). (Los picos de RMN a 10.60, 7.53, 6.90 y 6.63 en DMSO solo se intercambiaron por adición de D_2O al 1%). Los metilenos del grupo miristoil estaban enmascarados por el DMSO a campo alto de los picos de acetato de trietilamonio. La RMN estaba de acuerdo con la monoacetilación en 2'-OH. RMN ^{31}P (CD_3OD) 25°C. δ (ppm) 56.66, 55.46.
- 15 También se puede usar un planteamiento de profármaco similar usando derivatización de aciloxialquilo de azufre u oxígeno en tiofosfatos y fosfatos de CDN, respectivamente. Las estructuras de aciloxialquilo en la fig. 14 son similares a Adefovir, se usa un profármaco análogo de nucleósido eficaz para tratar la infección por HIV y HBV. Una vez dentro de la célula, las esterasas intracelulares escindirán los grupos acilo y aciloxialquilo presentes en el 2'-OH o fosfato (tiofosfato) y regenerarán el dinucleótido cíclico no derivatizado.

20 Ejemplo 12. Actividad farmacológica de profármacos de CDN.

- Para determinar la potencia relativa de la forma de profármaco del c-di-GMP para activar respuestas inmunitarias innatas, se evaluaron los niveles relativos de IFN- β inducidos en una línea celular de monocitos humana. Para estos experimentos, se transfectaron 4x10⁵ monocitos humanos THP1-Blue con un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria inducible por IRF (Invivogen), y se incubaron con 100 μM de c-di-GMP, mono-2'-O-miristoil c-di-GMP o HBSS durante 30 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Después de 30 minutos, las células se lavaron y se sembraron en placa de 96 pocillos en medio RPMI que contenía FBS al 10%, y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Los líquidos sobrenadantes del cultivo celular de cada muestra se recogieron después de 4 horas. Se añadieron 10 μl de los líquidos sobrenadantes del cultivo celular al reactivo QUANTI-Blue (Invivogen) y se incubaron durante 15-30 minutos. Se midió la absorbancia a 655 nm usando un espectrofotómetro Modelo 680 (BioRad).
- 30 Como se muestra en la fig. 15, el derivado de mono-2'-O-miristoil c-di-GMP ("mono-2'-O-miristoil CDG") inducía niveles significativamente mayores de IFN- β frente a la molécula de dinucleótido cíclico c-di-GMP no modificado y frente a los niveles base (HBSS) en una línea celular de monocitos humanos. Adicionalmente, estos datos demuestran en una línea celular de monocitos humana, la inducción superior de las moléculas derivadas de Rp, Rp ditio c-di-GMP frente a las moléculas de Rp, Sp ditio c-di-GMP y c-di-GMP no modificadas. Los resultados demuestran que preparaciones purificadas de mono-2'-O-miristoil c-di-GMP pueden activar la respuesta inmunitaria innata en una línea celular humana.

Ejemplo 13. Inducción de respuestas inmunitarias por profármacos de CDN

- Para evaluar la capacidad del derivado mono-2'-O-miristoil c-di-GMP ("mono-2'-O-miristoil CDG") para inducir respuestas inmunitarias in vivo, se midieron las respuestas de células T CD8 específicas de OVA en esplenocitos a los 7 días después de la segunda vacunación junto con tratamiento con CDN. Para ensayar la capacidad del mono-2'-O-miristoil c-di-GMP en relación con la estimulación de respuestas inmunitarias específicas de OVA, se prepararon vacunas combinando 10 μg de proteína OVA (EndoFit OVA, Invivogen) y Addavax (2% de escualeno final) con bien 0 (Control) o 5 μg de derivado de mono-2'-O-miristoil c-di-GMP ("mono-2'-O-miristoil CDG"), en un volumen total de 100 μl . Se inmunizaron grupos de cinco ratones C57BL/6 hembra (H-2b) por vía subcutánea (s.c) en la base de la cola con las preparaciones de vacunas, y se determinaron las respuestas de células T CD8+ específicas de OVA en los bazo por tinción de citoquinas intracelular 7 días más tarde. 1 x 10⁶ esplenocitos no se estimularon o se estimularon con péptido MHC de clase I 1 μM (OVA257-264 SIINFEKL; SL8) durante la noche y se midió la producción de IFN- γ mediante citómetro de flujo en un BD FACSVerser.
- 50 Como se muestra en la fig. 16, las vacunas que contenían el derivado de mono-2'-O-miristoil c-di-GMP inducían mayores respuestas inmunitarias en comparación con las vacunas de control. Estos resultados demuestran que una vacuna que contiene el derivado de mono-2'-O-miristoil c-di-GMP puede estimular respuestas inmunitarias adaptativas muy potentes en un modelo animal.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para usar en un método de inducción de una respuesta inmunitaria contra un cáncer en un individuo, o inducción de una respuesta inmunitaria contra un patógeno en un individuo, comprendiendo la composición:
- 5 uno o más dinucleótidos cíclicos de purina tiofosfatos o sus sales farmacéuticamente aceptables que inducen la activación de TBK1 dependiente de STING, en donde los dinucleótidos cíclicos de purina presentes en la composición son diastereoisómeros Rp,Rp sustancialmente puros, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde los dinucleótidos cíclicos de purina comprenden una sustitución del resto 2'-OH de la ribosa por acilo o halógeno; y
- 10 en donde dicha composición es para la administración parenteral al individuo.
2. Una composición para usar según la reivindicación 1, que además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. Una composición para usar según la reivindicación 1 o 2, que además comprende una o más vacunas seleccionadas para estimular una respuesta inmunitaria contra a uno o más antígenos predeterminados.
- 15 4. Una composición para usar según la reivindicación 3, en donde la(s) vacuna(s) comprende(n) bacterias o virus inactivados o atenuados que comprenden los antígenos de interés, antígenos purificados, vectores de suministro de virus o bacterias vivos genéticamente modificados de forma recombinante para expresar y/o secretar los antígenos, vectores de células presentadoras de antígenos (APC) que comprenden células que están cargadas con los antígenos o transfectadas con una composición que comprende un ácido nucleico que codifica los antígenos,
- 20 vehículos de suministro de antígenos liposomales, vectores de ácidos nucleicos desnudos que codifican los antígenos, o una célula tumoral inactivada que expresa y secreta uno o más ligandos GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70, FLT-3.
5. Una composición para usar según una de las reivindicaciones 1-4 que comprende además uno o más adyuvantes, lípidos, vesículas multilaminares reticuladas interbicapa, nanopartículas o micropartículas basadas en poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) [PLGA] o basadas en polianhídrido biodegradables, y bicapas de lípidos soportadas sobre partículas no porosas, antagonistas de la ruta de CTLA-4 y PD-1, agentes bloqueantes de la ruta de PD-1, bacterias inactivadas que inducen inmunidad innata (p. ej., *Listeria monocytogenes* inactivada o atenuada), composiciones que median la activación inmunitaria innata por los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo (NOD)(NLR), receptores tipo (RIG)-I basados en gen inducible por ácido retinoico (RLR), receptores de lecitina tipo C (CLR), patrones moleculares asociados a patógenos ("PAMP") o agentes quimioterapéuticos.
- 25 6. Una composición para usar según la reivindicación 5, en donde el uno o más adyuvantes comprenden CpG y/o monofosforil lipido A.
7. Una composición para usar según una de las reivindicaciones 1-6, en donde el uno o más dinucleótidos cíclicos de purina tiofosfatos que comprenden una sustitución del resto 2'-OH de la ribosa comprenden un diastereoisómero de Rp,Rp tiofosfato sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en c-di-AMP tiofosfato, c-di-GMP tiofosfato, c-di-IMP tiofosfato, c-AMP-GMP tiofosfato, c-AMP-IMP tiofosfato y c-GMP-IMP tiofosfato; sus combinaciones; y/o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 35 8. Una composición para usar según la reivindicación 7, en donde el dinucleótido cíclico de purina tiofosfato se formula con uno o más lípidos o con digitonina.
9. Una composición para usar según la reivindicación 8, en donde el uno o más lípidos forman un liposoma.
- 40 10. Una composición para usar según una de las reivindicaciones 8 o 9, en donde el uno o más dinucleótidos cíclicos de purina tiofosfato se formulan como una nanopartícula.
11. Una composición para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la composición comprende una célula tumoral inactivada o una mezcla de diferentes tipos de células tumorales que se corresponden con el cáncer del individuo, y/o en donde la célula tumoral se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer escamoso de tracto aerodigestivo, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de cerebro, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer de estómago, una célula de sarcoma, una célula de leucemia, una célula de linfoma, una célula de mieloma múltiple, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer uterino, una célula de cáncer de mama, una célula de melanoma, una célula de cáncer de próstata, una célula de carcinoma pancreático y una célula de carcinoma renal.
- 45 12. Una composición para usar según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho método comprende además la administración de una o más vacunas al paciente, en donde la(s) vacuna(s) comprende(n) uno o más antígenos seleccionados para estimular una respuesta inmunitaria contra a un patógeno que expresa uno o más de los antígenos.
- 50

