



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 714**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03712390 .8**
96 Fecha de presentación : **19.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1487485**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **Imidazoquinolina coadyuvante de vacunas ADN.**

30 Prioridad: **19.03.2002 US 102615**
19.03.2002 US 366057 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2011

73 Titular/es: **POWDERJECT RESEARCH LIMITED**
Ramsgate Road
Sandwich, Kent CT13 9NJ, GB

72 Inventor/es: **Braun, Ralph, Patrick**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 355 714 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

Campo de la invención

La invención se refiere a los campos de las vacunas, los coadyuvantes de vacunas, la biología molecular y la inmunología, y generalmente se refiere a técnicas de inmunización con ácidos nucleicos y coadyuvantes. Más específicamente, la invención se refiere a ciertas composiciones de coadyuvantes, y a estrategias de inmunización con vacunas y/o ácidos nucleicos empleando tales composiciones.

Antecedentes de la invención

Los mecanismos para la inyección de ADN y ARNm en tejidos de mamíferos con fines de inmunización frente a un producto de expresión han sido descritos en la técnica. Se ha demostrado que los mecanismos, denominados "inmunización con ácidos nucleicos" en la presente memoria, logran respuestas inmunitarias tanto humores como mediadas por células. Por ejemplo, se demostró que los sueros de ratones inmunizados con un constructo de ADN que codifica la glicoproteína de la envoltura, gp160, reaccionaban con gp160 recombinante en inmunoanálisis, y se demostró que los linfocitos de los ratones inyectados proliferaban en respuesta a gp120 recombinante, Wang et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4156-4160.

De un modo similar, los ratones inmunizados con el gen de la hormona del crecimiento humana (hGH) demostraron una respuesta inmunitaria basada en anticuerpos. Tang et al. (1992) Nature 356:152-154. Se ha demostrado que la inyección intramuscular de ADN que codifica la nucleoproteína de influenza dirigida por un promotor de mamífero logra una respuesta de CTL CD8+ que puede proteger a los ratones frente a la posterior sensibilización letal con virus. Ulmer et al. (1993) Science 259:1745-1749. Los estudios inmunohistoquímicos del sitio de inyección revelaron que el ADN era absorbido por los mieloblastos, y la producción citoplásmica de proteína viral pudo ser demostrada durante al menos 6 meses.

El documento WO 93/20847 se refiere a composiciones de inmunógeno/coadyuvante de vacuna que comprenden un inmunógeno y como coadyuvante de vacuna una 1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina. Los inmunógenos adecuados incluyen inmunógenos virales y bacterianos vivos e inmunógenos virales, derivados de tumores, protozoicos, derivados de organismos, fúngicos y bacterianos inactivados, toxoides, toxinas, polisacáridos, proteínas, glicoproteínas, péptidos, y similares.

Clin. Microbiol. Rev. 7:277-289 (1994) revisa el uso del coadyuvante imiquimod en una vacuna de glicoproteína de virus herpes simplex de tipo 2 en cobayas.

Compendio de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que un compuesto de imidazoquinolinamina actúa como un coadyuvante eficaz cuando se administra tópicamente de 12 a 36 horas después de una inmunización de cebado o refuerzo. Además se encontró que el compuesto era eficaz en la estimulación de la inmunidad mediada por células. El compuesto es de una serie de compuestos relacionados que se sabe que son capaces de modificar las respuestas inmunitarias.

Por lo tanto, la invención proporciona un compuesto para su uso en un método para intensificar o estimular en un individuo una respuesta inmunitaria mediada por células a un antígeno, donde el compuesto es una imidazoquinolinamina, imidazopiridinamina, 6,7-cicloalquilimidazopiridinamina fusionada, 1,2-imidazoquinolinamina puenteada, tiazolo- u oxazolo-quinolinamina, tiazolo- u oxazolo-piridinamina, imidazonaftiridina o tetrahidroimidazonaftiridinamina, y donde el compuesto se administra tópicamente o transdérmicamente al individuo de 12 a 36 horas después de administrar un polinucleótido recombinante aislado capaz de expresar el antígeno.

La invención también proporciona un polinucleótido recombinante aislado capaz de expresar un antígeno para su uso en un método para intensificar o estimular en un individuo una respuesta inmunitaria mediada por células a dicho antígeno, donde el polinucleótido se administra de 12 a 36 horas antes de la administración tópica o transdérmica al individuo de un compuesto, esto es una imidazoquinolin-amina, imidazopiridinamina, 6,7-cicloalquilimidazopiridinamina fusionada, 1,2-imidazoquinolinamina puenteada, tiazolo- u oxazolo-quinolinamina, tiazolo- u oxazolo-piridinamina, imidazonaftiridina o tetrahidroimidazonaftiridinamina.

Además, la invención proporciona el uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para intensificar o estimular en un individuo una respuesta inmunitaria mediada por células a un antígeno, donde el compuesto es una imidazoquinolinamina, imidazopiridinamina, 6,7-cicloalquilimidazopiridinamina fusionada, 1,2-imidazoquinolinamina puenteada, tiazolo- u oxazolo-quinolinamina, tiazolo- u oxazolo-piridinamina, imidazonaftiridina o tetrahidroimidazonaftiridinamina, y donde el compuesto es va a administrar tópicamente o transdérmicamente al individuo de 12 a 36 horas después de administrar un polinucleótido recombinante aislado capaz de expresar el antígeno.

Breve Descripción de las Figuras

Las Figuras 1 a 17 muestran la actividad coadyuvante del compuesto de la invención en una serie de experimentos de vacunación.

La Figura 16 muestra los Elispot de IFN- γ para sAg 2 semanas después del cebado cuando se utiliza imiquimod como coadyuvante con pdpsC_{18.1}. Las administraciones para las columnas 1 a 13 de la Figura son las siguientes:

1. 1. 2,0 µg de pdpsc 18
2. 2. 0,2 µg de pdpsc 18
3. 3. 0,02 µg de pdpsc 18
4. 4. 2,0 µg de 18 IMQ antes
- 5 6. 6. 0,02 µg de pdpsc 18 IMQ antes
7. 7. 2,0 µg de pdpsc 18 IMQ inmediatamente después
8. 8. 0,2 µg de pdpsc 18 IMQ inmediatamente después
9. 9. 0,02 µg de pdpsc 18 IMQ inmediatamente después
10. 10. 2,0 µg de pdpsc 18 IMQ 24 hr pp
- 10 11. 11. 0,2 µg de pdpsc 18 IMQ 24 hr pp
12. 12. 0,02 µg de pdpsc 18 IMQ 24 hr pp
13. 13. 2 µg de p7313p1c

La Figura 17 muestra Elispot de IFN-γ para el péptido sAg de HBV.

Descripción detallada de la invención

15 Se debe entender que esta invención no está limitada a antígenos concretos o a secuencias de nucleótidos codificantes de antígenos concretas. También se debe entender que se pueden adaptar diferentes aplicaciones de los métodos descritos a las necesidades específicas de la técnica. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones concretas de la invención solamente, y no se pretende que sea limitante.

20 Además, según se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", y "el", "la" incluyen sus referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más de tales agentes, la referencia a "una partícula" incluye la referencia a mezclas de dos o más partículas, la referencia a "una célula receptora" incluye dos o más de tales células, y similares.

25 La invención proporciona la intensificación de una respuesta inmunitaria a un antígeno. El compuesto se administra tópicamente o transdérmicamente a un individuo de 12 a 36 horas después de la administración de un polinucleótido recombinante aislado capaz de expresar un antígeno. Típicamente, el compuesto se administra de 16 a 32, de 20 a 28 o preferiblemente de 22 a 26 horas después de la administración del polinucleótido. De este modo el compuesto se puede administrar aproximadamente 24 horas después de la administración del polinucleótido.

30 La administración del polinucleótido (después de lo cual se administra el compuesto) puede ser una de una serie de administraciones de polinucleótidos o antígenos que se produce en un régimen de administración. Por lo tanto, la administración del polinucleótido puede ser una administración de cebado o refuerzo. De este modo, en una realización de la invención el compuesto se administra de 12 a 36 horas después de la administración de cebado y/o de 12 a 36 horas después de la administración de refuerzo.

35 En una realización, no se administra nada más al individuo en el período de 12 a 36 horas (o ninguno de los demás períodos de tiempo mencionados antes) entre la administración del polinucleótido y la administración del compuesto. Alternativamente, en algunas realizaciones, en este período de tiempo no se administra polinucleótido, o preferiblemente al menos no el mismo polinucleótido que se administró antes. No se administra ningún compuesto adicional en ese período de tiempo.

40 El propósito de la invención es intensificar la respuesta inmunitaria al antígeno. Se intensifica la inmunidad mediada por células, y en particular se intensifica la respuesta de las células T CD8. En este caso la administración del compuesto aumenta el nivel de respuesta de las células T CD8, por ejemplo aumenta el nivel de células T CD8 que experimentan el antígeno. El incremento en la respuesta de las células T CD8 se puede medir utilizando cualquier análisis adecuado (y de este modo puede ser capaz de ser detectada en semejante análisis), tal como un análisis ELISPOT, preferiblemente un análisis ELISPOT IFN-γ.

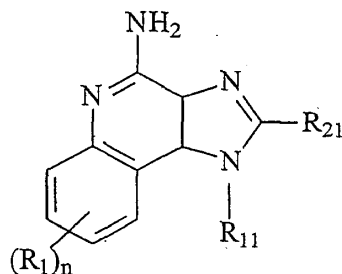
45 En una realización, también se intensifica la respuesta de las células T CD4, tal como la respuesta Th1 de CD4. De este modo, también se pueden incrementar los niveles de células T CD4 que experimentan el antígeno. Tales niveles incrementados de células T CD4 se pueden detectar utilizando un análisis adecuado, tal como un análisis de proliferación.

50 La administración del compuesto puede hacer que la respuesta inmunitaria se desplace a una respuesta mediada por células. De este modo, la respuesta inmunitaria se puede desplazar hacia una respuesta Th1 y/o la razón de anticuerpo IgG1 a IgG2a puede descender. En una realización, la administración del compuesto ocasiona una disminución de la respuesta de anticuerpos.

55 El compuesto se selecciona entre una imidazoquinolinamina, imidazopiridinamina, 6,7-cicloalquilimidazopiridinamina fusionada, 1,2- imidazoquinolinamina puenteada, tiazolo- y oxazolo-quinolinamina y piridinamina

imidazonaftiridina y tetrahidroimidazonaftiridinamina.

Los compuestos preferidos incluyen 1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-aminas definidas por una de las Fórmulas I-V de más abajo:



Fórmula I

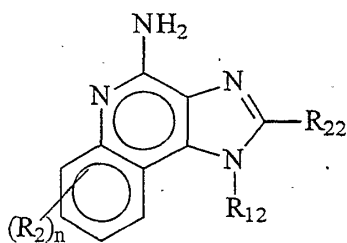
donde:

R11 se selecciona del grupo que consiste en alquilo de uno a diez átomos de carbono, hidroxialquilo de uno a seis átomos de carbono, aciloxialquilo donde el radical aciloxi es alcaniloxi de dos a cuatro átomos de carbono o benzoiloxi, y el radical alquilo contiene de uno a seis átomos de carbono, bencilo, (fenil)etilo y fenilo, estando dicho sustituyente bencilo, (fenil)etilo o fenilo opcionalmente sustituido en el anillo de benceno por uno o dos radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono y halógeno, con la condición de que si dicho anillo de benceno está sustituido con dos de dichos radicales, dichos radicales juntos contienen no más de seis átomos de carbono;

R21 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de uno a ocho átomos de carbono, bencilo, (fenil)etilo y fenilo, estando el sustituyente bencilo, (fenil)etilo o fenilo opcionalmente sustituido en el anillo de benceno con uno o dos radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono y halógeno, con la condición de que cuando el anillo de benceno está sustituido por dos de dichos radicales, los radicales juntos contienen no más de seis átomos de carbono; y

cada R1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, halógeno, y alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, y n es un número entero de 0 a 2, con la condición de que si n es 2, dichos grupos R1 juntos contienen no más de seis átomos de carbono;

Fórmula II



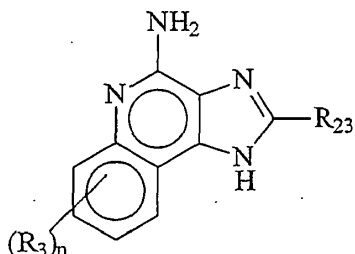
donde:

R12 se selecciona del grupo que consiste en alqueno de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de dos a diez átomos de carbono y alqueno de cadena lineal o cadena ramificada sustituido que contiene de dos a diez átomos de carbono, donde el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono y cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono; y cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono sustituido con alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono; y

R22 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a ocho átomos de carbono, bencilo, (fenil)etilo y fenilo, estando el sustituyente bencilo, (fenil)etilo o fenilo opcionalmente sustituido en el anillo de benceno con uno o dos radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, y halógeno, con la condición de que cuando el anillo de benceno está sustituido con dos de tales radicales, los radicales juntos contienen no más de seis átomos de carbono; y

cada R2 se selecciona independientemente del grupo que consiste en alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, halógeno, y alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, y n es un número entero de cero a 2, con la condición de que si n es 2, dichos grupos R2 juntos contienen no más de seis átomos de carbono;

Fórmula III

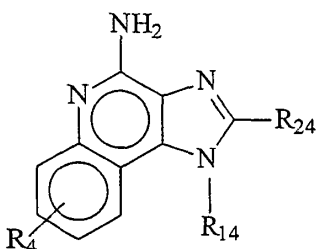


donde:

R23 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de cadena lineal o cadena ramificada de uno a ocho átomos de carbono, bencilo, (fenil)etilo y fenilo, estando el sustituyente bencilo, (fenil)etilo o fenilo opcionalmente sustituido en el anillo de benceno con uno o dos radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de cadena lineal o cadena ramificada de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada de uno a cuatro átomos de carbono, y halógeno, con la condición de que cuando el anillo de benceno está sustituido con dos de tales radicales, los radicales juntos contienen no más de seis átomos de carbono; y

cada R3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada de uno a cuatro átomos de carbono, halógeno, y alquilo de cadena lineal o cadena ramificada de uno a cuatro átomos de carbono, y n es un número entero de cero a 2, con la condición de que si n es 2, dichos grupos R3 juntos contienen no más de seis átomos de carbono;

Fórmula IV



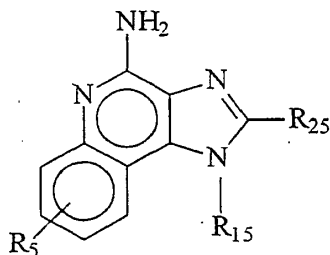
donde:

R14 es -CHR_xR_y donde R_y es hidrógeno o un enlace carbono-carbono, con la condición de que cuando R_y es hidrógeno R_x es alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, hidroxialcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, 1-alquinilo de dos a diez átomos de carbono, tetrahidropiranilo, alcoxialquilo donde el radical alcoxi contiene de uno a cuatro átomos de carbono y el radical alquilo contiene de uno a cuatro átomos de carbono, 2-, 3-, o 4-piridilo, y con la condición adicional de que cuando R_y es un enlace carbono-carbono R_y y R_x juntos forman un grupo tetrahidrofuranilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidróxido e hidroxialquilo de uno a cuatro átomos de carbono;

R24 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, fenilo, y fenilo sustituido donde el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, y halógeno; y

R4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, halógeno, y alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono;

Fórmula V

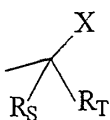


donde:

R15 se selecciona del grupo que consiste en: hidrógeno; alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a diez átomos de carbono y alquilo de cadena lineal o cadena ramificada sustituido que contiene de uno a diez átomos de carbono, donde el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono y cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono sustituido con alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono; alqueno de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de dos a diez átomos de carbono y alqueno de cadena lineal o cadena ramificada sustituido que contiene de dos a diez átomos de carbono, donde el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono y cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono sustituido con alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono; hidroxialquilo de uno a seis átomos de carbono; alcoxialquilo donde el radical alcoxi contiene de uno a cuatro átomos de carbono y el radical alquilo contiene de uno a seis átomos de carbono; aciloxialquilo donde el radical aciloxi es alcaniloxi de dos a cuatro átomos de carbono o benzoiloxi, y el radical alquilo contiene de uno a seis átomos de carbono; bencilo; (fenil)etilo; y fenilo; estando dicho sustituyente bencilo, (fenil)etilo o fenilo opcionalmente sustituido en el anillo de benceno con uno o dos radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, y halógeno, con la condición de que cuando dicho anillo de benceno está sustituido por dos de dichos radicales, los radicales juntos contienen no más de seis átomos de carbono;

R15 es preferiblemente un grupo alquilo C₁-C₂ que está sustituido con hidroxialquilo de 1 a 4 átomos de carbono, y más preferiblemente R15 es un grupo alquilo C₁ que está sustituido con un hidroxialquilo de 3 átomos de carbono;

R25 es



donde:

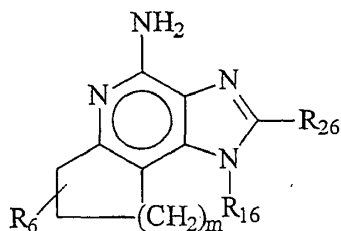
R_S y R_T se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, fenilo, y fenilo sustituido donde el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, y halógeno;

X se selecciona del grupo que consiste en alcoxi que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxialquilo donde el radical alcoxi contiene de uno a cuatro átomos de carbono y el radical alquilo contiene de uno a cuatro átomos de carbono, hidroxialquilo de uno a cuatro átomos de carbono, haloalquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alquilamido donde el grupo alquilo contiene de uno a cuatro átomos de carbono, amino, amino sustituido donde el sustituyente es alquilo o hidroxialquilo de uno a cuatro átomos de carbono, azido, cloro, hidroxilo, 1-morfolino, 1-pirrolidino, alquiltio de uno a cuatro átomos de carbono; y

R5 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, halógeno, y alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

Los compuestos de 6,7-cicloalquilimidazopiridin- amina fusionados preferidos se definen por medio de la Fórmula VI de más abajo:



donde m es 1, 2, o 3;