- 5 13. Una composición para usar según la reivindicación 12, en donde la(s) vacuna(s) comprende(n) bacterias o virus inactivados o atenuados que comprenden el antígeno de interés, antígenos purificados, vectores de suministro de virus y bacterias vivos genéticamente modificados de forma recombinante para expresar y/o secretar los antígenos, vectores de células presentadoras de antígenos (APC) que comprenden células que se cargan con los antígenos o transfectadas con una composición que comprende un ácido nucleico que codifica los antígenos, vehículos de suministro de antígenos liposomales, o vectores de ácidos nucleicos desnudos que codifican los antígenos.

FIG. 1

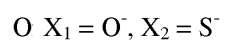
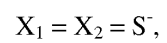
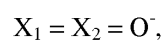
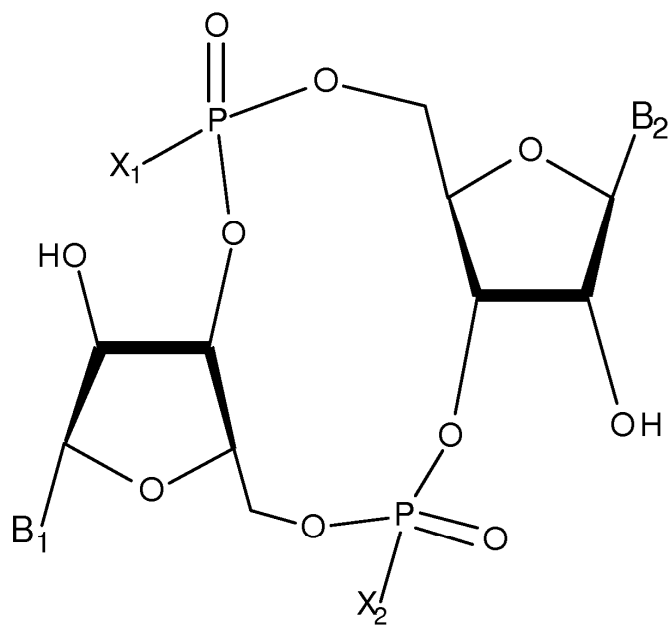
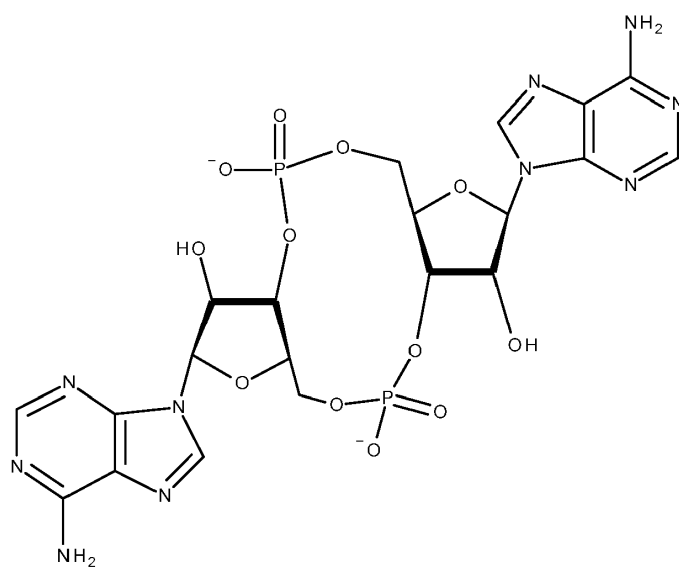
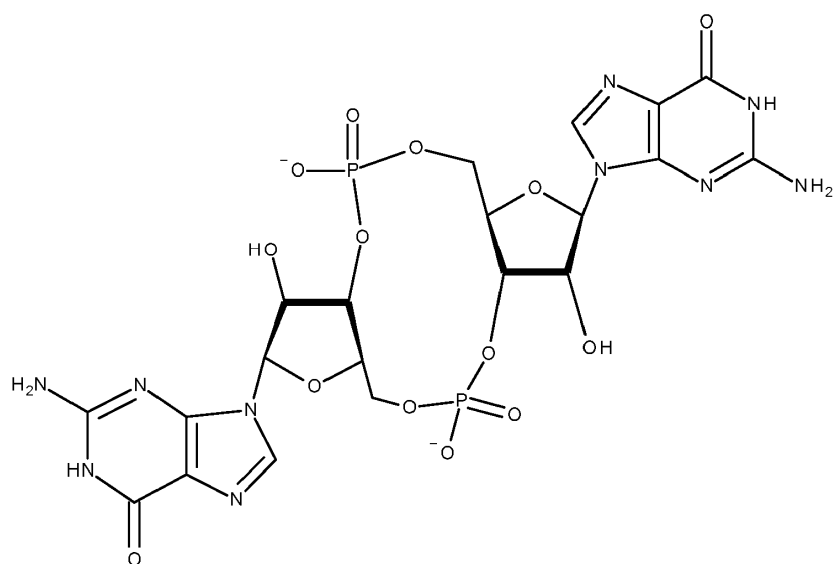