R16 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno; alquilo cíclico de tres, cuatro, o cinco átomos de carbono; alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a diez átomos de carbono y alquilo de cadena lineal o cadena ramificada sustituido que contiene de uno a diez átomos de carbono, donde el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono y cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono sustituido con alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono; flúor- o cloroalquilo que contiene de uno a diez átomos de carbono y uno o más átomos de flúor o cloro; alqueno de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de dos a diez átomos de carbono y alqueno de cadena lineal o cadena ramificada sustituido que contiene de dos a diez átomos de carbono, donde el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono y cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono sustituido con alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono; hidroxialquilo de uno a seis átomos de carbono; alcoxialquilo donde el radical alcoxi contiene de uno a cuatro átomos de carbono y el radical alilo contiene de uno a seis átomos de carbono; aciloxialquilo donde el radical aciloxi es alcanoiilo de dos a cuatro átomos de carbono o benzoilo, y el radical alquilo contiene de uno a seis átomos de carbono, con la condición de que ninguno de tales grupos alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, hidroxialquilo, alcoxialquilo, o aciloxialquilo tiene un átomo de carbono completamente sustituido unido directamente al átomo de nitrógeno; bencilo; (fenil)etilo; y fenilo; estando dicho sustituyente bencilo, (fenil)etilo o fenilo opcionalmente sustituido en el anillo de benceno con uno o dos radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, y halógeno, con la condición de que cuando dicho anillo de benceno está sustituido con dos de dichos radicales, los radicales juntos contienen no más de seis átomos de carbono;

y $-CHR_xR_y$

donde:

R_y es hidrógeno o un enlace carbono-carbono, con la condición de que cuando R_y es hidrógeno R_x es alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, hidroxialcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, 1-alquino de dos a diez átomos de carbono, tetrahidropiridino, alcoxialquilo donde el radical alcoxi contiene de uno a cuatro átomos de carbono y el radical alquilo contiene de uno a cuatro átomos de carbono, 2-, 3-, o 4-piridilo, y con la condición adicional de que cuando R_y es un enlace carbono-carbono R_y y R_x forman juntos un grupo tetrahidrofuranilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidroxilo e hidroxialquilo de uno a cuatro átomos de carbono,

R26 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a ocho átomos de carbono, hidroxialquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono, morfolinoalquilo, bencilo, (fenil)etilo y fenilo, estando el sustituyente bencilo, (fenil)etilo o fenilo opcionalmente sustituido en el anillo de benceno con un radical seleccionado del grupo que consiste en metilo, metoxi, y halógeno; y

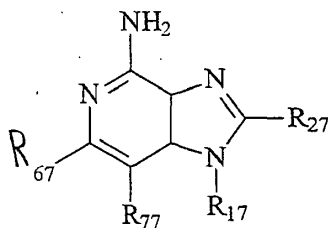
$-C(R_S)(R_T)(X)$ donde R_S y R_T se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, fenilo, y fenilo sustituido donde el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, y halógeno;

X se selecciona del grupo que consiste en alcoxi que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxialquilo donde el radical alcoxi contiene de uno a cuatro átomos de carbono y el radical alquilo contiene de uno a cuatro átomos de carbono, haloalquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alquilamido donde el grupo alquilo contiene de uno a cuatro átomos de carbono, amino, amino sustituido donde el sustituyente es alquilo o hidroxialquilo de uno a cuatro átomos de carbono, azido, alquiltio de uno a cuatro átomos de carbono, y morfolinoalquilo donde el radical alquilo contiene de uno a cuatro átomos de carbono, y

R6 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, flúor, cloro, alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, y fluoro- o cloroalquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono y al menos un átomo de flúor o cloro;

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de imidazopiridinamina preferidos se definen por medio de la Fórmula VII de más abajo:



donde

R17 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno;

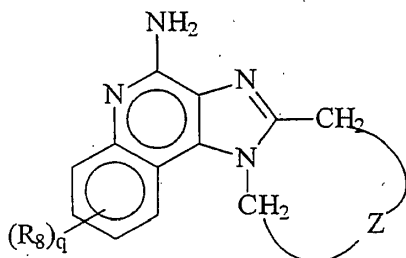
5 -CH₂R_W donde R_W se selecciona del grupo que consiste en alquilo de cadena lineal, cadena ramificada, o cíclico que contiene de uno a diez átomos de carbono, alqueno de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de dos a diez átomos de carbono, hidroxialquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono, alcoxialquilo donde el radical alcoxi contiene de uno a cuatro átomos de carbono y el radical alquilo contiene de uno a seis átomos de carbono, y feniletilo; y -CH=CR_ZR_Z donde cada R_Z es independientemente alquilo de cadena lineal, cadena ramificada, o cíclico de uno a seis átomos de carbono;

10 R27 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a ocho átomos de carbono, hidroxialquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono, alcoxialquilo donde el radical alcoxi contiene de uno a cuatro átomos de carbono y el radical alquilo contiene de uno a seis átomos de carbono, bencilo, (fenil)etilo y fenilo, estando el sustituyente bencilo, (fenil)etilo o fenilo opcionalmente sustituido en el anillo de benceno con un radical seleccionado del grupo que consiste en metilo, metoxi, y halógeno; y morfolinoalquilo donde el radical alquilo contiene de uno a cuatro átomos de carbono;

15 R67 y R77 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo de uno a cinco átomos de carbono, con la condición de que R67 y R77 tomados juntos contienen no más de seis átomos de carbono, y con la condición adicional de que cuando R77 es hidrógeno R67 es distinto de hidrógeno y R27 es distinto de hidrógeno o morfolinoalquilo, y con la condición adicional de que cuando R67 es hidrógeno R77 y R27 son distintos de hidrógeno;

20 y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de 1,2-imidazoquinolinamina puenteados se definen por medio de la Fórmula VIII de más abajo:



donde:

25 Z se selecciona del grupo que consiste en:

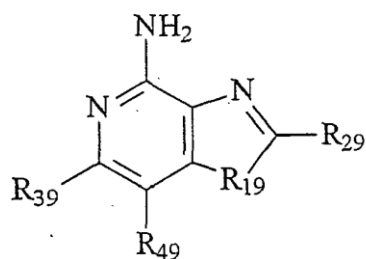
-(CH₂)_p- donde p es 1 a 4;

30 -(CH₂)_a-C(R_DR_B)(CH₂)_b-, donde a y b son números enteros y a+b es de 0 a 3, R_D es hidrógeno o alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, y R_E se selecciona del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, hidroxilo, -OR_F donde R_F es alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, y -NR_G R'_G donde R_G y R'_G son independientemente hidrógeno o alquilo de uno a cuatro átomos de carbono; y -(CH₂)_a-(Y)-(CH₂)_b- donde a y b son números enteros y a+b es de 0 a 3, e Y es O, S, o -NR_J donde R_J es hidrógeno o alquilo de uno a cuatro átomos de carbono;

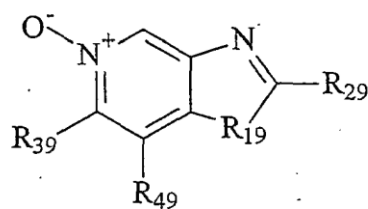
y donde q es 0 o 1 y R8 se selecciona del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono, y halógeno,

35 y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de tiazolo- y oxazolo-quinolinamina y piridinamina adecuados incluyen compuestos de Fórmula IX y Fórmula IXa:



o



donde:

R19 se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, azufre y selenio;

R29 se selecciona del grupo que consiste en

- 5 -hidrógeno;
 -alquilo;
 -alquil-OH;
 -haloalquil-,
 -alquenilo;
 10 -alquil-X-alquilo;
 -alquil-X-alquenilo;
 -alquenil-X-alquilo;
 -alquenil-X-alquenilo;
 -alquil-N(R59)₂ ;
 15 -alquil-N₃;
 -alquil-O-C(O)-N(R59)₂;
 -heterociclilo;
 -alquil-X-heterociclilo;
 -alquenil-X-heterociclilo;
 20 -arilo;
 -alquil-X-azilo;
 -alquenil-X-alilo;
 -heteroarilo;
 -alquil-X-heteroarilo; y
 25 -alquenil-X-heteroarilo;

R39 y R49 son cada uno independientemente:

- hidrógeno;
 -X-alquilo;
 -halo;
 30 -haloalquilo;
 -N(R59)₂;

o cuando se toman juntos, R39 y R49 forman un anillo cicloalquílico o heterocíclico, aromático, heteroaromático fusionado;

X se selecciona del grupo que consiste en -O-, -S-,

- 35 -NR59-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, y un enlace; y

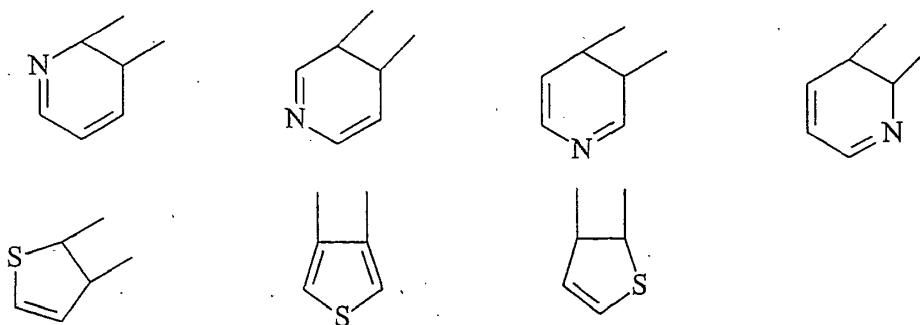
cada R59 es independientemente H o alquilo C₁-C₈;

Para la fórmula IX y IXa los términos "alquilo" y "alquenilo" hacen referencia a un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado, o un grupo cíclico (es decir, cicloalquilo y cicloalquenilo) que contiene de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10,

más preferiblemente de 1 a 8 átomos de carbono, a no ser que se especifique lo contrario. Los grupos alquilo típicos son, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Los grupos cíclicos ilustrativos incluyen ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo y adamantilo. El prefijo "alqu," cuando se utiliza, por ejemplo para "alcoxi" y similares, también tiene el mismo significado.

El término "arilo" hace referencia a un anillo o sistema anular aromático carbocíclico. El grupo arilo es preferiblemente un anillo de seis-miembros, tal como fenilo, o un sistema anular policíclico aromático, tal como naftilo. El grupo arilo más preferido es fenilo que puede estar insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes definidos más abajo. Los ejemplos de otros grupos arilo adecuados incluyen bifenilo, fluorenilo e indenilo.

El término "heteroarilo" hace referencia a un anillo o sistema anular aromático que contiene uno o más heteroátomos, en el que los heteroátomos se seleccionan entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Los grupos heteroarilo adecuados incluyen furilo, tienilo, piridilo, quinolinilo, tetrazolilo, imidazo, etcétera. En el caso en el que R3 y R4 se toman juntos y forman un heteroanillo aromático de 5- o 6-miembros, el heteroátomo es nitrógeno, oxígeno o azufre y el anillo puede contener uno o más de tales átomos. Preferiblemente, el heteroátomo es nitrógeno o azufre. Los heteroanillos aromáticos preferidos formados por R3 y R4 están ilustrados por las siguientes fórmulas donde las dos líneas indican donde están fusionados.

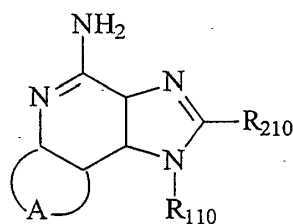


Los términos "heterocíclico" y "heterociclilo" hacen referencia a anillos o sistemas anulares no aromáticos que contienen uno o más heteroátomos en el anillo (por ejemplo, O, S, N). Los grupos heterocíclicos ilustrativos incluyen pirrolidinilo, tetrahydrofuranilo, morfolinilo, piperidino, piperazino, tiazolidinilo, imidazolidinilo, y similares.

Todos los anillos y sistemas anulares anteriores pueden estar insustituidos o sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo, alcoxi, alquiltio, hidroxilo, halógeno, haloalquilo, polihaloalquilo, perhaloalquilo (por ejemplo, trifluorometilo), trifluoroalcoxi (por ejemplo, trifluorometoxi), nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, alquilcarbonilo, alquencilcaxbonilo, arilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, nitrilo y alcoxycarbonilo. Los sustituyentes preferidos son alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, halo, amino, alquilamino, dialquilamino, hidroxilo, alcoxi (C₁-C₄)-metilo y trifluorometilo.

El término "halo" hace referencia a un átomo de halógeno, tal como, por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo.

Los compuestos de imidazonaftiridina y tetrahydroimidazonaftiridina adecuados son aquellos con las Fórmulas X y XI de más abajo:



Fórmula X

donde

A es =N-CR=CR-CR=; =CR-N=CR-CR=; =CR-CR=N-CR=; o =CR-CR=CR-N=;

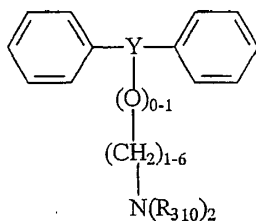
R110 se selecciona del grupo que consiste en:

- hidrógeno;
- alquilo C₁-C₂₀ o alquenilo C₂-C₂₀ que no está sustituido

o está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en:

- arilo;
- heteroarilo;

	-heterociclilo;
	-O- alquilo C ₁ -C ₂₀ ,
	-O-(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -arilo;
5	-O-(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -heteroarilo;
	-O-(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -heterociclilo;
	-alcoxi(C ₁ -C ₂₀)carbonilo;
	-S(O) ₀₋₂ -alquilo C ₁ -C ₂₀ ;
	-S(O) ₀₋₂ -(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -arilo;
10	-S(O) ₀₋₂ -(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -heteroarilo;
	-S(O) ₀₋₂ -(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -heterociclilo;
	-N(R310) ₂ ;
	-N ₃ ;
	oxo;
	-halógeno;
15	-NO ₂ ;
	-OH; y
	-SH; y
	-alquil(C ₁ -C ₂₀)-NR310-Q-X-R410 o – alquenil(C ₂₋₂₀)-NR310-Q-X-R410 donde Q es -CO- o -SO ₂ -; X es un enlace, -O- o
20	-NR310- y R410 es arilo; heteroarilo; heterociclilo; o
	-alquilo C ₁ -C ₂₀ o alquenilo C ₂₋₂₀ que está insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en:
	-arilo;
	-heteroarilo;
25	-heterociclilo;
	-O-alquilo C ₁ -C ₂₀ ,
	-O-(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -arilo;
	-O-(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -heteroarilo;
	-O-(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -heterociclilo;
30	-alcoxi(C ₁ -C ₂₀)carbonilo;
	-S(O) ₀₋₂ -alquilo C ₁ -C ₂₀ ;
	-S(O) ₀₋₂ -(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -arilo;
	-S(O) ₀₋₂ -(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -heteroarilo;
	-S(O) ₀₋₂ -(alquil C ₁ -C ₂₀) ₀₋₁ -heterociclilo;
35	-N(R310) ₂ ;
	-NR310-CO-O-alquilo C ₁ -C ₂₀ ;
	-N ₃ ;
	oxo;
	-halógeno;
40	-NO ₂ ;
	-OH; y
	-SH; o R410 es



donde Y es -N- o -CR-;

R210 se selecciona del grupo que consiste en:

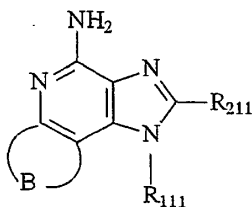
- hidrógeno;
- alquilo C_1-C_{10} ;
- alquenilo C_2-C_{10} ;
- acrilo;
- alquil(C_1-C_{10})-O-alquilo C_1-C_{10} ;
- alquil(C_1-C_{10})-O-alquenilo C_2-C_{10} ; y
- alquilo C_1-C_{10} o alquenilo C_2-C_{10} sustituido con uno o

más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en:

- OH;
- halógeno;
- $N(R_{310})_2$;
- CO- $N(R_{310})_2$;
- CO-alquilo C_1-C_{10} ;
- N_3 ;
- arilo;
- heteroarilo;
- heterociclilo;
- CO-arilo; y
- CO-heteroarilo;

cada R310 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_{10} ; y

cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , halógeno y trifluorometilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.



Fórmula XI

donde:

B es -NR-C(R)₂-C(R)₂-C(R)₂-; -C(R)₂-NR-C(R)₂-C(R)₂-;

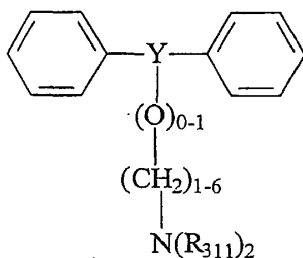
-C(R)₂-C(R)₂-NR-C(R)₂- o -C(R)₂-C(R)₂-C(R)₂-NR-;

R111 se selecciona del grupo que consiste en:

- hidrógeno;
- alquilo C_1-C_{20} o alquenilo C_2-20 que está

insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en:

5	- arilo; - heteroarilo; - heterociclilo; - O- alquilo C₁-C₂₀; - O-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-arilo; - O-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-heteroarilo; - O-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-heterociclilo; - alcoxi(C₁-C₂₀)carbonilo; - S(O)₀₋₂-alquilo C₁-C₂₀;
10	- S(O)₀₋₂-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-arilo; - S(O)₀₋₂-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-heteroarilo; - S(O)₀₋₂-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-heterociclilo; - N(R311)₂;
15	- N₃, - oxo; - halógeno; - NO₂; - OH; y - SH; y
20	alquil(C₁-C₂₀)-NR311-Q-X-R411 o -alquenil(C₂₋₂₀)-NR311-Q-X-R411 donde Q-CO- o -SO₂-; X es un enlace, -O- o -NR311 - y R411 es arilo; heteroaril-heterociclilo; o -alquilo C₁-C₂₀ o alquenilo C₂₋₂₀ que está insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en:
25	-arilo; -heteroarilo; -heterociclilo; -O-alquilo C₁-C₂₀, -O-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-arilo; -O-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-heteroarilo; -O-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-heterociclilo;
30	-alcoxi(C₁-C₂₀)carbonilo; -S(O)₀₋₂-alquilo C₁-C₂₀; -S(O)₀₋₂-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-arilo; -S(O)₀₋₂-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-heteroarilo; -S(O)₀₋₂-(alquil C₁-C₂₀)₀₋₁-heterociclilo;
35	-N(R311)₂; -NR311-CO-O-alquilo C₁-C₂₀; -N₃; -oxo; -halógeno;
40	-NO₂; -OH; y -SH; o R411 es



donde Y es -N- o -CR-;

R211 se selecciona del grupo que consiste en:

- hidrógeno;
- alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$;
- alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$;
- arilo
- alquil($\text{C}_1\text{-C}_{10}$)-O-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$;
- alquil($\text{C}_1\text{-C}_{10}$)-O-alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$; y
- alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ o alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en:

- OH;
- halógeno;
- $\text{N}(\text{R}_{311})_2$;
- $\text{CO-N}(\text{R}_{311})_2$;
- CO-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$;
- N_3 ;
- acrilo;
- heteroarilo;
- heterociclilo;
- CO-arilo; y
- CO-heteroarilo;

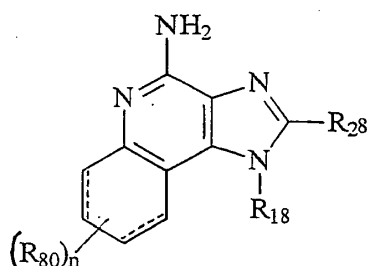
cada R311 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$; y

cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, halógeno y trifluorometilo, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los sustituyentes R11-R111 anteriores se designan generalmente "sustituyentes 1" en la presente memoria. Los sustituyentes 1 preferidos son alquilo que contiene de uno a seis átomos de carbono e hidroxialquilo que contiene de uno a seis átomos de carbono. Más preferiblemente el sustituyente 1 es 2-metilpropilo o 2-hidroxi-2-metilpropilo.