FIG. 2

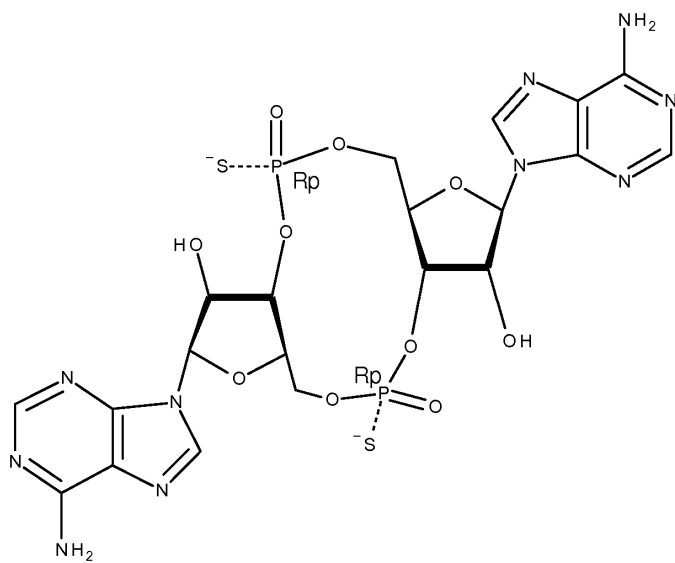


10a

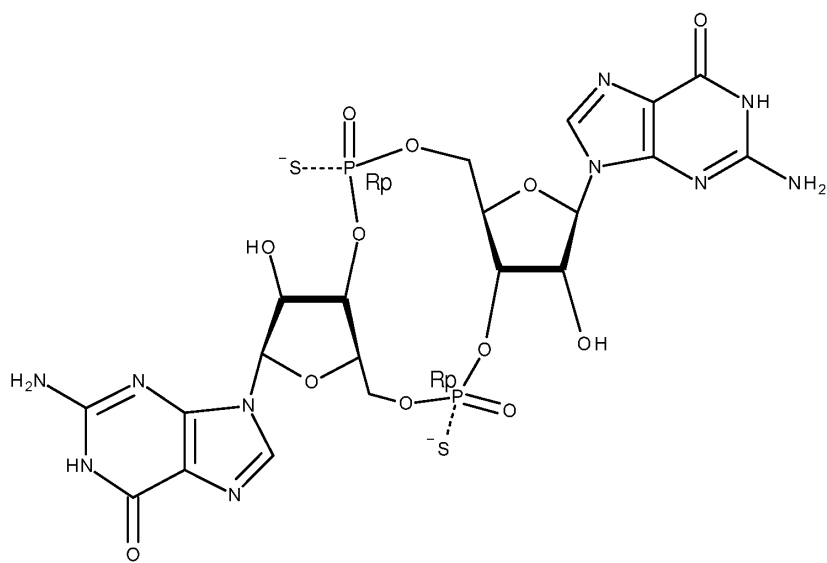


11a

FIG. 3

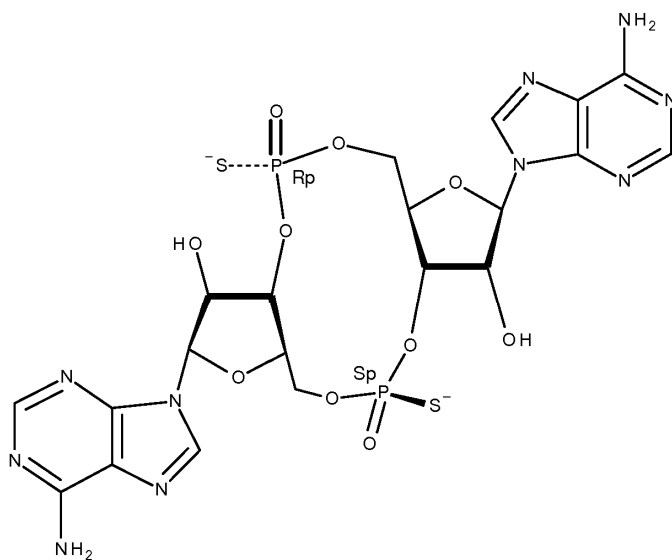


10b

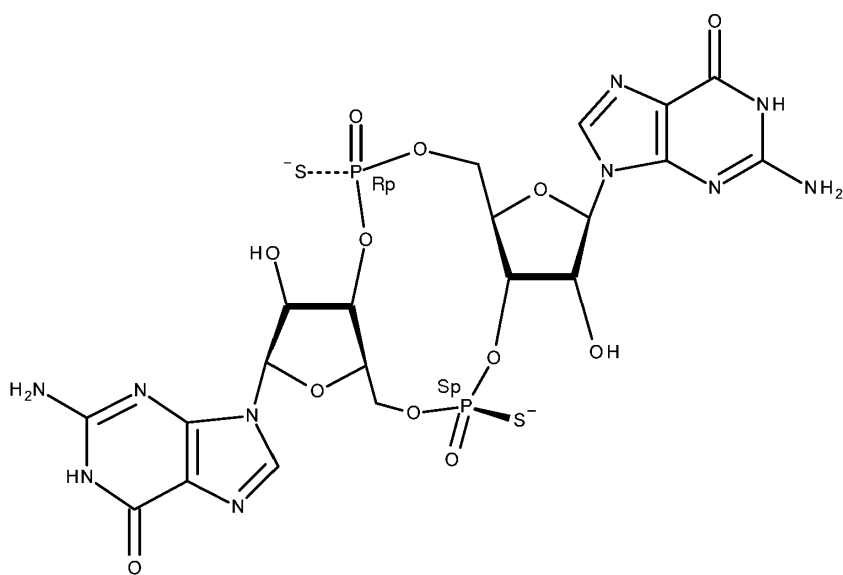


11b

FIG. 4



10c



11c

FIG. 5

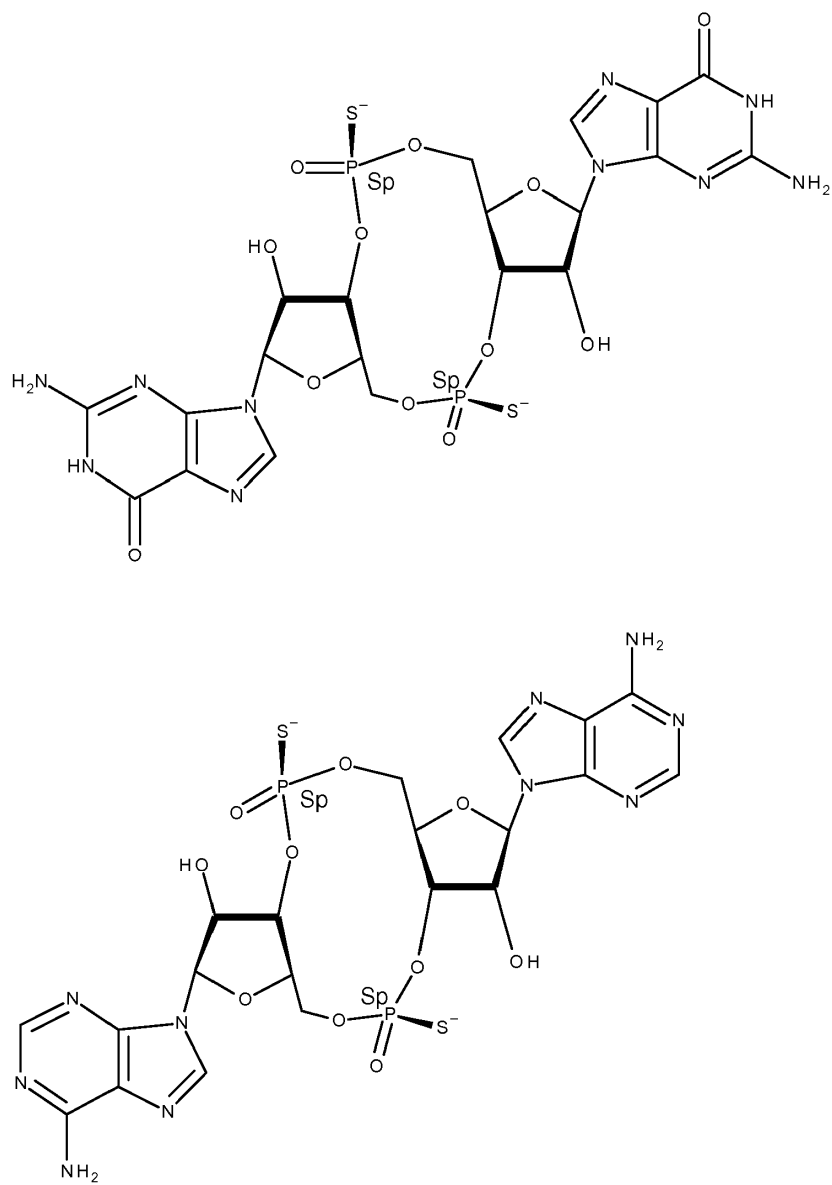


Fig. 6

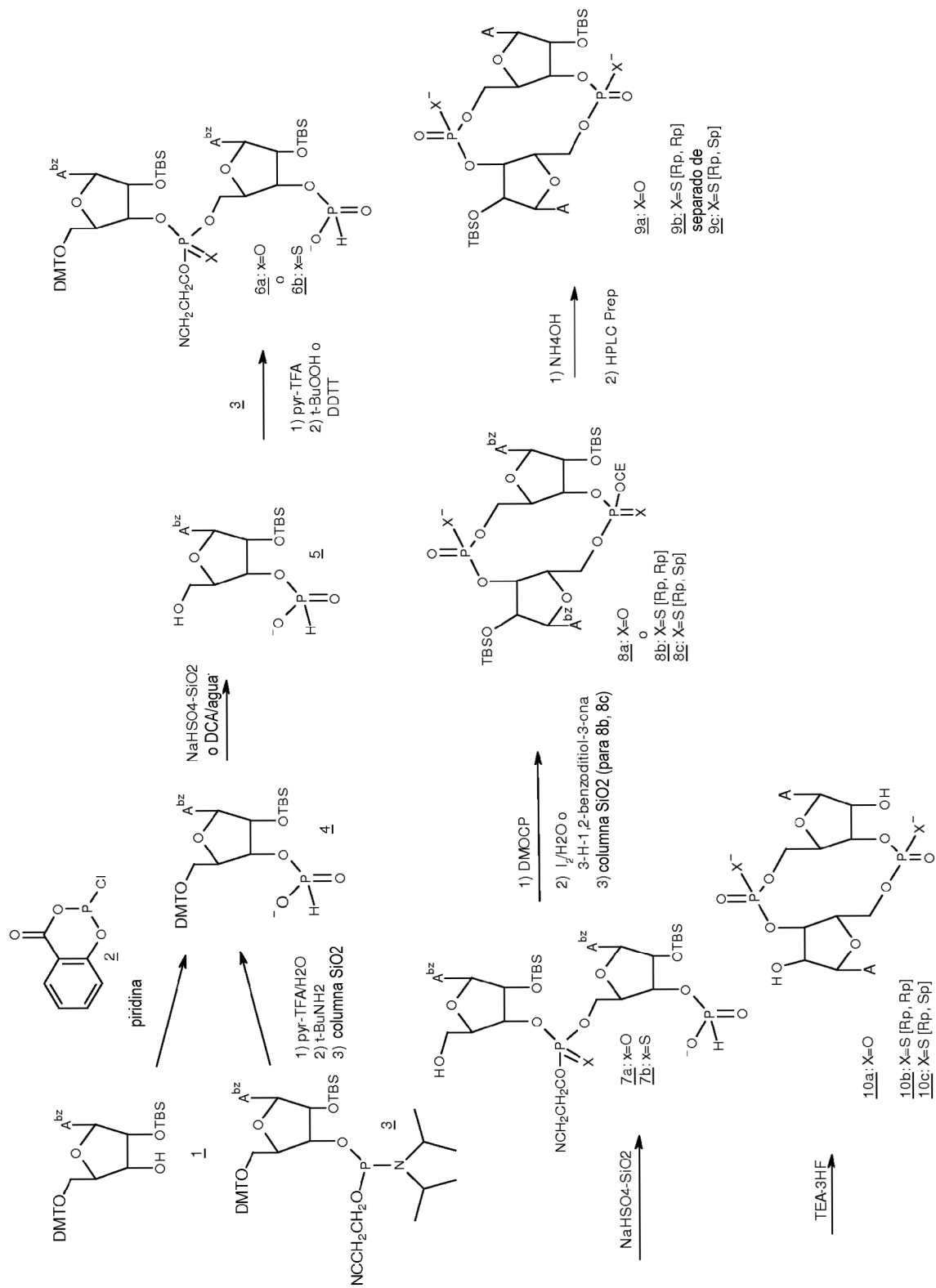


FIG. 7