Los sustituyentes R21-R211 anteriores se designan generalmente "sustituyentes 2" en la presente memoria. Los sustituyentes 2 preferidos son hidrógeno, alquilo de uno a seis átomos de carbono, alcoxialquilo donde el radical alcoxi contiene de uno a cuatro átomos de carbono y el radical alquilo contiene de uno a cuatro átomos de carbono, e hidroxialquilo de uno a cuatro átomos de carbono. Más preferiblemente el sustituyente 2 es hidrógeno, metilo, butilo, propilo hidroximetilo, etoximetilo o metoxietilo.

En los casos en los que n puede ser cero, uno, o dos, n es preferiblemente cero o uno. El compuesto de la invención puede estar definido por la Fórmula XII de más abajo:



donde

R18 es -alquil-NR3-SO₂-X-R4 o -alquenil-NR3-SO₂-X-R4;

X es un enlace o -NR5-;

- 5 R4 es arilo, heteroarilo, heterociclilo, alquilo o alquenilo, cada uno de los cuales puede estar insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en:
- alquilo;
 - alquenilo;
 - arilo;
 - 10 - heteroarilo;
 - heterociclilo;
 - arilo sustituido;
 - heteroarilo sustituido;
 - heterociclilo sustituido;
 - 15 - O-alquilo;
 - O-(alquil)₀₋₁-arilo;
 - O-(alquil)₀₋₁-arilo sustituido;
 - O-(alquil)₀₋₁-heteroarilo;
 - O-(alquil)₀₋₁-heteroarilo sustituido;
 - 20 - O-(alquil)₀₋₁-heterociclilo;
 - O-(alquil)₀₋₁-heterociclilo sustituido;
 - COOH;
 - CO-O-alquilo;
 - CO-alquilo;
 - 25 - S(O)₀₋₂-alquilo;
 - S(O)₀₋₂-(alquil)₀₋₁-arilo;
 - S(O)₀₋₂-(alquil)₀₋₁-arilo sustituido;
 - S(O)₀₋₂-(alquil)₀₋₁-heteroarilo;
 - S(O)₀₋₂-(alquil)₀₋₁-heteroarilo sustituido;
 - 30 - S(O)₀₋₂-(alquil)₀₋₁-heterociclilo;
 - S(O)₀₋₂-(alquil)₀₋₁-heterociclilo sustituido;
 - (alquil)₀₋₁-NR3 R3;
 - (alquil)₀₋₁-NR3-CO-O-alquilo;
 - (alquil)₀₋₁-NR3-CO-alquilo;
 - 35 - (alquil)₀₋₁-NR3-CO-arilo;
 - (alquil)₀₋₁-NR3-CO-arilo sustituido;
 - (alquil)₀₋₁-NR3-CO-heteroarilo;
 - (alquil)₀₋₁-NR3-CO-heteroarilo sustituido;

- N₃;
- halógeno;
- haloalquilo;
- haloalcoxi;
- 5 - CO-haloalcoxi;
- NO₂;
- CN;
- OH;
- SH; y en el caso de alquilo, alquenilo, o
- 10 heterociclilo, oxo;

R28 se selecciona del grupo que consiste en:

- hidrógeno;
- alquilo;
- alquenilo;
- 15 -arilo;
- arilo sustituido;
- heteroarilo;
- heteroarilo sustituido;
- alquil-O-alquilo;
- 20 -alquil-O-alquenilo; y
- alquilo o alquenilo sustituido con uno o más
- sustituyentes seleccionados del grupo que consiste
- en:

- OH;
- 25 - halógeno;
- N(R₃)₂ ;
- CO-N(R₃)₂ ;
- CO-alquilo C₁-C₁₀;
- CO-O-alquilo C₁-C₁₀;
- 30 - N₃;
- arilo;
- arilo sustituido;
- heteroarilo;
- heteroarilo sustituido;
- 35 - heterociclilo;
- heterociclilo sustituido;
- CO-arilo;
- CO-(arilo sustituido);
- CO-heteroarilo; y
- 40 - CO-(heteroarilo sustituido);

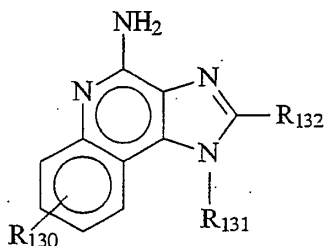
cada R3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀;

R5 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀, o R4 y R5 se pueden combinar para formar

- 45 un anillo heterocíclico de 3 a 7 miembros o

heterocíclico sustituido; n es de 0 a 4 y cada R₈₀ presente se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, halógeno y trifluorometilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la presente invención se pueden definir adicionalmente por medio de la Fórmula (XIII) de más abajo:



donde:

R₁₃₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono y alquilo sustituido de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono, donde el sustituyente se selecciona entre halógeno, amino, mono-alquilo amino, di-alquilamino, alcoxi, alquiltio, hidroxilo o hidroxialquilo, comprendiendo los grupos alquilo de los sustituyentes de uno a cuatro átomos de carbono;

R₁₃₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono y alquilo sustituido de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono, donde el sustituyente es X-R' donde X es -NR'', -O- o -S-, R' es hidrógeno o alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono y R'' es hidrógeno o alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono; y

R₁₃₀ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, halógeno, y alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono.

Los compuestos preferidos de la invención son los compuestos de Fórmula (XIII) donde:

R₁₃₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono y alquilo sustituido de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono, donde el sustituyente se selecciona entre alcoxi, hidroxilo o hidroxialquilo, comprendiendo los grupos alquilo de los sustituyentes de uno a cuatro átomos de carbono;

R₁₃₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono y alquilo sustituido de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono, donde el sustituyente es X-R' donde X es -O- y R' es hidrógeno o alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono; y

R₁₃₀ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono y alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono;

Los compuestos adicionalmente preferidos de la invención son los compuestos de la invención de Fórmula (XIII) donde:

R₁₃₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono y alquilo sustituido de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, donde el sustituyente es hidroxilo o hidroxialquilo de uno a cuatro átomos de carbono;

R₁₃₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono y alquilo sustituido de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, donde el sustituyente es X-R' donde X es -O- y R' es alquilo de cadena lineal o ramificada que contiene uno o dos átomos de carbono; y

R₁₃₀ es hidrógeno.

Según se utiliza en la presente memoria (y en particular con referencia a la Fórmula XII), a menos que se defina de otro modo los términos "alquilo", "alquenilo", "alquinilo" y el prefijo "-alqu" incluyen tanto los grupos de cadena

lineal y cadena ramificada como los grupos cíclicos, es decir, cicloalquilo y cicloalqueno. A menos que se especifique de otro modo, estos grupos contienen de 1 a 20 átomos de carbono, conteniendo alqueno y los grupos alqueno de 2 a 20 átomos de carbono. Los grupos preferidos tienen un total de hasta 10 átomos de carbono. Los grupos cíclicos pueden ser monocíclicos o policíclicos y preferiblemente tienen de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo. Los grupos cíclicos ilustrativos incluyen ciclopentilo, ciclopentilo, ciclohexilo y adamantilo.

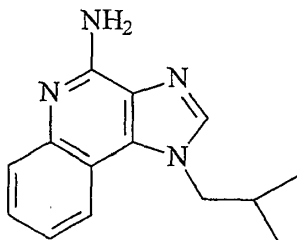
El término "haloalquilo" incluye los grupos que están sustituidos con uno o más átomos de halógeno, incluyendo grupos donde todos los átomos de hidrógeno disponibles están remplazados por átomos de halógeno. Esto también se verifica para los grupos que incluyen el prefijo "haloalqu-". Los ejemplos de grupos haloalquilo adecuados son clorometilo, trifluorometilo, y similares.

El término "arilo" según se utiliza en la presente memoria incluye anillos o sistemas anulares carbocíclicos aromáticos. Los ejemplos de los grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, bifenilo, fluorenilo y indenilo. El término "heteroarilo" incluye anillos o sistemas anulares aromáticos que contienen al menos un heteroátomo en el anillo (por ejemplo, O, S, N). Los grupos heteroarilo adecuados incluyen furilo, tienilo, piridilo, quinolinilo, tetrazolilo, imidazo, pirazolo, tiazolo, oxazolo, y similares.

"Heterociclilo" incluye anillos y sistemas anulares no aromáticos que contienen al menos un heteroátomo en el anillo (por ejemplo, O, S, N). Los grupos heterocíclicos ilustrativos incluyen pirrolidinilo, tetrahydrofuranilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piperidinilo, piperazinilo, tiazolidinilo, imidazolidinilo, y similares.

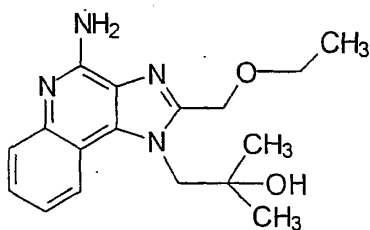
A menos que se especifique de otro modo, los términos "cicloalquilo sustituido", "arilo sustituido", "heteroarilo sustituido" y "heterociclilo sustituido" indican que los anillos o sistemas anulares en cuestión están sustituidos adicionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alcoxi, alquiltio, hidroxilo, halógeno, haloalquilo, haloalquilcarbonilo, haloalcoxi (por ejemplo, trifluorometoxi), nitro, alquilcarbonilo, alquencilcarbonilo, arilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, arilo, arilalquilo, heteroalilo, heteroarilalquilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, nitrilo, alcóxicarbonilo, alcanóilo, alcanóiltio, y en el caso de cicloalquilo y heterociclilo, oxo.

Un compuesto preferido de la invención es imiquimod:



El Imiquimod es 1-(2-metil-propil)-1H-imidazo[4,5-c]-quinolin-4-amina. Tiene una fórmula molecular de $C_{14}H_{16}N_4$ y un peso molecular de 240,3.

Un compuesto preferido de Fórmula (XIII) es resiquimod:



El Resiquimod es 4-amino-2-etoximetil-alfa,alfa-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolino-1-etanol. (R-848; S-28463)

El compuesto de la invención puede ser preparado mediante métodos conocidos, por ejemplo como se describe en los documentos US-B1-6.245.776, US-A-4.689.338, US-A-5.389.640, US-A-5.268.376, US-A-4.929.624, US-A-5.266.575, US-A-5.352.784, US-A-5.494.916, US-A-5.482.936, US-A-5.346.905, US-A-5.395.937, US-A-5.238.944, US-A-5.525.612, US-B1-6.323.200, US-B1-6.331.539 y WO 99/29693.

El polinucleótido que codifica el antígeno puede estar en forma de una composición de vacuna. El término "composición de vacuna" significa cualquier composición farmacéutica que contiene polinucleótidos que codifican un antígeno, cuya composición se puede utilizar para prevenir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto.

El compuesto es liberado tópicamente o transdérmicamente. Generalmente, semejante liberación tópica será una liberación transdérmica. El término liberación "transdérmica" significa administración intradérmica (p. ej., en la dermis o epidermis), transdérmica (p. ej., "percutánea") y transmucosal, es decir, liberación mediante el paso de un

agente en o a través de la piel o tejido mucoso. Véanse, por ejemplo, *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Had Graft y Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson y Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); y *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1- 3, Kydonieus y Berner (eds.), CRC Press, (1987).

De este modo, la liberación tópica o transdérmica abarca la liberación de partículas desde un dispositivo de liberación de partículas (por ejemplo jeringa sin aguja) como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.630.796, así como la liberación mediada por partículas de portadores núcleo recubiertos como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.865.796,

Por "portador núcleo" se quiere significar una partícula portadora sobre la cual se aplica como revestimiento un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) con el fin de conferir un tamaño de partícula concreto así como una densidad suficientemente elevada para lograr el momento requerido para la penetración de la membrana celular, de manera que el ácido nucleico se pueda liberar utilizando técnicas de liberación mediadas por partículas, por ejemplo las descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.100.792. Los portadores núcleo típicamente incluyen materiales tales como tungsteno, oro, platino, ferrita, poliestireno y látex. Véase, por ejemplo, *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, Nueva York, NY páginas 10-11.

Por "dispositivo de liberación de partículas", o "jeringa sin aguja", se quiere significar un aparato que libera una composición particulada transdérmicamente, sin una aguja convencional que horade la piel. Los dispositivos de liberación de partículas para su uso en la presente invención se comentan en todo este documento.

Por "antígeno" se quiere significar una molécula que contiene uno o más epítomos que estimularán el sistema inmunitario de un anfitrión para que elabore una respuesta inmunitaria específica del antígeno celular, o una respuesta humoral de anticuerpos. De este modo, los antígenos incluyen proteínas, polipéptidos, fragmentos de proteínas antigénicas, oligosacáridos, polisacáridos, y similares. Además, el antígeno puede ser obtenido de cualquier organismo o patógeno conocido, por ejemplo virus, bacterias, parásitos, plantas, protozoos, u hongos, y puede ser un organismo completo. El término también incluye antígenos tumorales. De un modo similar, también está incluido en la definición de antígeno un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno, por ejemplo en aplicaciones de inmunización con ADN.

También están incluidos los antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepítomos, epítomos colindantes, y otros antígenos recombinantes u obtenidos sintéticamente (Bergmann et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23: 2777-2781; Bergmann et al. (1996) *J. Immunol.* 157: 3242-3249; Suhrbier, A. (1997) *Immunol. y Cell Biol.* 75: 402-408; Gardner et al. (1998) 12^a World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, 28 de Junio-3 de Julio, 1998).

El término "péptido" se utiliza en su sentido más amplio para hacer referencia a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácido, análogos de aminoácidos, u otros peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar conectadas por medio de enlaces peptídicos u otros enlaces, por ejemplo éster, éter, etc.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "aminoácido" hace referencia a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y los isómeros ópticos D o L, y los análogos de aminoácido y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina comúnmente oligopéptido si la cadena del péptido es corta. Si la cadena del péptido es larga, el péptido se denomina típicamente polipéptido o proteína.

El antígeno típicamente comprende uno o más epítomos de células T. "Los epítomos de células T" son generalmente aquellos rasgos de la estructura de un péptido capaces de inducir una respuesta de las células T. Con respecto a esto, se acepta en la técnica que los epítomos de las células T comprenden determinantes peptídicos lineales que adoptan conformaciones ampliadas dentro de la hendidura de unión al péptido de las moléculas del MHC, (Unanue et al. (1987) *Science* 236: 551-557). Según se utiliza en la presente memoria, un epítomo de las células T es generalmente un péptido que tiene aproximadamente 8-15, preferiblemente 5-10 o más residuos de aminoácido.

El compuesto actúa como coadyuvante. No obstante, también se pueden utilizar coadyuvantes adicionales en el método de la invención. Típicamente, tales coadyuvantes adicionales se administran simultáneamente con el polinucleótido que expresa el antígeno. Según se utiliza en la presente memoria el término "coadyuvante" hace referencia a cualquier material que potencie la acción de un fármaco, antígeno, polinucleótido, vector o similares.

De este modo, un ejemplo de un coadyuvante es una "citoquina". Según se utiliza en la presente memoria, el término "citoquina" hace referencia a uno cualquiera de los numerosos factores que ejercen una variedad de efectos sobre las células, por ejemplo, induciendo crecimiento, proliferación o maduración. Ciertas citoquinas, por ejemplo TRANCE, flt-3L, y CD40L, intensifican la capacidad inmunoestimuladora de las APC. Los ejemplos no limitantes de las citoquinas que se pueden utilizar solas o combinadas incluyen, la interleuquina-2 (IL-2), el factor de células totipotenciales (SCF), la interleuquina 3 (IL-3), la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 12 (IL-12), el G-CSF, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la interleuquina-1 alfa (IL-1 α), la interleuquina-11 (IL-11), MIP-1 α , el factor inhibidor de la leucemia (LIF), el ligando c-kit, la trombopoyetina (TPO), el ligando CD40 (CD40L), la citoquina inducida por la activación relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRANCE) y el ligando flt3 (flt-3L). Las citoquinas son asequibles comercialmente de diferentes proveedores tales como, por ejemplo, Genzyme (Framingham, MA), Genentech (South San Francisco, CA), Amgen (Thousand Oaks, CA), R & D Systems and Immunex (Seattle, WA).

Las secuencias de muchas de estas moléculas también se encuentran disponibles, por ejemplo, de la base de

datos GenBank. Se pretende, aunque no siempre se establece explícitamente, que las moléculas que tienen una actividad biológica similar a la de las citoquinas de tipo salvaje o purificadas (p. ej., producidas recombinantemente o sus mutantes) y los ácidos nucleicos que codifican estas moléculas sean utilizadas dentro del espíritu y el alcance de la invención.

Una composición que contiene un antígeno seleccionado y un coadyuvante o una composición de vacuna que se co-administra con un coadyuvante, presenta una "inmunogenicidad incrementada" cuando posee una mayor capacidad para lograr una respuesta inmunitaria que la respuesta inmunitaria lograda por una cantidad equivalente del antígeno administrado sin el coadyuvante. De este modo, una composición de vacuna puede presentar "inmunogenicidad incrementada" debido a que el antígeno es más fuertemente inmunogénico o porque son necesarias una dosis inferior o dosis más pequeñas de antígeno para lograr una respuesta inmunitaria en el sujeto al cual se administra el antígeno.

Semejante inmunogenicidad incrementada puede ser determinada mediante la administración de controles de la composición coadyuvante y antígeno a animales y comparando los títulos de anticuerpo y/o la inmunidad mediada por células entre los dos utilizando análisis convencionales tales como radioinmunoanálisis, ELISA, análisis de CTL, y similares, bien conocidos en la técnica.

Los términos "molécula de ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente y hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o sus análogos. Los ejemplos no limitantes de los polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento génico, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores.

Un polinucleótido está compuesto típicamente por una secuencia específica de cuatro bases nucleotídicas: adenina (A); citosina (C); guanina (G); y timina (T) (uracilo (U) sustituye a timina (T) cuando el polinucleótido es ARN). De este modo, el término secuencia de polinucleótidos es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética puede ser introducida en bases de datos en un ordenador que tenga una unidad de procesamiento central y utilizada para aplicaciones bioinformáticas tales como la genómica funcional y la búsqueda de homología.

Un "gen" según se utiliza en el contexto de la presente invención es una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico genético (cromosoma, plásmido, etc.) con el cual está asociada una función genética. Un gen es una unidad hereditaria, por ejemplo de un organismo, que comprende una secuencia de polinucleótidos (p. ej., una secuencia de ADN para mamíferos) que ocupa una localización física específica (un "locus de un gen" o "locus genético") dentro del genoma de un organismo. Un gen puede codificar un producto expresado, tal como un polipéptido o un polinucleótido (p. ej., ARNt). Alternativamente, un gen puede definir una localización genómica para un evento/función concretos, tal como la unión de proteínas y/o ácidos nucleicos (p. ej., sitios de anclaje de fagos), donde el gen no codifica un producto expresado. Típicamente, un gen incluye secuencias codificantes, tales como secuencias codificantes de polipéptidos, y secuencias no codificantes, tales como secuencias promotoras, secuencias de poli-adenilación, secuencias reguladoras de la transcripción (p. ej., secuencias intensificadoras). Muchos genes eucarióticos tienen "exones" (secuencias codificantes) interrumpidas por "intrones" (secuencias no codificantes). En ciertos casos, un gen puede compartir secuencias con otro gen u otros genes (por ejemplo, genes solapantes).

Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que es transcrita (en el caso del ADN) y traducida (en el caso del ARNm) a un polipéptido in vivo cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas (o "elementos de control").

Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia codificante puede incluir, pero no está limitada a, ADNc de ARNm viral, procariótico o eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN viral o procariótico, e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción puede estar localizada 3' con respecto a la secuencia codificante. La transcripción y traducción de las secuencias codificantes están reguladas típicamente por "elementos de control", incluyendo, pero no limitados a, promotores de la transcripción, elementos intensificadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, secuencias de poliadenilación (localizadas 3' con respecto al codón de terminación de la traducción), secuencias para la optimización del inicio de la traducción (localizadas 5' con respecto a la secuencia codificante), y secuencias de terminación de la traducción.

Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos que inicia la transcripción de un polinucleótido de codifica un polipéptido. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos conectada operablemente al promotor es inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores reprimibles (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos conectada operablemente al promotor es reprimida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y promotores constitutivos. Además, tales promotores también tienen especificidad de tejido.

Se pretende que el término "promotor" o "elemento de control" incluya regiones promotoras completas y segmentos funcionales (p. ej., controle la transcripción o la traducción) de estas regiones. El promotor presente en el polinucleótido que es capaz de expresar el antígeno es generalmente capaz de causar la expresión de la secuencia codificante en una célula que se encuentra en las cercanías de la piel.

El polinucleótido capaz de expresar el antígeno puede ser liberado en forma de un vector. Un "vector" es capaz de transferir secuencias génicas a células diana (p. ej., vectores virales, vectores no virales, portadores particulados, y liposomas). Típicamente, "constructo vector", "vector de expresión", y "vector de transferencia génica" representan un constructo de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias génicas a células diana. De este modo, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales.

Una molécula de "polinucleótido aislada" es una molécula separada y discreta de ácido nucleico del organismo completo en el cual se encuentra la molécula en la naturaleza; o una molécula de ácido nucleico privada, en su totalidad o en parte, de secuencias normalmente asociadas con ella en la naturaleza; o una secuencia, como se encuentra en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas (como se define más abajo) asociadas con ella.

"Conectado operablemente" hace referencia a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de manera que realizan su función habitual. De este modo, un promotor dado que está conectado operablemente a una secuencia codificante (p. ej., un antígeno de interés) es capaz de llevar a cabo la expresión de la secuencia codificante cuando las proteínas reguladoras y las enzimas apropiadas están presentes. En algunos casos, no es necesario que ciertos elementos de control estén contiguos a la secuencia codificante, con tal que funcionen dirigiendo la expresión del mismo. Por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias transcritas no traducidas aún entre la secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora todavía puede considerarse "conectada operablemente" a la secuencia codificante.

"Recombinante" según se utiliza en la presente memoria para describir una molécula de ácido nucleico significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético, o sintético que, en virtud de su origen o manipulación: (1) no está asociado con todo o parte del polinucleótido con el cual está asociado en la naturaleza; y/o (2) está conectado con un polinucleótido distinto de aquel al cual está conectado en la naturaleza. El término "recombinante" según se utiliza con respecto a una proteína o polipéptido significa un polipéptido producido por la expresión de un polinucleótido recombinante.

Los antígenos proteicos pueden tener homología y/o identidad de secuencia con antígenos de origen natural, tales como cualquiera de los antígenos mencionados en la presente memoria. De un modo similar los polinucleótidos capaces de expresar el antígeno tendrán una secuencia que tenga homología y/o identidad de secuencia con secuencias de origen natural, tales como aquellas que codifican los antígenos mencionados en la presente memoria. Los mecanismos para determinar la "identidad de secuencia" de ácidos nucleicos y aminoácidos son conocidos en la técnica. Típicamente, tales técnicas incluyen la determinación de la secuencia de nucleótidos del ARNm para un gen y/o la determinación de la secuencia de aminoácidos codificada de ese modo, y la comparación de estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos.

En general, "identidad" hace referencia a una correspondencia nucleótido-a-nucleótido o aminoácido-a-aminoácido exacta de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Dos o más secuencias (polinucleótido o aminoácido) se pueden comparar determinando su "porcentaje de identidad". El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, es el número de emparejamientos exactos entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de la secuencias más corta y multiplicado por 100.

Un alineamiento aproximado para secuencias de ácido nucleico es proporcionado por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981). Este algoritmo se puede aplicar a secuencias de aminoácidos utilizando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 supl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., USA, y normalizado por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14 (6): 6745-6763 (1986). Una implementación ilustrativa de este algoritmo para determinar el porcentaje de identidad de una secuencia es proporcionada por el Genetics Computer Group (Madison, WI) en la aplicación de utilidad "BestFit". Los parámetros por defecto para este método se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versión 8 (1995) (asequible de Genetics Computer Grupo, Madison, WI). Un método preferido de establecimiento del porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es la utilización del paquete de programas MPSRCH con derechos de autor para la Universidad de Edinburgh, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de este juego de paquetes se puede emplear el algoritmo de Smith-Waterman donde se utilizan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura del espacio de 12, penalización por extensión del espacio de uno, y un espacio de seis). A partir de los datos generados el valor "Emparejado" refleja una "identidad de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, utilizado con parámetros por defecto. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP pueden ser empleados utilizando los siguientes parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; hebra = ambas; corte = 60; esperanza = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificado por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones GenBank CDS + proteína Swiss + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Alternativamente, la homología se puede determinar mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con una o varias nucleasas específicas de hebras sencillas, y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Dos secuencias de ADN o de polipéptidos

son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias muestran una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80%-85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y muy preferiblemente al menos aproximadamente 95%-98% a lo largo de una longitud definida de las moléculas, determinada utilizando los métodos anteriores.

Según se utiliza en la presente memoria, sustancialmente homólogo también hace referencia a secuencias que muestran una identidad completa con la secuencia de ADN o polipéptido especificada. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden ser identificadas en un experimento de hibridación de Southern, por ejemplo, en condiciones restrictivas, definidas para ese sistema concreto. Por ejemplo, las condiciones de hibridación restrictivas pueden incluir formamida al 50%, 5x Solución de Denhardt, 5x SSC, SDS al 0,1% y 100 pg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado y las condiciones de lavado pueden incluir 2x SSC, SDS al 0,1% a 37°C seguido de 1x SSC, SDS al 0,1% a 68°C. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del conocimiento práctico de la técnica. Véase, p. ej., Sambrook et al., más arriba; DNA Cloning, más arriba; Nucleic Acid Hybridization, más arriba.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" incluye cualquiera de los siguientes: la prevención de infección o reinfección; la reducción o eliminación de síntomas; y la reducción o eliminación completa de un patógeno. El tratamiento se puede llevar a cabo profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección). Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para producir efectos beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. El término "co-administrar" o "co-administración" hace referencia a la administración de al menos dos sustancias. La co-administración se puede lograr mediante la administración de las sustancias concurrentemente o en diferentes momentos. Además, la co-administración incluye la liberación utilizando uno o más métodos de liberación.

La invención se lleva a cabo con el fin de estimular una respuesta inmunitaria adecuada. Por respuesta inmunitaria adecuada, se quiere significar que la invención puede ocasionar en un sujeto una respuesta inmunitaria caracterizada por la producción de linfocitos T específicos para un antígeno, donde la respuesta inmunitaria puede proteger al sujeto frente a una posterior infección con cepas homólogas o heterólogas del patógeno relevante, reducir la carga de patógeno, ocasionar la resolución de una infección en una cantidad de tiempo más corta con respecto a un sujeto no inmunizado, o evitar o reducir la manifestación clínica de los síntomas de una enfermedad.

El sujeto sobre el cual se lleva a cabo la invención es generalmente un sujeto vertebrado. Por "sujeto vertebrado" se quiere significar cualquier miembro del subfilum cordata, particularmente mamíferos, incluyendo, sin limitación, seres humanos y otros primates, así como roedores, tales como ratones y ratas. El término no indica una edad concreta. De este modo, se pretende abarcar tanto individuos adultos como recién nacidos. En una realización el sujeto es susceptible de o se encuentra en riesgo de la enfermedad relevante.

Un polinucleótido que es capaz de expresar un antígeno también se denomina vacuna de ADN (aunque como resulta evidente a partir de la descripción de la presente memoria ésta puede consistir en un polinucleótido distinto de ADN). Las vacunas de ADN consisten generalmente en un plásmido que codifica un antígeno relevante para la síntesis de novo por células presentes en un tejido elegido como diana. Generalmente se utilizan promotores virales, p. ej., el promotor de Citomegalovirus (CMV), en constructos plasmídicos para vacunas de ADN para dirigir la expresión del antígeno. Se ha demostrado que la liberación de estos plásmidos con vacunas de ADN, tanto en forma "desnuda" como anclada a partículas, logra respuestas inmunitarias tanto humorales como mediadas por células. (Véanse, p. ej., Wang et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4156-4160; Tang et al. (1992) Nature 356: 152-154; Fynan, más arriba).

Los polinucleótidos pueden ser introducidos en células in vivo mediante, por ejemplo, transfección o mediante recubrimiento con polinucleótidos de partículas y administración de las partículas recubiertas a las células. Alternativamente, los polinucleótidos pueden ser proporcionados en forma particulada (p. ej., polvo), comentada en detalle más abajo y en la descripción de las Publicaciones Internacionales Números WO 97/48485 y WO 98/10750.

De este modo, la invención logra una respuesta inmunitaria, incluyendo una respuesta de CTL (típicamente una respuesta de células T CD8), en un sujeto vertebrado mediante la administración de un antígeno seleccionado o un polinucleótido que codifica un antígeno seleccionado, donde el antígeno que codifica la secuencia está conectado operablemente a un elemento regulador capaz de ocasionar la expresión de la secuencia codificante.

Antígenos

Los métodos descritos en la presente memoria logran una respuesta inmunitaria frente a una amplia variedad de antígenos para el tratamiento y/o prevención de numerosas afecciones incluyendo, pero no limitadas a, cáncer, alergias, toxicidad e infección por patógenos tales como virus, bacterias, hongos, y otros organismos patogénicos.

Los antígenos virales adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, aquellos obtenidos o derivados de la familia de virus de la hepatitis, incluyendo el virus de la hepatitis A (HAV), el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la hepatitis delta (HDV), el virus de la hepatitis E (HEV) y el virus de la hepatitis G (HGV). Véanse, p. ej., las Publicaciones Internacionales Núms. WO 89/04669; WO 90/11089; y WO 90/14436. El genoma de HCV codifica varias proteínas virales, incluyendo E1 y E2. Véase, p. ej., Houghton et al. (1991) Hepatology 14: 381-388. Las moléculas de ácido nucleico que contienen secuencias que codifican estas proteínas, así como sus fragmentos antigénicos, encontrarán uso en los presentes métodos. De un modo similar, la secuencia codificante para el antígeno 8 de HDV es conocida (véase, p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.378.814).

De una manera similar, se pueden utilizar una amplia variedad de proteínas de la familia de herpesvirus como antígenos en la presente invención, incluyendo proteínas derivadas del virus del herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2, tales como las glicoproteínas gB, gD y gH de HSV-1 y HSV-2; los antígenos del virus varicela zoster (VZV), el virus de Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus (CMV) incluyendo gB y gH de CMV; y antígenos de otros herpes virus humanos tales como HHV6 y HHV7, (Véanse, p. ej. Chee et al. (1990) Cytomegaloviruses (J. K. McDougall, ed., Springer Verlag, págs. 125-169; McGeoch et al. (1988) J. Gen. Virol. 69: 1531-1574; Patente de los Estados Unidos Núm. 5,171,568; Baer et al. (1984) Nature 310: 207-211; y Davison et al. (1986) J. Gen. Virol. 67: 1759-1816). Se conocen y han sido referidos antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tales como las moléculas gp120 para una multitud de productos aislados de VIH-1 y VIH-2, incluyendo miembros de los diferentes subtipos genéticos de VIH (véanse, p. ej., Myers et al., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, Nuevo México (1992); y Modrow et al. (1987) J. Virol. 61: 570-578) y las secuencias de ácido nucleico que contienen antígenos derivadas u obtenidas a partir de cualquiera de estos productos aislados encontrarán uso en la presente invención.

Además, otras proteínas inmunogénicas derivadas u obtenidas de cualquiera de los diferentes productos aislados de HIV encontrarán uso en la presente memoria, incluyendo secuencias que codifican una o más de las diferentes proteínas de la envoltura tales como gap 160 y gp41, antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como proteínas derivadas de las regiones pol, env, tat, vif, rev, nef, vpr, vpu y LTR de VIH.

Los antígenos derivados u obtenidos de otros virus también encontrarán uso en la presente memoria, tales como sin limitación, los antígenos de miembros de las familias Picornaviridae (p. ej., poliovirus, rinovirus, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (p. ej., virus de la rubéola, virus del dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae (p. ej., rotavirus, etc.); Bimaviridae; Rhabdoviridae (p. ej., virus de la rabia, etc.); Orthomyxoviridae (p. ej., virus de influenza tipos A, B y C, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, virus de la parainfluenza, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (p. ej., HTLV-I; HTLV-II; VIH-1 (también como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), incluyendo pero no limitados a antígenos de los productos aislados HIVIIIb, HIVSF2, HTVLAV, HIVLAI, HIVMN; HIV-1CM235, HIV-1 ; HIV-2, entre otros; virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS); Papilomavirus, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas; y similares. Véanse, p. ej. Virology, 3ª Edición (W. K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª Edición (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y otros virus.

En algunos contextos, puede ser preferible que el antígeno seleccionado se obtenga o derive de un patógeno viral que típicamente penetra en el organismo por medio de una superficie mucosa y se sabe que causa o está asociado con una enfermedad humana, tal como, pero no limitada a, VIH (SIDA), virus de influenza (Gripe), virus herpes simplex (infección genital, herpes labiales, ETS), rotavirus (diarrea), virus parainfluenza (infecciones respiratorias), poliovirus (poliomielitis), virus respiratorio sincitial (infecciones respiratorias), virus del sarampión y paperas (sarampión, paperas), virus de rubéola (rubéola), y rinovirus (resfriado común).

Los antígenos bacterianos y parasíticos pueden ser obtenidos o derivados de agentes causales conocidos responsables de enfermedades incluyendo, pero no limitados a, Difteria, Tosferina, Tétanos, Tuberculosis, Pneumonía Bacteriana o Fúngica, Otitis Media, Gonorrea, Cólera, Tifus, Meningitis, Mononucleosis, Peste, Shigelosis o Salmonelosis, Enfermedad del Legionario, Enfermedad de Lyme, Lepra, Malaria, Anquilostomiasis, Oncocercuasis, Esquistosomiasis, Tripanosomiasis, Leishmaniasis, Giardiasis, Amebiasis, Filariasis, Borreliosis, y Triquinosis. Se pueden obtener o derivar antígenos adicionales de patógenos no convencionales tales como los agentes causantes del kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), el scrapie, la enfermedad transmisible del visón, y las enfermedades crónicas debilitantes, o de partículas infecciosas proteináceas tales como priones que están asociados con la enfermedad de las vacas locas.

Los patógenos específicos a partir de los cuales se pueden obtener antígenos incluyen M. tuberculosis, Chlamydia, N. gonorrhoeae, Shigella, Salmonella, Vibrio Cholera, Treponema pallidum, Pseudomonas, Bordetella pertussis, Brucella, Francisella tularensis, Helicobacter pilori, Leptospira interrogans, Legionella pneumophila, Yersinia pestis, Streptococcus (tipos A y B), Pneumococcus, Meningococcus, Hemophilus influenza (tipo b), Toxoplasma gondii, Compilobacteriosis, Moraxella catarrhalis, Donovanosis, y Actinomicosis; patógenos fúngicos incluyendo Candidiasis y Aspergillosis; patógenos parasíticos incluyendo Taenia, Trematodos, Nematodos, Amebiasis, Giardiasis, Cryptosporidium, Schistosoma, Pneumocystis carinii, Tricomoniasis y Triquinosis. De este modo, la presente invención también puede ser utilizada para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada frente a numerosas enfermedades veterinarias, tales como la Fiebre Aftosa, Coronavirus, Pasteurella multocida, Helicobacter, Strongilus vulgaris, Actinobacillus pleuropneumonia, virus de la diarrea viral bovina (BVDV), Klebsiella pneumoniae, E. coli, Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis y bronchiseptica.