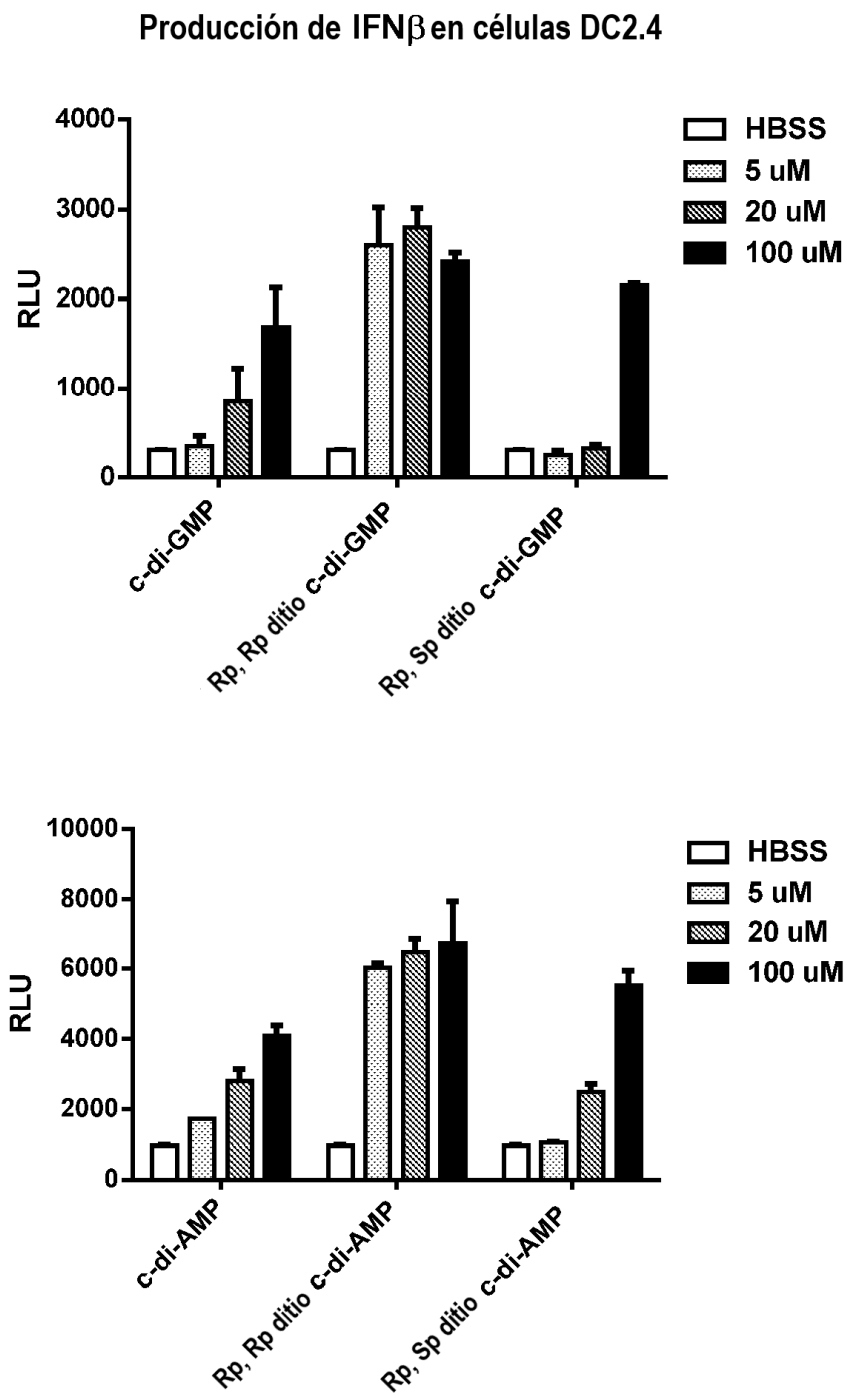


FIG. 8

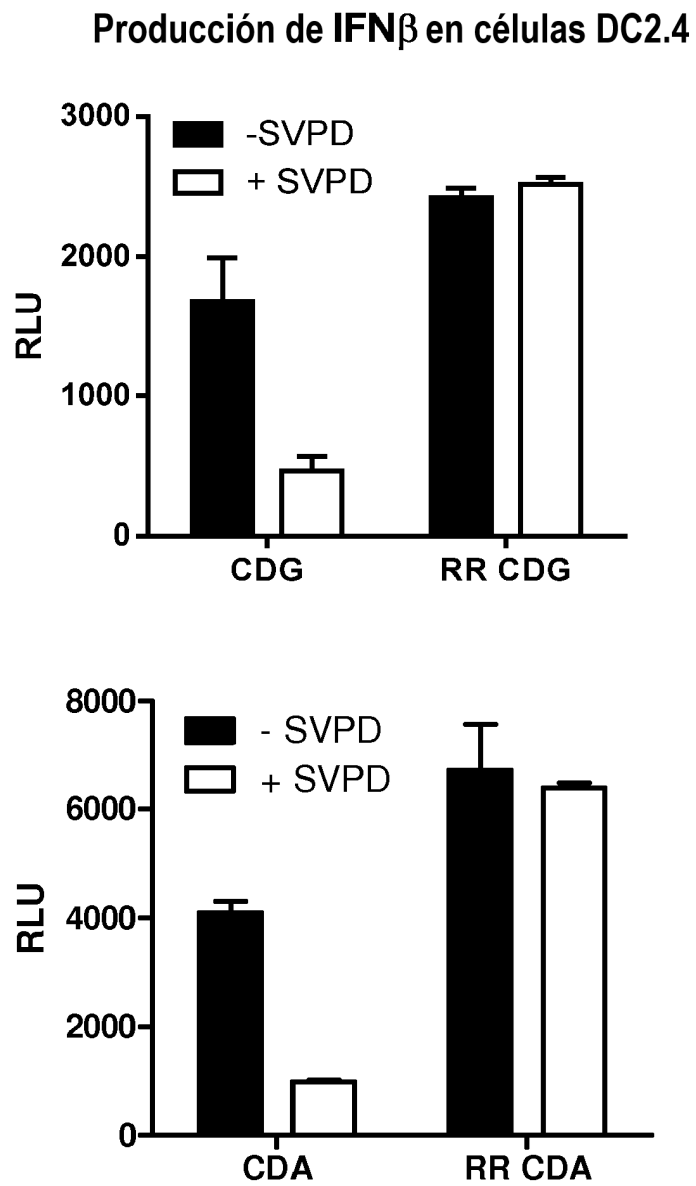


FIG. 9

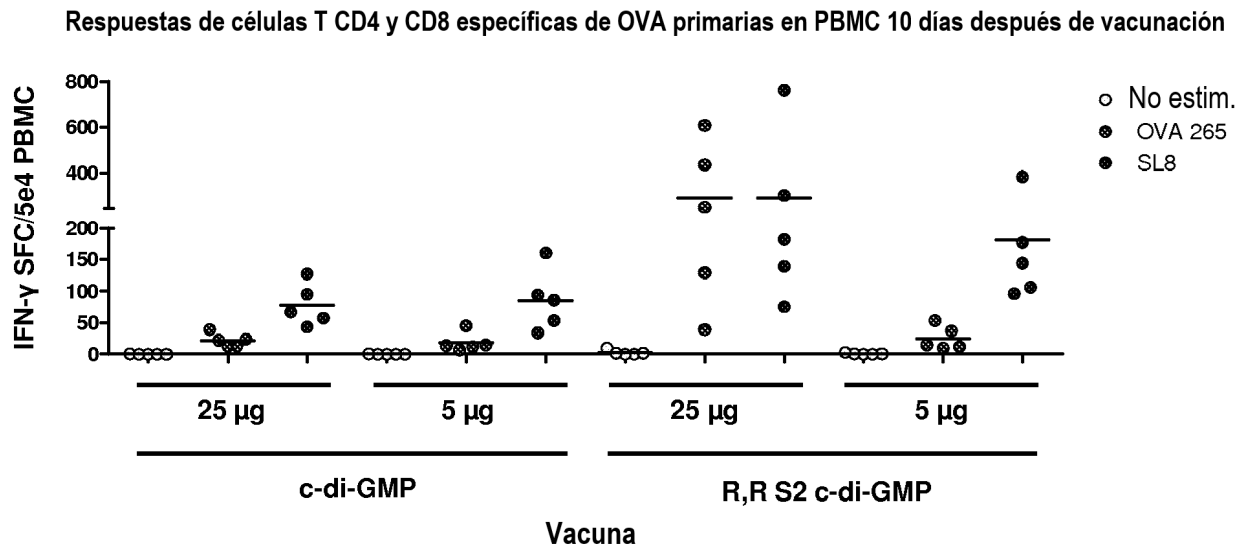
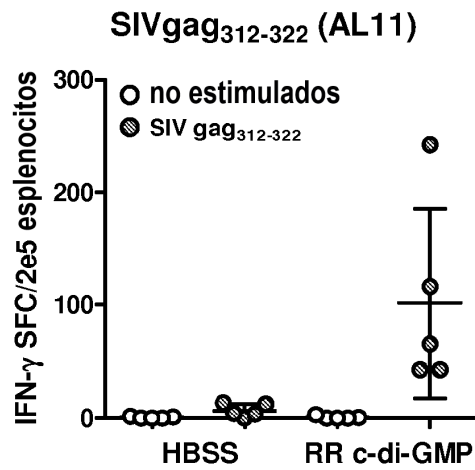