Típicamente, se utiliza una secuencia de nucleótido correspondiente a (que codifica) uno o más de los antígenos enumerados antes en la producción de los polinucleótidos, como se describe más abajo.

Aislamiento de Genes y Construcción de Polinucleótidos

Los polinucleótidos de la invención codifican al menos un antígeno (por ejemplo, antígenos derivados de y/o expresados por virus, bacterias, hongos, gusanos, toxinas, alérgenos o células cancerosas) conectados operablemente a un promotor, tal como un promotor viral, no viral, específico de una célula o tejido (p. ej., un promotor derivado de un elemento regulador que controla la transcripción de una secuencia en células de la especie del sujeto que se va a vacunar).

Estos polinucleótidos son útiles para lograr una respuesta inmunitaria al antígeno o los antígenos, particularmente la activación de linfocitos T. Las secuencias de nucleótidos seleccionadas para su uso en la presente invención pueden derivar de fuentes conocidas, por ejemplo, aislando las mismas de células que contienen un gen o secuencia de nucleótidos deseados utilizando técnicas convencionales.

De un modo similar, se pueden generar sintéticamente secuencias de nucleótidos utilizando modos convencionales de síntesis de polinucleótidos que son bien conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Edge et al. (1981) *Nature* 292:756-762; Nambair et al. (1994) *Science* 223:1299-1301; Jay et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 6311-6317. Generalmente, se pueden preparar oligonucleótidos sintéticos mediante el método del fosfotriéster como describen Edge et al., más arriba, y Duckworth et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9: 1691-1706, o el método de la fosforamida como describen Beaucage et al. (1981) *Tet. Letts.* 22:1859, y Matteucci et al. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185. También se pueden preparar oligonucleótidos sintéticos utilizando sintetizadores de oligonucleótidos automatizados asequibles comercialmente. Las secuencias de nucleótidos pueden ser diseñadas de este modo con codones apropiados para una secuencia de aminoácidos concreta.

En general, se seleccionarán los codones preferidos para su expresión en el anfitrión deseado. La secuencia competa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante métodos convencionales y se ensamblan en una secuencia codificante completa. Véanse, p. ej., Edge et al. (más arriba); Nambair et al. (más arriba) y Jay et al. (más arriba). Otro método para obtener secuencias de ácido nucleico para su uso en la presente memoria es mediante medios recombinantes. De este modo, se puede separar mediante corte una secuencia de nucleótidos deseada de un plásmido que la porta utilizando enzimas de restricción y procedimientos convencionales.

La escisión específica del sitio se realiza tratando con la enzima (o enzimas) de restricción adecuada en condiciones que son generalmente conocidas en la técnica, y cuyos detalles son especificados por los fabricantes de las enzimas de restricción asequibles comercialmente. Si se desea, se puede llevar a cabo la separación por tamaños de los fragmentos escindidos por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida o gel de agarosa utilizando técnicas convencionales.

Los fragmentos de restricción escindidos se pueden volver de extremos romos tratando con el fragmento grande de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Klenow) en presencia de los cuatro desoxinucleótido-trifosfatos (dNTP) utilizando técnicas convencionales. El fragmento de Klenow rellena los salientes de hebra sencilla 5' pero digiere las hebras sencillas 3' sobresalientes, incluso aunque estén presentes los cuatro dNTP. Si se desea, se puede realizar una reparación selectiva suministrando solamente uno, o varios, dNTP seleccionados dentro de las limitaciones dictadas por la naturaleza del saliente. Tras el tratamiento con Klenow, se puede extraer la mezcla p. ej. con fenol/cloroformo, y precipitar con etanol.

El tratamiento en las condiciones apropiadas con la nucleasa S1 o BAL-31 da como resultado la hidrólisis de cualquier porción de hebra sencilla.

Otro método conveniente más para aislar moléculas de ácido nucleico específicas es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mullis et al. (1987) *Methods Enzymol.* 155: 335-350. Este mecanismo utiliza la ADN polimerasa, normalmente una ADN polimerasa termoestable, para replicar una región deseada de ADN. La región de ADN que se va a replicar es identificada mediante oligonucleótidos de secuencia especificada complementaria a los extremos opuestos y las hebras opuestas del ADN deseado para cebar la reacción de replicación. El producto de la primera ronda de replicación es a su vez un molde para la siguiente replicación, de este modo ciclos sucesivos repetidos de replicación dan como resultado una amplificación geométrica del fragmento de ADN delimitado por el par de cebadores utilizado. Este método también permite una fácil adición de secuencias de nucleótidos a los extremos del producto de ADN incorporando estas secuencias añadidas sobre los cebadores oligonucleotídicos (véase, p. ej., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis et al (eds) Harcourt Brace Jovanovich Publishers, NY (1994)). Las condiciones de PCR utilizadas para cada reacción de amplificación se determinan empíricamente. Numerosos parámetros influyen en el éxito de la reacción. Entre ellos están la temperatura y el tiempo de recocido, el tiempo de extensión, la concentración de Mg²⁺ y ATP, el pH, y la concentración relativa de cebadores, moldes, y desoxirribonucleótidos.

Una vez que han sido preparadas o aisladas las secuencias codificantes para las proteínas deseadas, tales secuencias pueden ser clonadas en cualquier vector o replicón adecuado. Numerosos vectores de clonación son conocidos por los expertos en la técnica, y la selección de un vector de clonación apropiado es una cuestión de elección. Las ligaciones con otras secuencias se realizan utilizando procedimientos convencionales, conocidos en la técnica.

Como se describe con detalle más abajo, las secuencias de nucleótidos seleccionadas pueden ser colocadas bajo el control de secuencias reguladoras tales como un promotor, de manera que la secuencia que codifica la proteína deseada es transcrita a ARN en el tejido anfitrión transformado por un vector que contiene este constructo de expresión.

Promotores

La expresión de un antígeno seleccionado en un polinucleótido utilizado en la invención es dirigida por un promotor, tal como un promotor específico de una célula (o tejido) viral, no viral, preferiblemente de mamífero. En una realización preferida, además de promotores, puede ser deseable añadir otras secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión de secuencias de proteína codificadas por las secuencias de nucleótidos liberadas. Los expertos en la técnica conocen secuencias reguladoras adicionales adecuadas, y los ejemplos incluyen aquellas que

hacen que la expresión de una secuencia codificante se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Otros tipos de elementos reguladores pueden estar presentes también en el vector, por ejemplo, secuencias intensificadoras.

Se construye un vector de expresión de manera que la secuencia codificante concreta esté localizada en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas de manera que la situación y la orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias de control permitan que la secuencia codificante sea transcrita bajo el "control" de las secuencias de control (esto es, la ARN polimerasa, que se une a la molécula de ADN en las secuencias de control, transcribe la secuencia codificante). La modificación de las secuencias que codifican esta proteína concreta de interés puede ser deseable para lograr este fin. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de manera que ésta sea anclada a las secuencias de control con la orientación apropiada; esto es, para mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden ser ligadas a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector.

Alternativamente, la secuencia codificante puede ser clonada directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

Generalmente, las moléculas de ácido nucleico utilizadas en los métodos sujeto contienen regiones codificantes con secuencias de control adecuadas y, opcionalmente, secuencias de nucleótidos auxiliares que codifican citoquinas u otros polipéptidos intensificadores de la inmunidad. Las moléculas de ácido nucleico se preparan generalmente en forma de vectores que incluyen los elementos necesarios para dirigir la transcripción y la traducción en una célula receptora.

Coadyuvantes

Con el fin de aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria pueden incluir adicionalmente sustancias auxiliares/coadyuvantes así como los compuestos de la invención, tales como agentes farmacológicos, citoquinas, o similares. Los coadyuvantes adecuados incluyen cualquier sustancia que intensifique la respuesta inmunitaria del sujeto al antígeno (incluyendo cuando es liberado por el polinucleótido de la invención). Pueden intensificar la respuesta inmunitaria afectando a numerosas rutas, por ejemplo, estabilizando el complejo antígeno/MHC, haciendo que se encuentre presente sobre la superficie celular más complejo antígeno/MHC, intensificando la maduración de las APC, o prolongando la vida de las APC (p. ej., inhibiendo la apoptosis). Como se ha descrito en la presente memoria, estas citoquinas, liberadas en forma de péptidos o de polinucleótidos que codifican los péptidos funcionales, también son útiles para lograr respuestas inmunitarias.

Se pueden co-administrar secuencias de ácido nucleico auxiliares que codifican péptidos conocidos para estimular, modificar, o modular la respuesta inmunitaria de un anfitrión (p. ej., citoquinas), en forma de polinucleótidos con los polinucleótidos que codifican antígenos o los antígenos peptídicos descritos más arriba. Estos nucleótidos se pueden administrar en el mismo vector que porta la secuencia codificante del antígeno, o, alternativamente en un vector separado. En algunos casos, puede ser deseable diseñar un polinucleótido en el que tanto la secuencia codificante del antígeno como la secuencia codificante del coadyuvante estén bajo el control del mismo promotor.

Administración de Polinucleótidos y Coadyuvantes

Los polinucleótidos, coadyuvantes y sustancias auxiliares (incluyendo el compuesto de la invención) descritos en la presente memoria pueden ser administrados mediante cualquier método adecuado (aunque el compuesto de la invención se administre tópicamente o transdérmicamente). En una realización preferida, descrita más abajo, se administran aplicándolos como recubrimiento sobre partículas y después administrando las partículas al sujeto o las células. No obstante, también pueden ser liberados utilizando un vector viral como los conocidos en la técnica, o utilizando sistemas no virales, como se describe por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.589.466.

Vectores Virales

Se han utilizado numerosos sistemas basados en virus para la liberación de genes. Por ejemplo, se conocen sistemas retrovirales y generalmente emplean líneas de empaquetamiento que tienen un provirus defectuoso integrado (el "colaborador") que expresa todos los genes del virus, conocidos como largas repeticiones terminales (LTR). El gen de interés puede ser insertado en el vector y empaquetado en las cubiertas virales sintetizadas por el colaborador retroviral. El virus recombinante puede ser aislado después y liberado al sujeto. (Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.219.740). Los vectores retrovirales representativos incluyen pero no están limitados a vectores tales como los vectores LHL, N2, LNSAL, LSHL y LHL2 descritos p. ej., en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.219.740 así como los derivados de estos vectores, tales como el vector N2 modificado descrito en la presente memoria. Los vectores retrovirales pueden ser contruidos utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.219.740; Mann et al. (1983) Cell 33: 153-159.

Se han desarrollado sistemas basados en adenovirus para la liberación de genes y son adecuados para liberar los polinucleótidos descritos en la presente memoria. Los adenovirus humanos son virus con ADN de doble hebra que se introducen en las células por medio de endocitosis mediada por receptores. Estos virus están particularmente bien adaptados para la transferencia de genes porque son fáciles de desarrollar y manipular y muestran una amplia gama de anfitriones *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, los adenovirus pueden infectar células humanas de origen hematopoyético, linfóide y mielóide. Además, los adenovirus infectan células diana quiescentes así como replicantes. A diferencia de los retrovirus que se integran en el genoma del anfitrión, los adenovirus persisten extracromosómicamente minimizando de

este modo los riesgos asociados con la mutagénesis insercional. El virus es producido fácilmente a títulos elevados y es estable de manera que puede ser purificado y almacenado. Incluso en la forma de replicación competente, los adenovirus ocasionan solamente un bajo nivel de morbilidad y no están asociados con malignidades humanas. Por lo tanto, se han desarrollado vectores de adenovirus que hacen uso de estas ventajas. Para una descripción de los vectores de adenovirus y sus usos véanse, p. ej., Haj-Ahmad y Graham (1986) J. Virol. 57: 267-274; Bett et al. (1993) J. Virol. 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) Human Gene Therapy 5:717-729; Seth et al. (1994) J. Virol. 68:933-940; Barr et al. (1994) Gene Therapy 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) BioTechniques 6: 616-629; Rich et al. (1993) Human Gene Therapy 4: 461-476,

También se pueden utilizar vectores virales adeno-asociados (AAV) para administrar los polinucleótidos descritos en la presente memoria. Los vectores AAV pueden ser obtenidos de cualquier serotipo de AAV, incluyendo sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV5, AAVX7, etc. Los vectores de AAV pueden tener uno o más de los genes de AAV de tipo salvaje suprimidos en su totalidad o en parte, preferiblemente los genes rep y/o cap, pero conservan una o más secuencias terminales invertidas (ITR) colindantes. Las secuencias ITR funcionales son necesarias para el rescate, replicación y empaquetamiento del virión de AAV. De este modo, un vector de AAV incluye al menos aquellas secuencias requeridas en cis para la replicación y empaquetamiento (p. ej., ITR funcionales) del virus. No es necesario que la secuencia ITR sea la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje, y puede ser alterada, p. ej., mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos, con tal que la secuencia proporcione un rescate, replicación y empaquetamiento funcionales.

Los vectores de expresión de AAV se construyen utilizando técnicas conocidas para proporcionar al menos como componentes conectados operativamente en la dirección de la transcripción, elementos de control incluyendo una región de inicio de la transcripción, el ADN de interés y una región de terminación de la transcripción. Los elementos de control se seleccionan para que sean funcionales en una célula de mamífero. El constructo resultante que contiene los componentes conectados operativamente está unido (5' y 3') con secuencias ITR de AAV funcionales. Los constructos de AAV adecuados pueden ser diseñados utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.173.414 y 5.139.941; las Publicaciones Internacionales Núms. WO 92/01070 (publicada el 23 de Enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de Marzo de 1993); Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3: 533539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158: 97-129; Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Shelling y Smith (1994) Gene Therapy 1: 165-169; y Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179: 18671875,

Preparaciones Farmacéuticas

La formulación de una preparación que comprende los polinucleótidos, con o sin adición de una composición coadyuvante, o la formulación del compuesto se pueden llevar a cabo utilizando químicas y metodologías de formulación farmacéutica convencionales, todas las cuales son fácilmente asequibles por los expertos en la técnica. Cuando sea apropiado, el compuesto también se puede formular y administrar como se describe más abajo.

Por ejemplo, las composiciones que contienen una o más moléculas de ácido nucleico (p. ej., presentes en un plásmido o vector viral) se pueden combinar con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para proporcionar una preparación líquida.

Pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH y similares, en el excipiente o vehículo. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares son generalmente agentes farmacéuticos que no inducen una respuesta inmunitaria en el individuo que recibe la composición, y que pueden ser administrados sin toxicidad indebida.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol.

También se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácido minerales tales como hidroclozuros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos, y similares; y sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. También se prefiere, aunque no se necesita, que la preparación contenga un excipiente farmacéuticamente aceptable que sirva como estabilizador, particularmente para péptidos, proteínas u otras moléculas similares si se van a incluir en la composición de vacuna. Los ejemplos de los portadores adecuados que también actúan como estabilizadores para péptidos incluyen, sin limitación, calidades farmacéuticas de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano, y similares.

Otros portadores adecuados incluyen, de nuevo sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles (PEG) de elevado peso molecular, y sus combinaciones. Un estudio completo de los excipientes, vehículos y sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables se encuentra disponible en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991).

También se pueden incluir ciertos facilitadores de la absorción y/o expresión de ácido nucleico ("agentes facilitadores de la transfección"), p. ej., en composiciones de vectores no virales, por ejemplo, facilitadores tales como bupivacaína, cardiotoxina y sacarosa, y vehículos para facilitar la transfección tales como preparaciones liposomales o lipídicas que se utilizan rutinariamente para liberar moléculas de ácido nucleico. Los liposomas aniónicos y neutros son ampliamente asequibles y bien conocidos para la liberación de moléculas de ácido nucleico (véase, p. ej., Liposomes: A Practical Approach, (1990) RPC New Ed., IRL Press).

Las preparaciones de lípidos catiónicos también son vehículos bien conocidos para su uso en la liberación de moléculas de ácido nucleico. Las preparaciones de lípidos adecuadas incluyen DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio), asequible bajo el nombre comercial Lipofectina, y DOTAP (1,2-bis (oleiloxy)-3(trimetilamonio)propano), véanse, p. ej., Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7416; Malone et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6077-6081; Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.283.185 y 5.527.928, y Publicaciones Internacionales Núms. WO 90/11092, WO 91/15501 y WO 95/26356. Estos lípidos catiónicos se pueden utilizar preferiblemente con un lípido neutro, por ejemplo DOPE (dioleil- fosfatidiletanolamina). Otras composiciones que facilitan la transfección adicionales que se pueden añadir a las preparaciones de lípidos o liposomas anteriores incluyen derivados de espermina (véase, p. ej., la Publicación Internacional Núm. WO 93/18759) y los compuestos impermeabilizantes de membrana tales como GALA, Gramicidina S y sales biliares catiónicas (véase, p. ej., la Publicación Internacional Núm. WO 93/19768).

Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico pueden ser encapsuladas, adsorbidas, o asociadas con portadores particulados. Los portadores particulados adecuados incluyen aquellos derivados de polímeros de poli(metacrilato de metilo), así como micropartículas PLG derivadas de poli(lactida) y poli (lactida-co-glicólido). Véase, p. ej., Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10:362368. También se pueden utilizar otros sistemas particulados y polímeros, por ejemplo, polímeros tales como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, así como productos conjugados de estas moléculas.

Las composiciones de vacuna formuladas incluirán de este modo típicamente un polinucleótido (p. ej., un plásmido) que contiene una secuencia que codifica un antígeno de interés en una cantidad suficiente para montar una respuesta inmunológica. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz apropiada. Semejante cantidad estará dentro de un intervalo relativamente amplio que puede ser determinado por medio de pruebas rutinarias. En el caso de antígenos se pueden utilizar de 10 µg a 1 g, por ejemplo de 100 µg a 0,1 g. Se han obtenido respuestas inmunitarias utilizando tan poco como 1 pg de ADN, mientras en otras administraciones, se han utilizado hasta 2 mg de ADN. Generalmente se espera que una dosis eficaz de polinucleótidos que contienen los fragmentos genómicos esté dentro de un intervalo de aproximadamente 10 pg a 1000 µg. No obstante, también pueden ser eficaces dosis por encima y por debajo de este intervalo. Las composiciones pueden contener de este modo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 99,9% del polinucleótido o compuesto. En el caso del compuesto, se administra típicamente de 1 µg a 10 g, preferiblemente de 0,1 mg a 50 mg, y muy preferiblemente de 1 mg a 5 mg.

Administración de Preparaciones Farmacéuticas

Típicamente, el compuesto (generalmente en las cantidades mencionadas antes) se aplica (tópicamente o transdérmicamente) a una zona que tiene un diámetro de 1 a 6 cm, preferiblemente de 2 a 4 cm.

El compuesto se aplica generalmente en el sitio en el que se administra el polinucleótido (o cerca de allí, por ejemplo a 2 cm de ese sitio). En otra realización el compuesto se aplica a un sitio que está inmunológicamente relacionado con el sitio en el que se administra el polinucleótido, por ejemplo en un nódulo linfático que drena del sitio en el que se administra el polinucleótido.

La administración de las preparaciones farmacéuticas descritas antes (que contienen el polinucleótido) se puede efectuar en una o más dosis (típicamente 2, 3, 4 o más dosis). El compuesto se administrará de 12 a 36 horas después de al menos una de las administraciones de polinucleótido, por ejemplo después de al menos cada una de 2, 3, 4 o más administraciones de polinucleótido.

La liberación puede ser por medio de una aguja y una jeringa convencionales para las composiciones líquidas y para las suspensiones líquidas que contienen composiciones particuladas. Además, se conocen en la técnica diferentes inyectores de chorro líquido y se pueden emplear para administrar las presentes composiciones. Los métodos para determinar los medios y dosis de administración más eficaces son bien conocidos en la técnica y variarán con el vehículo de liberación, la composición de la terapia, las células diana, y el sujeto que se esté tratando. Se pueden llevar a cabo administraciones individuales o múltiples seleccionando el médico adscrito el nivel y el patrón de dosificación. Se debe entender que un constructo vector de polinucleótido puede portar más de una secuencia antigénica.

Alternativamente, también se pueden liberar en un sujeto vectores separados (p. ej., plásmidos o vectores virales), que contienen cada uno secuencias que expresan uno o más antígenos como se describe en la presente memoria.

Además, los polinucleótidos pueden ser combinados con otras composiciones y terapias adecuadas. Por ejemplo, con el fin de aumentar una respuesta inmunitaria en un sujeto, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria pueden incluir adicionalmente sustancias auxiliares (p. ej., coadyuvantes), tales como agentes farmacológicos, citoquinas, o similares. Las sustancias auxiliares pueden ser administradas, por ejemplo, en forma de proteínas u otras macromoléculas al mismo tiempo, antes, o después, de la administración de los polinucleótidos descritos en la presente memoria. Las composiciones de moléculas de ácido nucleico también pueden ser administradas directamente al sujeto o, alternativamente, liberadas ex vivo, en células derivadas del sujeto, utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Partículas Recubiertas

En una realización, los polinucleótidos (p. ej., vacunas de ADN), coadyuvantes, y/o compuestos son liberados utilizando partículas portadoras (por ejemplo, portadores núcleo). Los métodos mediados por partículas para liberar

tales preparaciones son conocidos en la técnica. De este modo, una vez preparadas y purificadas adecuadamente, las sustancias descritas antes pueden ser aplicadas como recubrimiento sobre partículas portadoras (p. ej., portadores núcleo) utilizando una variedad de mecanismos conocidos en la técnica. Las partículas portadoras se seleccionan entre materiales que tienen una densidad adecuada en el intervalo de tamaños de partícula utilizados típicamente para la liberación intracelular a partir de un dispositivo de liberación mediado por partículas apropiado. El tamaño óptimo de la partícula portadora dependerá, por supuesto, del diámetro de las células diana. Alternativamente, se pueden utilizar partículas de oro coloidal donde el oro coloidal recubierto es administrado (p. ej., inyectado) en el tejido (p. ej., piel o músculo) y con posterioridad absorbido por células inmuno-competentes.

Para los fines de la invención, se pueden utilizar partículas portadoras de tungsteno, oro, platino e iridio. Se prefieren las partículas de tungsteno y oro. Las partículas de tungsteno son fácilmente asequibles con tamaños medios de 0,5 a 2,0, μm de diámetro. Aunque tales partículas tienen una densidad óptima para su uso en métodos de liberación por aceleración de partículas, y permiten un revestimiento altamente eficaz con ADN, el tungsteno puede ser potencialmente tóxico para ciertos tipos de células. Las partículas de oro o el oro microcristalino (p. ej., polvo de oro A1570, asequible de Engelhard Corp., East Newark, NJ) también encontrará uso en los presentes métodos. Las partículas de oro proporcionan uniformidad en el tamaño (asequibles de Alpha Chemicals con tamaños de partícula de 1-3, μm , o asequibles de Degussa, South Plainfield, NJ con tamaños de partícula en un intervalo que incluye 0,95 μm) y una toxicidad reducida.

Se han descrito y se conocen numerosos métodos para recubrir o precipitar partículas de oro o tungsteno con ADN o ARN. Muchos de tales métodos combinan generalmente una cantidad predeterminada de oro o tungsteno con ADN plasmídico, CaCl_2 y espermidina. La solución resultante se somete a vórtice continuamente durante el procedimiento de revestimiento para asegurar la uniformidad de la mezcla de reacción. Tras la precipitación del ácido nucleico, se pueden transferir las partículas recubiertas a membranas adecuadas y dejar que se sequen antes de su uso, aplicar como recubrimiento sobre las superficies de un módulo o casete para muestras, o cargar en una casete de liberación para su uso en un aparato para la liberación de partículas adecuado.

También se pueden aplicar como recubrimiento coadyuvantes peptídicos (p. ej., citoquinas) y antígenos, sobre partículas portadoras adecuadas, p. ej., oro o tungsteno. Por ejemplo, se pueden anclar péptidos a la partícula portadora simplemente mezclando los dos componentes en una proporción determinada empíricamente, mediante precipitación con sulfato de amonio, u otros métodos de precipitación con disolventes familiares para los expertos en la técnica, o mediante acoplamiento químico del péptido a la partícula portadora. El acoplamiento de residuos de L-cisteína con oro ha sido descrito previamente (Brown et al., Chemical Society Reviews 9: 271- 311 (1980)). Otros métodos incluyen, por ejemplo, disolución del antígeno peptídico en etanol absoluto, agua, o una mezcla de alcohol/agua, adición de la solución a una cantidad de partículas portadoras, y después secado de la mezcla en una corriente de aire o gas nitrógeno mientras se somete a vórtice. Alternativamente, los antígenos peptídicos se pueden secar sobre partículas portadoras mediante centrifugación a vacío. Una vez secadas, las partículas recubiertas pueden ser resuspendidas en un disolvente adecuado (p. ej., acetato de etilo o acetona), y trituradas (p. ej., mediante sonicación) para proporcionar una suspensión sustancialmente uniforme.

Administración de Partículas Recubiertas

Después de su formación, las partículas portadoras recubiertas con preparaciones de ácido nucleico, o preparaciones de coadyuvante de péptido o proteína, o el compuesto de la invención son liberadas en un sujeto, por ejemplo transdérmicamente, utilizando técnicas de liberación mediadas por partículas. Se conocen en la técnica diferentes dispositivos de liberación de partículas adecuados para los mecanismos de liberación mediados por partículas, y todos son idóneos para su uso en la práctica de la invención. Los diseños de dispositivos actuales emplean una descarga explosiva, eléctrica o gaseosa para propeler las partículas portadoras de núcleo recubierto hacia las células diana. Las propias partículas recubiertas pueden ser ancladas de manera liberable a una lámina portadora móvil, o ancladas de forma retirable a una superficie al paso de corrientes de gas, levantando las partículas de la superficie y acelerándolas hacia la diana. Un ejemplo de un dispositivo de descarga gaseosa se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.204.253. Un dispositivo de tipo explosivo se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.945.050. Un ejemplo de un aparato para la aceleración de partículas de tipo descarga eléctrica se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.120.657. Otro aparato de descarga eléctrica adecuado para su uso en la presente memoria se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.149.655.

Las partículas recubiertas se administran al sujeto que se va a tratar de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que sea eficaz para ocasionar la respuesta inmunitaria deseada. La cantidad de la composición que se va a liberar que, en el caso de las moléculas de ácido nucleico está generalmente en el intervalo de 0,001 a 100,0 μg , más típicamente de 0,01 a 10,0 μg de molécula de ácido nucleico por dosis, y en el caso de las moléculas de péptido o proteína antigénicas o compuesto de la invención es de 1 μg a 5 mg, más típicamente de 1 a 50 μg de péptido, depende del sujeto que se vaya a tratar. La cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y el estado general del individuo que se esté inmunizando y de la secuencia de nucleótidos o péptido concreta seleccionada, así como de otros factores. Una cantidad eficaz apropiada puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica tras la lectura de la presente memoria.

De este modo, una cantidad eficaz de los ácidos nucleicos o del compuesto será suficiente para ocasionar una respuesta inmunitaria adecuada en un sujeto inmunizado, y estará en un intervalo relativamente amplio que puede ser determinado por medio de pruebas rutinarias. Preferiblemente, las partículas recubiertas se liberan en las células

receptoras adecuadas con el fin de ocasionar una respuesta inmunitaria (p. ej., activación de células T) en el sujeto tratado.

Composiciones Particuladas

Alternativamente, el polinucleótido, coadyuvante o compuesto puede ser formulado en forma de una composición particulada. Esto se puede llevar a cabo utilizando químicas y metodologías de formulación farmacéutica convencionales todas las cuales son fácilmente asequibles para los expertos con un conocimiento práctico de la técnica razonable.

La composición particulada comprenderá un excipiente o vehículo aceptable. En el excipiente o vehículo pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares son generalmente agentes farmacéuticos que no inducen por sí mismos una respuesta inmunitaria en el individuo que recibe la composición, y que pueden ser administrados sin la toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. Se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos, y similares; y sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares.

Los ejemplos de portadores adecuados que también actúan como estabilizadores para los péptidos incluyen, sin limitación, las calidades farmacéuticas de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano, y similares. Otros portadores adecuados incluyen, de nuevo sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles (PEG) de elevado peso molecular, y sus combinaciones. Se encuentra disponible un estudio detallado de los excipientes, portadores, estabilizadores y otras sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991).

Las composiciones formuladas incluirán una cantidad del polinucleótido o compuesto que sea suficiente para montar una respuesta inmunológica, como se ha definido antes. La cantidad eficaz apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Semejante cantidad estará dentro de un intervalo relativamente amplio, generalmente en un intervalo de aproximadamente 0,1 µg a 25 mg o más, las cantidades adecuadas específicas pueden ser determinadas por medio de pruebas rutinarias. Si se incluye un coadyuvante en la composición, o se utilizan los métodos para proporcionar una composición coadyuvante particulada, el coadyuvante estará presente en una cantidad adecuada como se ha descrito antes. Las composiciones se preparan después en forma de partículas utilizando técnicas convencionales, por ejemplo mediante simple evaporación (secado al aire), secado a vacío, secado por pulverización, secado mediante deshidratación por congelación (liofilización), secado por pulverización-secado mediante deshidratación por congelación, recubrimiento por pulverización, precipitación, formación de partículas fluidas supercríticas, y similares. Si se desea, se pueden densificar las partículas resultantes utilizando las técnicas descritas en la Publicación Internacional del mismo propietario Núm. WO 97/48485.

Estos métodos pueden ser utilizados para obtener partículas de polinucleótido que tienen un tamaño que oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 µm, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 µm, y muy preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 µm; y una densidad de partícula que oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 g/cm³, y una densidad en masa de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 g/cm³, o mayor.

De un modo similar, se pueden obtener partículas de coadyuvante o compuestos que tienen un tamaño que oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 µm, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 150 µm, y muy preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 µm; una densidad de partícula que oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 g/cm³, y una densidad en masa de preferiblemente aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 g/cm³, y muy preferiblemente de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,5 g/cm³.

Administración de Composiciones Particuladas

Después de la formación, se puede liberar la composición particulada (p. ej., polvo) transdérmicamente en tejido de vertebrado utilizando un mecanismo de liberación transdérmica de partículas adecuado. Se conocen en la técnica diferentes dispositivos de liberación de partículas adecuados para la administración de la sustancia de interés, y encontrarán uso en la práctica de la invención. Un sistema de liberación transdérmica de partículas particularmente preferido emplea una jeringa sin aguja para disparar partículas sólidas en una dosis controlada en y a través de la piel y los tejidos. Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.630.796 de Bellhouse et al. que describe una jeringa sin aguja (también conocido como "dispositivo de liberación de partículas PowderJect"). Se conocen en la técnica otras configuraciones de jeringas sin aguja y se describen en la presente memoria.

Las composiciones particuladas se pueden administrar después utilizando un mecanismo de liberación transdérmica. Preferiblemente, las composiciones particuladas serán liberadas por medio del método de inyección de polvo, p. ej., liberado desde una jeringa sin aguja tal como el descrito en las Publicaciones internacionales del mismo propietario Núms. WO 94/24263, WO 96/04947, WO 96/12513, y WO 96/20022. La liberación de partículas desde tales dispositivos de liberación de partículas se pone en práctica con partículas que tienen un tamaño aproximado de que oscila generalmente de 0,1 a 250 µm, preferiblemente que oscila de aproximadamente 10-70 µm. Las partículas mayores de aproximadamente 250 µm también pueden ser liberadas desde los dispositivos, siendo la máxima limitación

el punto en el cual el tamaño de las partículas podría causar un perjuicio no deseado para las células de la piel. La distancia real que alcanzarán las partículas liberadas al penetrar en la superficie diana depende del tamaño de partícula (p. ej., el diámetro de partícula nominal que supone una geometría de la partícula más o menos esférica), de la densidad de la partícula, de la velocidad inicial a la cual impacta la partícula en la superficie, y la densidad y la viscosidad cinemática del tejido cutáneo elegido como diana. Con respecto a esto, las densidades óptimas de partícula para su uso en inyecciones sin aguja oscilan generalmente entre aproximadamente 0,1 y 25 g/cm³, preferiblemente entre aproximadamente 0,9 y 1,5 g/cm³, y las velocidades de inyección oscilan generalmente entre aproximadamente 100 y 3.000 m/seg, o mayor. Con una presión de gas apropiada, las partículas que tienen un diámetro medio de de 10-70 µm pueden ser aceleradas a través de la boquilla a velocidades que se aproximan a velocidades supersónicas de un flujo de conducción de gas.

Si se desea, estos dispositivos de liberación de partículas (p. ej., una jeringa sin aguja) pueden ser proporcionados en un estado pre-cargado que contiene una dosificación adecuada de las partículas que comprenden el antígeno de interés y/o el coadyuvante seleccionado. La jeringa cargada puede estar empaquetada en un recipiente sellado herméticamente, que puede estar etiquetado adicionalmente como se ha descrito antes.

Las composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de las moléculas en polvo descritas en la presente memoria pueden ser liberadas en cualquier tejido diana adecuado por medio de los dispositivos de liberación de partículas descritos antes. Por ejemplo, las composiciones pueden ser liberadas en el músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, cartílago óseo, páncreas, riñón, vejiga biliar, estómago, intestino, testículo, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándulas o tejidos conectivos. Para las moléculas de ácido nucleico, la liberación es preferiblemente en, y las moléculas son expresadas en, células diferenciadas terminalmente; sin embargo, las moléculas también pueden ser liberadas en células no diferenciadas, o células parcialmente diferenciadas tales como células pluripotenciales de la sangre y fibroblastos de la piel.

Las composiciones en polvo se administran al sujeto que va a ser tratado de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que sea profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz. La cantidad de la composición que va a ser liberada, generalmente en el intervalo de 0,5 µg/kg a 100 µg/kg de molécula de ácido nucleico por dosis, depende del sujeto que vaya a ser tratado.

Las dosis pueden ser tan bajas como 0,5 µg por 50 kg de sujeto, o aproximadamente 0,01 µg/kg. Las dosis para otros fármacos, tales los péptidos y las proteínas fisiológicamente activos, generalmente oscilan de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 20 mg, preferiblemente de 10 µg a aproximadamente 3 mg. La cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y el estado general del individuo a tratar, de la gravedad de la afección que esté siendo tratada, de la preparación concreta liberada, del sitio de administración, así como de otros factores. Una cantidad eficaz apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica.

De este modo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de las presentes composiciones particuladas será suficiente para proporcionar un tratamiento o prevención de los síntomas de una enfermedad o afección, y estará dentro de un intervalo relativamente amplio que puede ser determinado por medio de pruebas rutinarias.

Formulaciones preferidas para la liberación del compuesto

El compuesto se administra en forma de una formulación farmacéutica que es adecuada para la liberación tópica o transdérmica de fármacos. La formulación comprenderá una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto y generalmente también un vehículo farmacéuticamente aceptable. Típicamente, en la formulación, el compuesto está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 a 20 por ciento, preferiblemente de 0,5 por ciento a aproximadamente 10 por ciento, en peso basándose en el peso total de dicha formulación. En una realización preferida la formulación contiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 por ciento en peso del compuesto, por ejemplo aproximadamente 5 por ciento.

Típicamente la formulación está en forma de crema, pomada o recubrimiento adherente (tal como un recubrimiento adherente sensible a la presión o material laminar recubierto adherente). La formulación puede comprender adicionalmente sustancias que intensifican la penetración a través de la piel de los fármacos.

La formulación es preferiblemente esencialmente no irritante. Semejante formulación no ocasionará una irritación de la piel inaceptable en ensayos de irritación de la piel repetidos convencionales en conejos albinos tales como los descritos por Draize et al., "Appraisal of the Safety of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics", preparado por la División de Farmacología de la administración para Alimentos y Fármacos, publicado originalmente en 1959 por la Asociación de Alimentos y Fármacos Oficiales de los Estados Unidos, Topeka, Kans. (2ª impresión 1965).

Se incorpora un ácido graso tal como el ácido isoesteárico, el ácido oleico o una de sus mezclas a una formulación de la invención. La cantidad total de ácido graso presente en una formulación es preferiblemente de aproximadamente 3 por ciento a aproximadamente 45 por ciento, preferiblemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 25 por ciento en peso basándose en el peso total de la formulación.

La formulación es preferiblemente una crema que contiene el compuesto de acuerdo con la invención y opcionalmente también un ácido graso. La crema comprende generalmente una fase oleosa y una fase acuosa mezcladas.

Opcionalmente, la formulación (en particular cuando es una crema o pomada) puede contener uno o más emolientes, emulsionantes, espesantes y/o conservantes.