FIG. 10

10A.



10B.

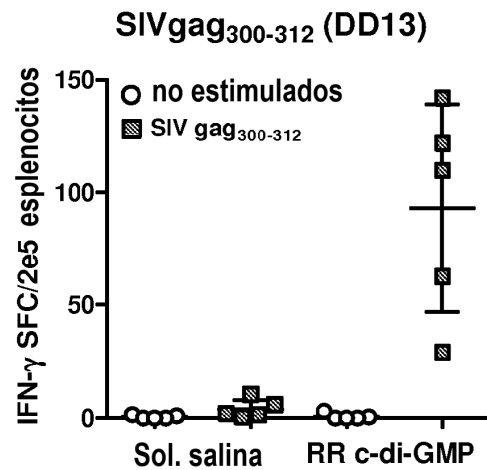
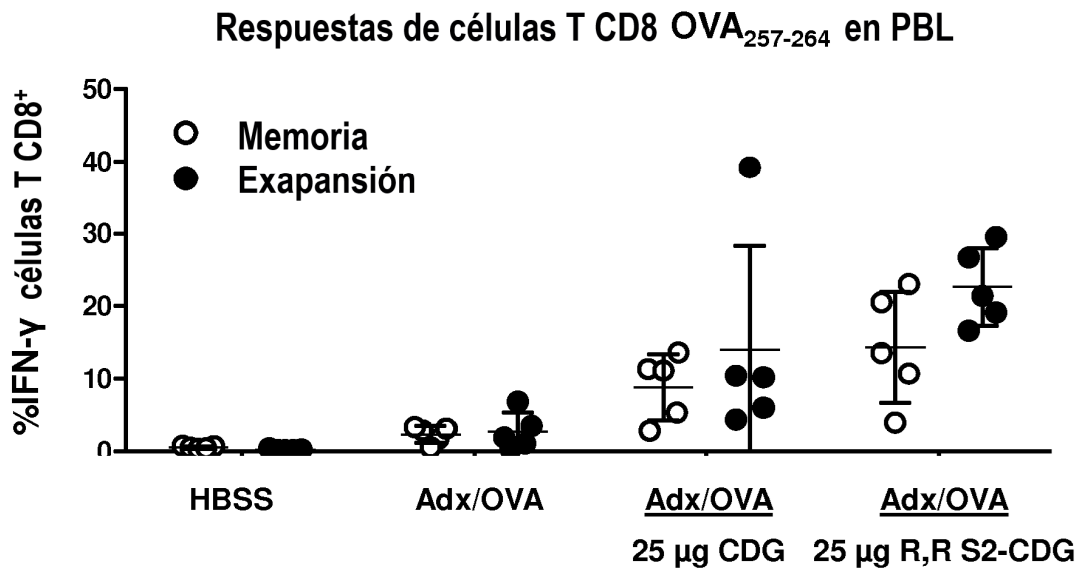


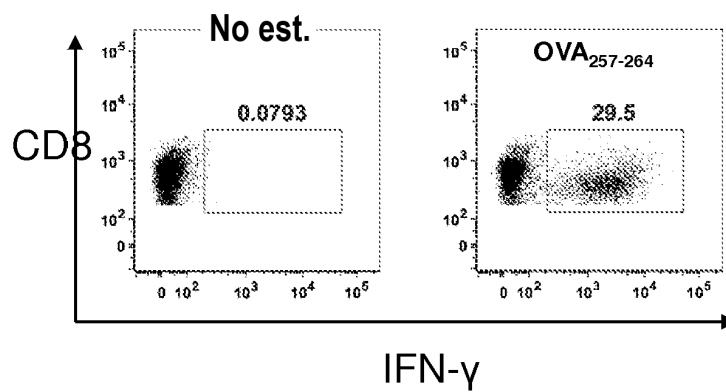
FIG. 11

11A.