- Los emolientes son típicamente alcoholes de cadena larga, tales como alcohol cetílico, alcohol estearílico y alcohol cetearílico; hidrocarburos tales como petrolato y aceite mineral ligero; o lanolina acetilada. La cantidad total de emoliente en la formulación es preferiblemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 30 por ciento, y más preferiblemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 10 por ciento en peso basándose en el peso total de la formulación. El emulsionante es típicamente un agente tensioactivo no iónico, por ejemplo, polisorbato 60 (asequible de ICI Americas), monoestearato de sorbitán, poli(4-oleato de glicerilo), y éter polioxietilen(4)laurílico o catiónico trivalente. Generalmente la cantidad total de emulsionante es preferiblemente de aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 14 por ciento, y más preferiblemente de aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 6 por ciento en peso basándose en el peso total de la formulación.
- Se pueden utilizar espesantes farmacéuticamente aceptables, tales como Veegum® K (asequible de R. T. Vanderbilt Company, Inc.), alcoholes de cadena larga (es decir, alcohol cetílico, alcohol estearílico o alcohol cetearílico). La cantidad total de espesante presente es preferiblemente de aproximadamente 3 por ciento a aproximadamente 12 por ciento en peso basándose en el peso total de la formulación.
- Pueden estar presentes en la formulación conservantes tales como metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico. La cantidad apropiada de tales conservantes es conocida por los expertos en la técnica.
- Opcionalmente, se puede incluir en la formulación un agente solubilizante adicional tal como alcohol bencílico, ácido láctico, ácido acético, ácido esteárico o ácido clorhídrico. Si se utiliza un agente solubilizante adicional, la cantidad presente es preferiblemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 12 por ciento en peso basándose en el peso total de la crema.
- Opcionalmente, la formulación puede contener un humectante tal como glicerina y potenciadores de la penetración en la piel tales como estearato de butilo.
- Es sabido por los expertos en la técnica que un único ingrediente puede realizar más de una función en una crema, es decir, el alcohol cetílico puede servir tanto de emoliente como de espesante.
- Generalmente, una crema consiste en una fase oleosa y una fase acuosa mezcladas entre sí para formar una emulsión. Preferiblemente, la cantidad de agua presente en una crema de la invención es de aproximadamente 45 por ciento a aproximadamente 85 por ciento en peso basándose en el peso total de la crema.
- Cuando la formulación es una pomada se puede utilizar una base para pomadas farmacéuticamente aceptable tal como petrolato o polietilenglicol 400 (asequible de Union Carbide) combinado con polietilenglicol 3350 (asequible de Union Carbide). La cantidad de base para pomada presente en una pomada de la invención es preferiblemente de aproximadamente 60 por ciento a aproximadamente 95 por ciento en peso basándose en el peso total de la pomada.
- En una realización preferida la formulación es una crema que comprende una base para crema de aceite en agua que comprende ácido isoesteárico, alcohol cetílico, alcohol estearílico, petrolato blanco, polisorbato 60, monoestearato de sorbitán, glicerina, goma xantana, agua purificada, alcohol bencílico, metilparabeno y propilparabeno. Semejante crema puede estar en forma de crema Aldara de imiquimod que contiene imiquimod al 5%.
- En otra realización preferida la formulación comprende aproximadamente 1 por ciento de compuesto de la invención, aproximadamente 10 por ciento de dicho ácido isoesteárico, aproximadamente 2 por ciento de alcohol bencílico, aproximadamente 2,2 por ciento de alcohol cetílico, aproximadamente 3,1 por ciento alcohol estearílico, aproximadamente 2,55 por ciento de polisorbato 60, aproximadamente 0,45 por ciento de monoestearato de sorbitán, aproximadamente 2 por ciento de glicerina, aproximadamente 0,2 por ciento de metilparabeno, aproximadamente 0,02 por ciento de propilparabeno y aproximadamente 76,48 por ciento de agua purificada, basándose todos los porcentajes en el peso total de dicha formulación.
- En otra realización la formulación comprende aproximadamente 1 por ciento del compuesto de la invención, aproximadamente 10 por ciento de dicho ácido isoesteárico, aproximadamente 6 por ciento de alcohol cetearílico, aproximadamente 2,55 por ciento de polisorbato 60, aproximadamente 0,45 por ciento de monoestearato de sorbitán, aproximadamente 2 por ciento de glicerina, aproximadamente 0,2 por ciento de metilparabeno, aproximadamente 0,02 por ciento de propilparabeno y aproximadamente 77,78 por ciento de agua purificada, basándose todos los porcentajes en el peso total de dicha formulación.
- Una realización adicional comprende aproximadamente 1 por ciento de compuesto, aproximadamente 10 por ciento de dicho ácido isoesteárico, aproximadamente 2 por ciento de alcohol bencílico, aproximadamente 1,7 por ciento de alcohol cetílico, aproximadamente 2,3 por ciento de alcohol estearílico, aproximadamente 2,55 por ciento de polisorbato 60, aproximadamente 0,45 por ciento de monoestearato de sorbitán, aproximadamente 2 por ciento de glicerina, aproximadamente 0,2 por ciento de metilparabeno, aproximadamente 0,02 por ciento de propilparabeno y aproximadamente 77,78 por ciento de agua purificada, basándose todos los porcentajes en el peso total de dicha formulación.
- La formulación puede comprender aproximadamente 5 por ciento de compuesto, aproximadamente 25 por ciento de dicho ácido isoesteárico, aproximadamente 2 por ciento de alcohol bencílico, aproximadamente 2,2 por ciento de alcohol cetílico, aproximadamente 3,1 por ciento de alcohol estearílico, aproximadamente 3 por ciento de petrolato, aproximadamente 3,4 por ciento de polisorbato 60, aproximadamente 0,6 por ciento de monoestearato de sorbitán, aproximadamente 2 por ciento de glicerina, aproximadamente 0,2 por ciento de metilparabeno, aproximadamente 0,02 por ciento de propilparabeno y aproximadamente 53,48 por ciento de agua purificada, basándose todos los porcentajes

en el peso total de dicha formulación.

Alternativamente la formulación puede comprender aproximadamente 1 por ciento de compuesto, aproximadamente 5 por ciento de dicho ácido isoesteárico, aproximadamente 15 por ciento de petrolato, aproximadamente 12,8 por ciento de aceite mineral ligero, aproximadamente 8 por ciento de estearato o de aluminio, aproximadamente 4 por ciento de alcohol cetílico, aproximadamente 3 por ciento de poli(4-oleato de glicerilo), aproximadamente 1 por ciento de lanolina acetilada, aproximadamente 0,063 por ciento de propilparabeno, aproximadamente 1 por ciento de Veegum K, aproximadamente 0,12 por ciento de metilparabeno y aproximadamente 49,02 por ciento de agua purificada, basándose todos los porcentajes en el peso total de dicha formulación.

Una composición adherente sensible a la presión generalmente comprende el compuesto, ácido graso, y un polímero adherente sensible a la presión. La cantidad del compuesto presente en una composición adherente sensible a la presión tiene preferiblemente de aproximadamente 0,5 por ciento a aproximadamente 9 por ciento en peso, y más preferiblemente de aproximadamente 3 por ciento a aproximadamente 7 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición adherente. La cantidad de ácido graso presente es preferiblemente de aproximadamente 10 por ciento a aproximadamente 40 por ciento en peso, más preferiblemente de aproximadamente 15 por ciento a aproximadamente 30 por ciento en peso, y muy preferiblemente de aproximadamente 20 por ciento a aproximadamente 30 por ciento en peso, basándose en el peso total de la composición adherente.

Preferiblemente, el polímero adherente utilizado en una composición adherente sensible a la presión es esencialmente químicamente inerte al compuesto. El polímero adherente está preferiblemente presente en una cantidad de aproximadamente 55 por ciento a aproximadamente 85 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición. Los polímeros adherentes adecuados incluyen adhesivos acrílicos que contienen, como constituyente principal (es decir, al menos aproximadamente 80 por ciento en peso de todos los monómeros del polímero), un éster de ácido acrílico o metacrílico monomérico hidrófobo de un alcohol alquílico que contiene de 4 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos de los monómeros adecuados son aquellos comentados más abajo en relación con "Un Monómero". Estos polímeros adherentes pueden contener adicionalmente cantidades minoritarias de monómeros tales como los "Monómeros B" enumerados más abajo.

Los adhesivos preferidos incluyen copolímeros adherentes sensibles a la presión acrílicos que contienen Monómeros A y B como sigue: el Monómero A es un éster de ácido acrílico o metacrílico monomérico hidrófobo de un alcohol alquílico, conteniendo el alcohol alquílico de 4 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 6 a 8 átomos de carbono, y muy preferiblemente 8 átomos de carbono. Los ejemplos de los Monómeros A adecuados son los acrilatos de n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, isoheptilo, n-nonilo, n-decilo, isohexilo, 2-etiloctilo, isooctilo y 2-etilhexilo. El Monómero A más preferido es acrilato de isooctilo.

El Monómero B es un monómero de refuerzo seleccionado del grupo que consiste en ácido acrílico; ácido metacrílico; acrilatos y metacrilatos de alquilo que contienen de 1 a to 3 átomos de carbono en el grupo alquilo; acrilamida; metacrilamida; acrilamidas sustituidas con alquilo inferior (es decir, el grupo alquilo contiene de 1 a 4 átomos de carbono) tal como t-butilacrilamida; diacetonaacrilamida; n-vinil-2-pirrolidona; éteres vinílicos tales como éter vinil-t-butilico; etilenos sustituido tales como derivados de anhídrido maleico, itaconato de dimetilo y formiato de monoetilo y vinil-perfluoro-n-butilato. Los Monómeros B preferidos son ácido acrílico, ácido metacrílico, los acrilatos y metacrilatos de alquilo descritos antes, acrilamida, metacrilamida, y las acrilamidas sustituidas con alquilo inferior descritas antes. El Monómero B más preferido es la acrilamida.

En una realización de una composición adherente sensible a la presión, el copolímero adherente sensible a la presión que contiene los Monómeros A y B mostrados antes contiene preferiblemente el Monómero A en una cantidad en peso de aproximadamente 80 por ciento a aproximadamente 98 por ciento en peso del total de todos los monómeros del copolímero. El Monómero A está más preferiblemente presente en una cantidad en peso de aproximadamente 88 por ciento a aproximadamente 98 por ciento, y está presente muy preferiblemente en una cantidad en peso de aproximadamente 91 por ciento a aproximadamente 98 por ciento. El Monómero B de semejante copolímero está presente preferiblemente en el copolímero adherente sensible a la presión en una cantidad en peso de aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 20 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 12 por ciento, y muy preferiblemente 2 a 9 por ciento en peso total de los monómeros del copolímero.

En otra realización de una composición adherente sensible a la presión, el copolímero adherente comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 80 por ciento en peso (y preferiblemente de aproximadamente 70 a aproximadamente 80 por ciento en peso) del éster de ácido acrílico o metacrílico monomérico hidrófobo mencionado antes de un alcohol alquílico (es decir, Monómero A descrito antes) basándose en el peso total de todos los monómeros del copolímero; aproximadamente de 4 a aproximadamente 9 por ciento en peso basándose en el peso total de todos los monómeros del copolímero de un monómero de refuerzo seleccionado del grupo que consiste en ácido acrílico, ácido metacrílico, un acrilato o metacrilato de alquilo que contiene de 1 a 3 átomos de carbono en el grupo alquilo, acrilamida, metacrilamida, una acrilamida sustituida con alquilo inferior, diacetonaacrilamida y N-vinil-2-pirrolidona; y de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 por ciento en peso (y preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 por ciento en peso) de acetato de vinilo basándose en el peso total de todos los monómeros del copolímero. En esta realización el éster de ácido acrílico o metacrílico preferido es el acrilato de isooctilo y el monómero de refuerzo preferido es la acrilamida.

Los copolímeros adherentes descritos antes son conocidos, y los métodos de preparación de los mismos son

bien conocidos por los expertos en la técnica, habiendo sido descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 24.906 (Ulrich). La reacción de polimerización se puede llevar a cabo utilizando un iniciador de radicales libres tal como un peróxido orgánico (por ejemplo, peróxido de benzoílo) o un azocompuesto orgánico (por ejemplo, 2,2'-azobis(2,4-dimetilpentano-nitrilo), asequible con la denominación comercial "Vazo 52" de DuPont).

Puesto que los adhesivos sensibles a la presión tales como los descritos antes son inherentemente gomosos y pegajosos y son adecuadamente estables al calor y a la luz, no hay necesidad de añadir promotores de la adherencia o estabilizadores. No obstante, estos pueden ser añadidos si se desea.

Opcionalmente, una composición adherente sensible a la presión (o en efecto cualquier otra composición descrita en la presente memoria) también puede contener uno o más potenciadores de la penetración en la piel tales como monolaurato de glicerilo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, adipato de diisopropilo y N-óxido de N,N-dimetildodecilamina, ya sea en forma de un ingrediente individual o en forma de una combinación de dos o más ingredientes. Los potenciadores de la penetración en la piel forman preferiblemente una mezcla sustancialmente homogénea con el polímero o copolímero adherente sensible a la presión. La cantidad total de potenciador o potenciadores de la penetración en la piel presente en una composición adherente sensible a la presión de la invención es preferiblemente de aproximadamente 3 por ciento a aproximadamente 25 por ciento en peso, más preferiblemente de aproximadamente 3 por ciento a aproximadamente 10 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición adherente.

Cuando el potenciador de la penetración en la piel es un ingrediente individual, éste es preferiblemente un potenciador de la penetración en la piel tal como miristato de isopropilo, adipato de diisopropilo, oleato de etilo, o monolaurato de glicerilo. Cuando se utiliza una combinación de potenciadores de la penetración en la piel, ésta es preferiblemente una combinación tal como: oleato de etilo con monolaurato de glicerilo; oleato de etilo con N-óxido de N,N-dimetildodecilamina; monolaurato de glicerilo con N-óxido de N,N-dimetildodecilamina; y oleato de etilo tanto con monolaurato de glicerilo como con N-óxido de N,N-dimetildodecilamina.

Las composiciones adherentes sensibles a la presión descritas antes se aplican como recubrimiento preferiblemente sobre el respaldo de un material laminar adecuado, tal como una película, formando un material laminar revestido de adhesivo sensible a la presión. El material laminar revestido de adhesivo sensible a la presión puede ser preparado mediante revestimiento con cuchilla de un revestimiento protector desprendible adecuado hasta un grosor uniforme predeterminado con una formulación de adhesivo húmedo. Este revestimiento protector desprendible revestido de adhesivo se seca después y se lamina sobre un respaldo utilizando métodos convencionales. Los protectores adecuados incluyen protectores convencionales que comprenden un material laminar conocido, tal como una red de poliéster, una red de polietileno, o una red de poliestireno, o papel recubierto con polietileno, recubierto con un revestimiento de tipo silicona adecuado tal como el asequible con el nombre comercial Daubert 164Z, de Daubert Co. El respaldo puede ser una película oclusiva, no oclusiva o transpirable según se desee. El respaldo puede ser de cualquier material convencional para cintas adhesivas sensibles a la presión, tal como polietileno, particularmente polietileno de baja densidad, polietileno lineal de baja densidad, polietileno de alta densidad, fibras de nailon orientadas al azar, polipropileno, copolímero de etileno-acetato de vinilo, poliuretano, rayón y similares. También son adecuados los respaldos que están estratificados, como los materiales compuestos de polietileno-aluminio-polietileno. El respaldo será prácticamente no reactivo con los ingredientes del revestimiento adhesivo. El respaldo actualmente preferido es en polietileno de baja densidad.

El material laminar revestido de adhesivo sensible a la presión puede ser elaborado en forma de un artículo tal como una cinta, un parche, una lámina, un vendaje o cualquier otra forma conocida por los expertos en la técnica.

Preferiblemente, un artículo en forma de parche se elabora a partir de un material laminar revestido adherente de la invención y se aplica a la piel de un mamífero. El parche se sustituye si es necesario por un parche nuevo para mantener el efecto terapéutico deseado concreto del compuesto de la invención.

Las formulaciones que son adecuadas para su uso en la invención se describen en la técnica anterior, por ejemplo en el documento US-A-5.238.944 (que describe las formulaciones preferidas para su uso en el método de la invención), el documento US-A-4.689.338, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.751.087 (que describe el uso de una combinación de oleato de etilo y monolaurato de glicerilo como potenciador de la penetración en la piel para la nitroglicerina, estando contenidos los tres componentes en la capa adherente de un parche transdérmico), la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.411.893 (que describe el uso de N-óxido de N,N-dimetildodecilamina como un potenciador de la penetración en la piel en sistemas acuosos), la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.722.941 (que describe composiciones farmacéuticas fácilmente absorbibles que comprenden un agente farmacológicamente activo distribuido en un vehículo que comprende una cantidad de potenciador de la absorción de al menos un ácido graso que contiene de 6 a 12 átomos de carbono y opcionalmente un monoglicérido de ácido graso), la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.746.515 (que describe un método de utilización de monolaurato de glicerilo para intensificar el flujo transdérmico de un fármaco liberable transdérmicamente a través de la piel intacta).

Los siguientes son ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen con fines meramente ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención en modo alguno.

Ejemplos**Materiales y Métodos****Plásmidos**

Para la inmunización con el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) se utilizó un plásmido que contenía el promotor/intensificador de HCMV para dirigir la expresión del HBsAg. Para un experimento los autores de la invención también emplearon un plásmido en el que se utilizó el promotor de la queratina 14 en lugar del promotor de HCMV. Se espera que este promotor tenga un patrón de expresión más restringido y sea expresado solamente en la piel a diferencia del promotor de HCMV que es expresado en muchos tipos celulares.

Para la inmunización con antígenos de HSV-2 en algunos casos se utilizaron plásmidos de un solo gen que expresaban las proteínas gD o gB empleando el promotor de HCMV. Los plásmidos de un solo gen se crearon mediante amplificación de secuencias genómicas mediante PCR e inserción del fragmento de PCR en el vector de expresión pTARGET. En algunos casos se utilizaron fragmentos genómicos de HSV-2 para la inmunización que los autores de la presente invención denominaron vacunas subgenómicas (SV). Estas no utilizan el promotor de HCMV pero en su lugar utilizan los promotores nativos de los genes presentes en el fragmento. Los fragmentos genómicos se clonan en el esqueleto SuperCos de Stratagene. La vacuna subgenómica tiene un segmento genómico de aproximadamente 36.000 bases que contiene los nucleótidos 110.931-147.530 del genoma.