11B.

Respuesta de células T CD8 de memoria en PBL 27 días después de refuerzo (Rp, Rp c-di-GMP)



11C.

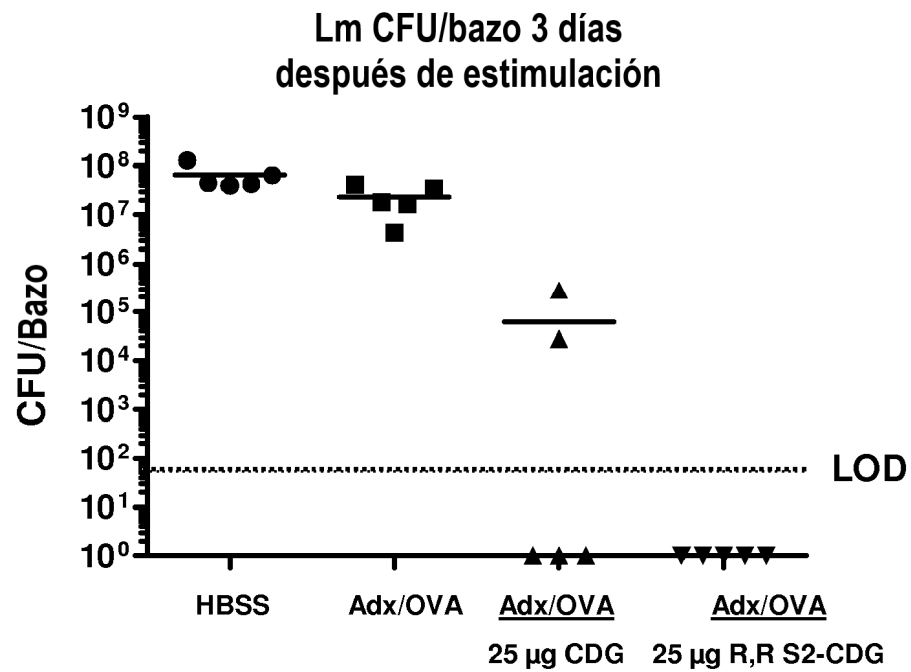


FIG. 12

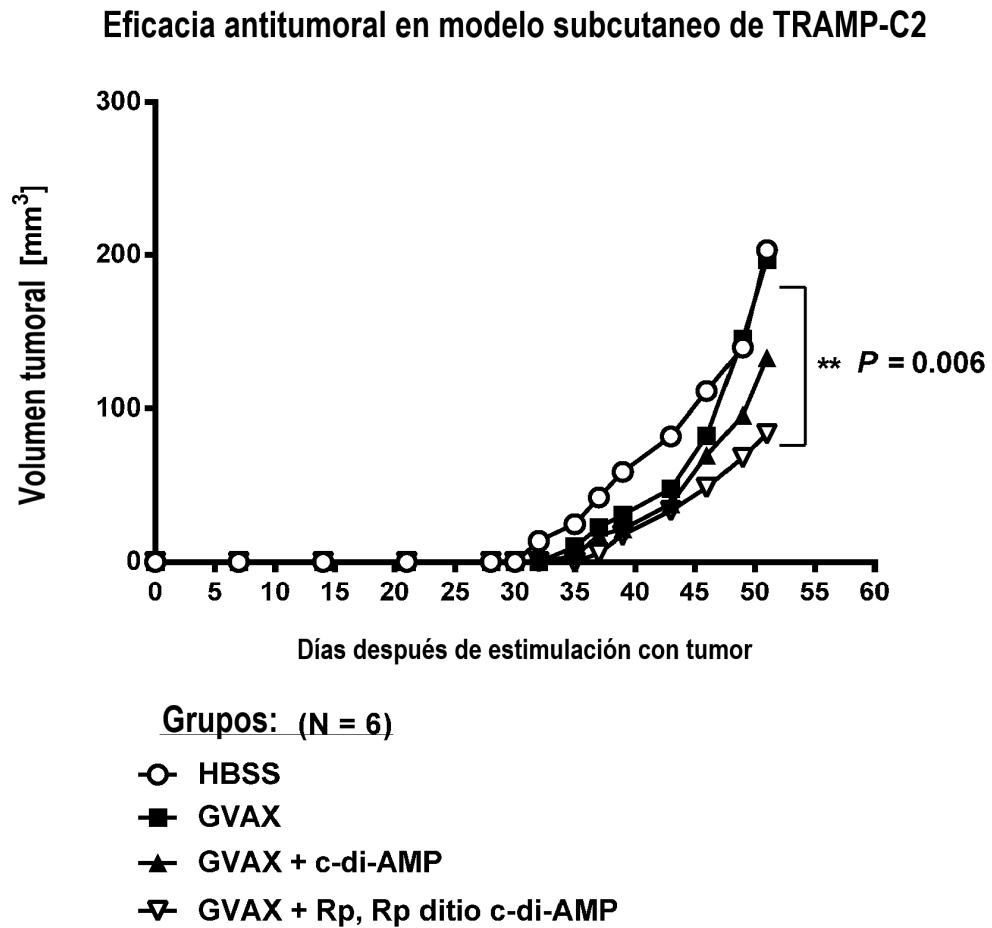


FIG. 13

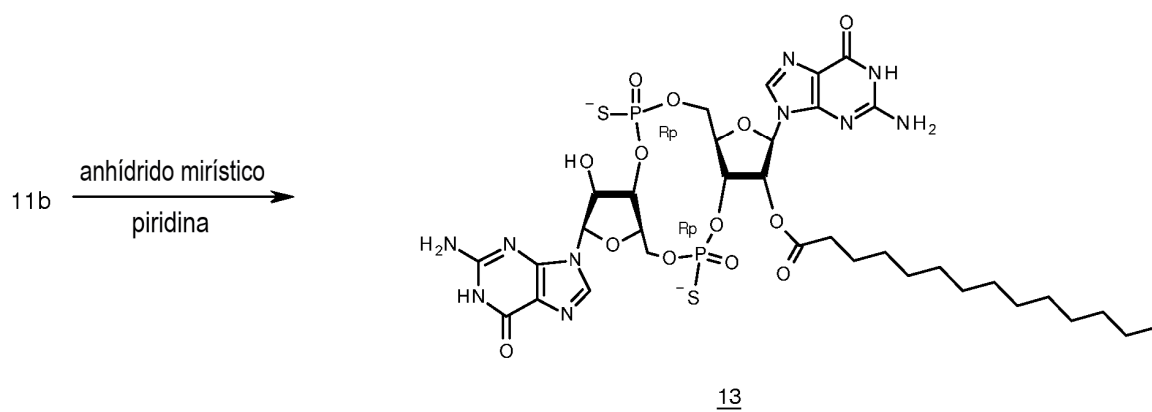
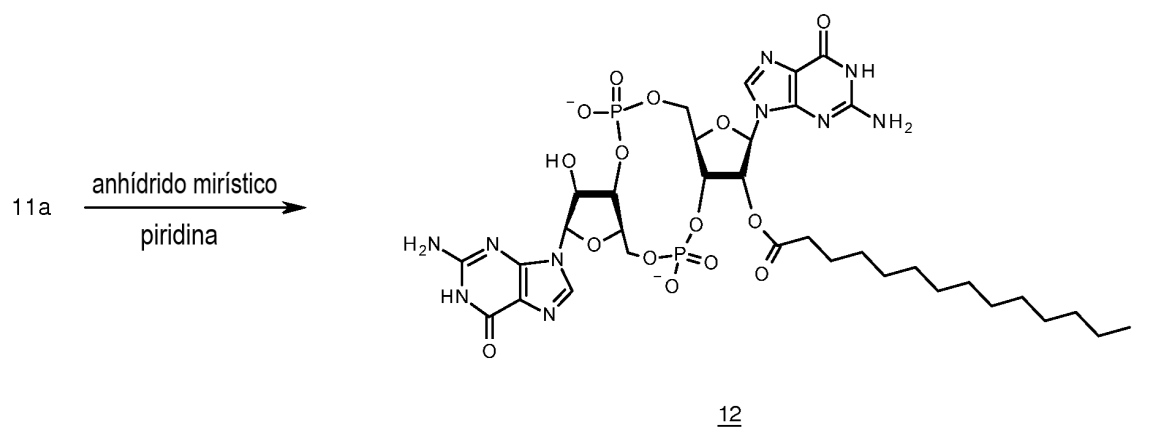


FIG. 14

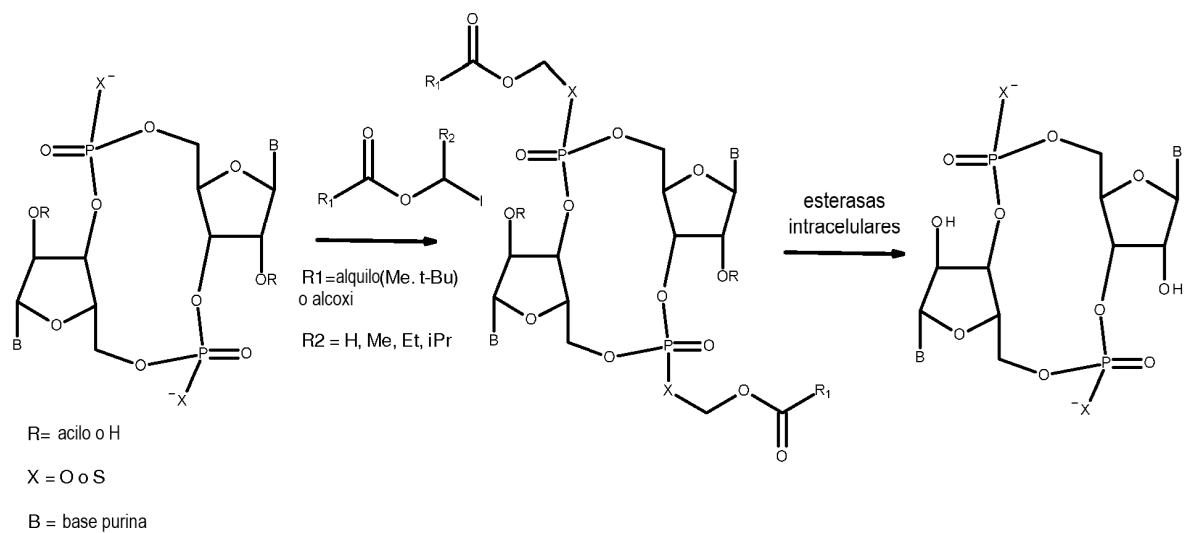


FIG. 15

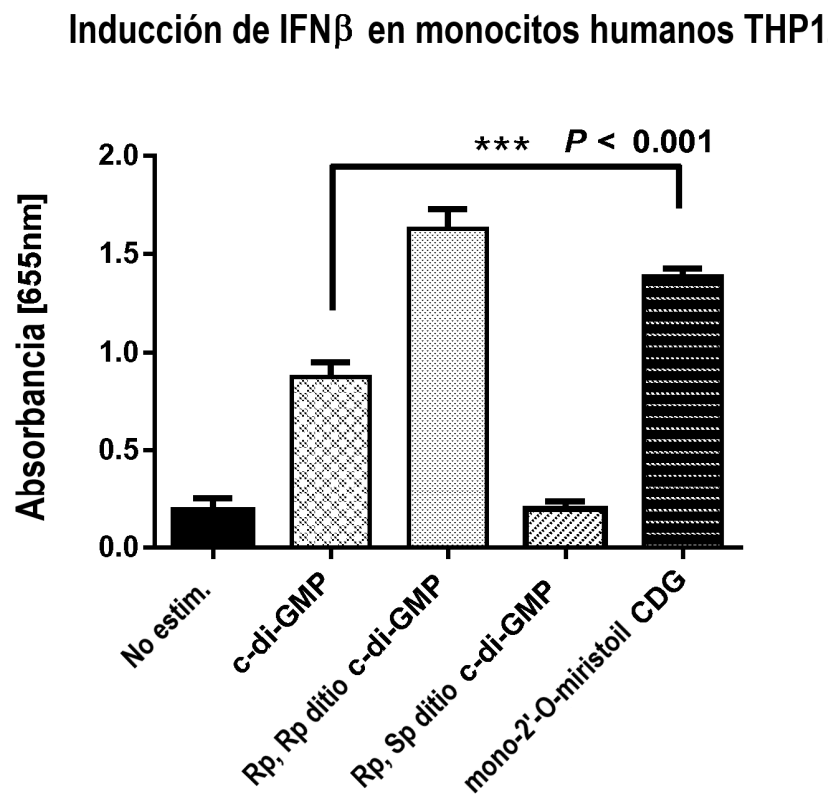


FIG. 16