En algunos experimentos se utilizaron plásmidos que contenían las subunidades A y B de los genes de la toxina del Cólera (CT). Otro plásmido utilizado expresó el gen HSP70. Este gen fue clonado a partir de una reacción RT-PCR del ARN obtenido de esplenocitos de ratón, y se clonó en el vector pTARGET.

Todos los constructos de ADN se purificaron a partir de extractos bacterianos utilizando kits de purificación (Qiagen) y se evaluó la pureza mediante electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos completos o digeridos y determinando las proporciones de A260/A280.

Coadyuvantes Tópicos.

Se obtuvo Imiquimod en forma de crema Aldara por medio de una receta. Para aplicarla, la crema se frotó sobre los abdómenes de ratones que habían sido esquilados utilizando un bastoncillo de algodón. La crema es una solución al 5%. Se utilizaron aproximadamente 20 µl, y de este modo se administró a cada ratón aproximadamente 1 mg.

Preparación de vacunas de ADN.

La precipitación de ADN sobre partículas de oro se logró utilizando procedimientos convencionales para la formulación con calcio/espermidina de vacunas de ADN. El ADN se mezcló con partículas de oro de 2 micras en un pequeño tubo de centrífuga que contenía 300 ml de espermidina 50 mM. La cantidad de ADN añadido es de 2 µg por mg de partículas de oro y se hicieron típicamente lotes de 26 mg de oro (52 µg de ADN). El ADN se hizo precipitar sobre el oro mediante la adición de un volumen 1/10 de CaCl₂ al 10% durante la agitación continua del tubo en una mezcladora giratoria. Los complejos de ADN-oro se lavaron tres veces con etanol absoluto, después se cargaron en tubos de Tefzel, se secaron y se cortaron en segmentos de 1,27 centímetros para su uso en el dispositivo XR-1.

Los casos en los que se utilizó más de un ADN se llevaron a cabo mezclando primero los constructos de ADN después de la precipitación sobre oro. Esto sitúa los ADN sobre la misma partícula.

Para la inmunización, se liberaron vacunas de ADN por medio del dispositivo XR-1 en el abdomen de los ratones Balb/C. Se realizó un único disparo para la inmunización. En algunos experimentos se empleó solamente un cebado, y en otros un cebado y un refuerzo a las 4 semanas. Las muestras se recogieron de los animales dos semanas después de la inmunización final.

ELISA de Anticuerpos

Se analizaron muestras de suero en busca de anticuerpos utilizando un análisis ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación Falcon Pro Bind durante la noche a 4°C con antígeno en PBS (solución salina tamponada con fosfato, BioWhittaker). Para el ELISA de HBsAg se purificó el antígeno HBsAg (BioDesign) a 0,1 µg por pocillo, y para los ELISA de HSV el antígeno consistió en 5 µg por pocillo de un extracto celular infectado (Advanced Biotechnologies Incorporated). Las placas se bloquearon durante 1 hora a la temperatura ambiente con leche en polvo al 5%/PBS después se lavaron 3X con tampón de lavado (Solución salina tamponada con Tris 10 mM, Brij-35 al 0,1%) y las muestras de suero se diluyeron en tampón de dilución (leche en polvo al 2%/PBS/Tween 20 al 0,05%), se añadieron a la placa y después se incubaron durante 2 horas a la temperatura ambiente.

Las placas se lavaron 3X y se añadió a la placa un anticuerpo anti-ratón de cabra biotinilado (Southern Biotechnology) diluido 1:8000 en tampón de dilución y incubó durante 1 hr a la temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron 3X, después se añadió un producto conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa de rábano picante (Southern Biotechnology) diluido 1:8000 en PBS y la placa se incubó una 1 hora más a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3X, después se añadió solución sustrato (BioRad) y la reacción se detuvo con H₂SO₄ 1N. Se leyó la densidad óptica a 450 nm. Los títulos del criterio de valoración para HBsAg se calcularon mediante comparación de las muestras con un patrón de título conocido.

Cultivo Celular

Se obtuvieron suspensiones de células individuales de bazos de ratón. Los bazos se exprimieron a través de una malla para producir una suspensión de una sola célula y después las células se sedimentaron, y se trataron con tampón ACK (Bio Whittaker, Walquersville MD) para lisar los glóbulos rojos de la sangre. Después las células se lavaron dos veces en medio RPMI 1640 con un suplemento de HEPES, glutamina al 1% (Bio Whittaker), y suero de ternera fetal inactivado con calor al 5% (FCS, Harlan, Indianapolis IN). Se contaron las células, y se resuspendieron a una concentración apropiada en medio "Total" que consistía en RPMI 1640 con HEPES y glutamina al 1%, con un suplemento de FCS inactivado con calor al 5%, mercaptoetanol 50 mM (Gibco-BRL, Long Island NY), gentamicina (Gibco-BRL), MEM con piruvato de sodio 1 mM (Gibco-BRL) y MEM con aminoácidos no esenciales (Sigma, St, Louis MO). Después se utilizaron las suspensiones celulares en diferentes inmunoanálisis. Para los análisis específicos de CD8 se cultivaron las células *in vitro* en presencia de un péptido correspondiente a epítotos CD8 conocidos. Para HBsAg en ratones BALB/C la secuencia del péptido fue IPQSLDSWWTSL (QCB Inc). Para las respuestas de CD8 a HSV en ratones Balb/C se utilizó el péptido HGPSLYRTF encontrado en ICP27. Los péptidos fueron elaborados en DMSO (10 mg/ml) y diluidos a 10 µg/ml en medio de cultivo.

ELISPOT

Para los análisis ELISPOT con IFN-γ se revistieron placas de filtración con membrana Millipore Multiscreen con 50 µl de antisuero anti-IFN-γ de 15 µg/ml (Pharmingen) en tampón carbonato estéril 0,1 M, pH 9,6, durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 6X con PBS estéril y después se bloquearon con medio de cultivo de tejidos que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS) durante 1-2 hr a la temperatura ambiente. El medio se eliminó y las células de bazo se dispensaron en los pocillos con un total de 1×10^6 células por pocillo. Para los pocillos en los que se habían añadido menos de 1×10^6 células de animales inmunizados, se utilizaron células de animales no sometidos a tratamiento previo para llevar el total a 1×10^6 . Las células se incubaron durante la noche en una incubadora para cultivos de tejidos en presencia del péptido como se ha descrito antes. Las placas se lavaron 2X con PBS y 1X con agua destilada. Esto estuvo seguido de 3 lavados con PBS. Se añadió anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ biotinilado (Pharmingen) a la placa (50 µl de una solución de 1 µg/ml en PBS) y se incubó durante 2 hr a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6X con PBS después se añadieron 50 µl de un producto conjugado de Estreptavidina-Fosfatasa alcalina (1:1000 en PBS, Pharmingen) y se incubaron durante 2 hr a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6X con PBS y se añadió el sustrato coloreado (BioRad) y se dejó que la reacción prosiguiera hasta que aparecieron manchas oscuras. La reacción se detuvo lavando con agua 3X. Las placas se secaron al aire y se contaron las manchas con un microscopio.

ELISA para IFN-γ

Para el ELISA con IFN-γ CD8 se cultivaron células durante la noche en placas para el cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo redondo en presencia del péptido. Se tomaron muestras del sobrenadante y se utilizaron para la determinación de los niveles de IFN-γ. Se recubrieron las placas con una unión elevada (Costar) con 100 µl de anticuerpo anti-IFN-γ de ratón de 0,5 µg/ml (Pharmingen) en tampón bicarbonato, pH 9,6. Las placas se bloquearon durante 1 hr a la temperatura ambiente con medio de cultivo de tejidos que contenía FBS al 10%, después se lavó 3X con el tampón de lavado de TBS. Las muestras de sobrenadante obtenidas de las células cultivadas se diluyeron en medio para el cultivo de tejidos y se cargaron sobre la placa y se incubaron durante 2 hr a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3X con tampón de lavado y se añadió un anticuerpo secundario (0,5 µg/ml de anti-IFN-γ de ratón de rata biotinilado en PBS, Pharmingen) a las placas y se incubaron durante 1 hr a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3X, y se añadió un producto conjugado de Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (1:2000 en PBS, Southern Biotechnology) durante 1 hr a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3X, después se añadió solución sustrato (BioRad) y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. Se leyó la densidad óptica a 450 nm.

Cuando se llevaron a cabo los ELISA de IFN-γ sobre células estimuladas con HSV-2 inactivado con UV, se utilizaron los sobrenadantes de las placas de proliferación (descritos más abajo) como fuente de IFN-γ experimental. Por lo demás el procedimiento fue el mismo descrito antes.

Análisis de Proliferación.

Para la proliferación se cultivaron en placa las células a una concentración de 3×10^5 células/pocillo en placas Costar de 96 pocillos (Coming Incorporated, Corning NY). Se añadieron virus inactivado con UV (moi original 2), o extractos de proteína de células infectadas (2 y 0,5 µg por pocillo) a los pocillos por triplicado y las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO_2 durante 3 días. Después se añadió metil-timidina- H^3 (NEN, Boston MD) (0,5 mCi pocillo) y las células se cultivaron durante 18 horas más antes de tratar las placas. Se calcularon los índices de estimulación tomando las cpm medias de los pocillos por triplicado para las células estimuladas por el antígeno, divididas por la media de los pocillos por triplicado de las células cultivadas solamente con medio.

Experimento inicial para investigar la actividad como coadyuvante potencial de imiquimod

Los ratones fueron inmunizados con una vacuna de ADN que contenía un plásmido de expresión de HBsAg utilizando una dosis elevada (1 µg) o una dosis baja (50 ng) de vacuna. Tratamiento con crema de imiquimod al 5% Aldara fue 1 día antes de la inmunización (día -1), el día de la inmunización (día 0), 1 día después o 2 días después de la inmunización. También se trató un grupo durante tres días (día 0, 1 y 2). Se administró a los ratones una única dosis de vacuna y se sacrificaron 2 semanas más tarde para medir las respuestas inmunitarias. Los resultados mostrados en la Figura 1 son del ELISA para IFN-γ CD8. A partir de estos datos hubo una indicación de que Aldara podía reforzar las respuestas inmunitarias celulares. Se encontró cierto efecto el día 0 pero el día 1 parecía ser mejor, esto se debía en

gran parte a dos respondedores fuertes. Los valores son la media de 4 ratones individuales.

También se sometió a ensayo el anticuerpo del suero (Figura 2), pero debido a que estos son solamente 2 semanas después del cebado tienden a ser variables.

Ejemplo 2

El imiquimod intensifica las respuestas celulares cuando se aplica un día después de la inmunización

Se repitió el experimento descrito en el Ejemplo 1. Además se sometieron a ensayo diferentes dosis de otro coadyuvante (coadyuvante A). Se administró a los animales un cebado y un refuerzo utilizando un plásmido que expresaba el gen de HBsAg a partir del promotor de HCMV. Los niveles de anticuerpo resultaron ligeramente afectados por el coadyuvante A pero en este caso puede ser claramente observado el efecto del imiquimod y se encontró una fuerte reducción en los niveles de anticuerpo (Figura 3).

La respuesta celular mostrada tanto por el ELISA para IFN-g como por los ELISPOT indicó que el tratamiento con imiquimod potenciaba las respuestas. Los animales tratados con Aldara un día después de la inmunización mostraron de nuevo el efecto más fuerte (Figura 4).

Esto es confirmado por los datos mostrados en la Figura 5. En todos los experimentos siguientes se administró crema Aldara el Día 1 después de la inmunización.

Ejemplo 3

Efecto de imiquimod sobre una variedad de estrategias de refuerzo y cebado diferentes

Este experimento incluye un plásmido que expresa HBsAg a partir del promotor de queratina 14. Esto se utilizó para probar y alterar la expresión del antígeno en diferentes tipos de células y ver si esto afectaba a la respuesta inmunitaria. Los ratones fueron inmunizados dos veces. Algunos fueron tratados con crema Aldara en el cebado solamente, a algunos se les administró Aldara solamente en el refuerzo y un grupo recibió Aldara tanto en el cebado como en el refuerzo.

Los resultados se muestran en la Figura 6. Los títulos de anticuerpo no fueron aumentados por los tratamientos y como se encontró a menudo, de hecho fueron reducidos. La reducción más pronunciada para los ratones a los que se habían administrado dos inmunizaciones es en el grupo al que se había administrado crema Aldara en el cebado y en el refuerzo. En las Figuras los animales no sometidos a tratamiento previo se marcaron como "N" y a los animales marcados como HA, (grupo sesenta) se les administró solamente una única inmunización.

Cuando se midieron las respuestas inmunitarias celulares (Figura 7 y 8) los autores de la presente invención no obtuvieron el patrón esperado debido a que el grupo de control al que se habían administrado dos inmunizaciones con el plásmido HCMV (H,H) tuvo respuestas considerablemente superiores a las encontradas en el pasado (véase el experimento previo). Los controles anormalmente bajos hicieron imposible interpretar los efectos de Aldara, aunque si se considera que el control H,H debe ser más similar al grupo H,K a su lado, se puede extrapolar un efecto del Aldara. En términos generales, parece que Aldara intensifica las respuestas celulares, e inhibe las respuestas de anticuerpos.

Ejemplo 4

Uso de imiquimod para potenciar las respuestas a los antígenos HSV-2

En este experimento se utilizaron tres tipos de vacunas de ADN. Un plásmido con un solo gen gD que expresa la glicoproteína completa que sería una proteína de membrana. Un plásmido con un solo gen gB que expresa una forma truncada de la proteína de manera que es secretada a partir de la célula. El tercer tipo de vacuna es una vacuna subgenómica que contiene un fragmento genómico de HSV-2. En este fragmento está el gen para gD, pero no para gB. Otros genes de interés en esta vacuna son los genes tempranos inmediatos ICP0, 4 22 y 27. Los coadyuvantes utilizados fueron crema Aldara aplicada tópicamente, los genes CT liberados conjuntamente sobre las mismas partículas de oro que la vacuna y otro coadyuvante (coadyuvante B) administrado el día 0, 1 y 2.

Las medidas de la inmunidad celular (Figuras 9 y 10) demuestran que los coadyuvantes CT son superiores a los otros coadyuvantes aunque fue evidente cierta actividad para la crema Aldara.

Ejemplo 5

Ensayo de un panel de coadyuvantes

Se sometió a ensayo un panel de coadyuvantes en busca de actividad con una vacuna HSV-2 que era la vacuna subgenómica. En este caso se utilizaron coadyuvante A y el gen HSP así como crema Aldara y los genes CT. Todos los coadyuvantes se administraron a una dosis a la cual los autores de la presente invención habían observado previamente efectos óptimos en los experimentos con las vacunas de HBsAg. Se aplicó Aldara un día después de la inmunización, se administró coadyuvante A (150 ng) el día de la inmunización, los genes CT y HSP fueron liberados simultáneamente con la vacuna subgenómica en proporciones 9:1 y 20:1 de vacuna:coadyuvante respectivamente. Se administraron a los animales un cebado y un refuerzo. Las respuestas de los anticuerpos son típicamente bajas a partir de la vacuna y ninguno de los coadyuvantes mostró una fuerte capacidad para reforzarlas (Figura 11).

Se midieron las respuestas inmunitarias celulares mediante las proliferaciones en respuesta a HSV-2 inactivado por UV así como las respuestas específicas de CD8 a la proteína ICP27 expresada a partir de la vacuna (Figuras 12 a 14).

Ejemplo 6**Ensayo de subclases de anticuerpos**

Se realizó un ELISA sobre muestras de suero de diferentes experimentos para examinar la subclase de anticuerpo específico de HBsAg. Las respuestas sin coadyuvante de la vacuna de ADN muestran una proporción de IgG1/IgG2a de aproximadamente 3. Una predisposición celular más fuerte de una respuesta inmunitaria es indicada por una respuesta de IgG2a más fuerte de manera que la proporción se aproximaría de este modo a 1 o menor. De los coadyuvantes con los que habían trabajado los autores de la presente invención, Aldara es uno en el que esta proporción cae indicando que es capaz de desviar la respuesta inmunitaria hacia una respuesta celular (Figura 15). PGE2 por ejemplo no tiene el mismo efecto global aunque puede intensificar las respuestas celulares como hace Aldara, pero no parece desplazar tanto la respuesta inmunitaria. Esta característica de imiquimod puede tener importancia cuando una respuesta de anticuerpos es perjudicial, o se necesita una respuesta celular enormemente sesgada.

Ejemplo 7**Caracterización adicional de la actividad coadyuvante de imiquimod**

Se realizaron dos experimentos adicionales para evaluar la eficacia de imiquimod (crema Aldara) como coadyuvante para la inmunización mediada por partículas con ADN (PAID). En ambos experimentos se utilizó un plásmido que expresaba sAg y cAg de HBV como vacuna de ensayo. La dosificación de ADN, la formulación de Aldara (puro vs. diluido con crema de control), y el tiempo de administración de Aldara se variaron. Las lecturas incluyeron títulos de anticuerpo y ELISPOT con citoquina para los dos antígenos. Como se esperaba a partir de los resultados de los Ejemplos anteriores, el imiquimod potenciaba principalmente la respuesta de ELISPOT para IFN- γ con un pequeño efecto sobre los títulos de anticuerpo y los ELISPOT para IL-4. Los resultados también demostraron que la liberación de Aldara de uno o siete días después de PMID era generalmente más eficaz que la crema de control o Aldara liberadas en el momento de la administración de PMID.

Con el fin de someter a ensayo la eficacia de imiquimod como coadyuvante para PMID, se administró ADN que codificaba sAg y cAg de HBV utilizando un dispositivo ND5.5 y se administró el imiquimod en forma de crema Aldara. En el primer experimento, se sometieron a ensayo las diferentes dosis de ADN y los puntos horarios de la administración de Aldara (Tabla 1). En el segundo experimento, se sometió a ensayo una única dosis de ADN que codificaba HBV (2 μ g) junto con el tratamiento con Aldara el día 1 después de la vacunación con PMID, Aldara diluido al mismo tiempo que PMID, y Aldara 1 semana después de PMID (Tabla 2).

Se vacunaron grupos de 5-10 ratones Balb/c en el abdomen afeitado con un disparo el día 0 (cebado solamente) o los días 0 y 28 (cebado y refuerzo). Se administró PMID utilizando un dispositivo ND5.5 con una carga explosiva de 1 mg de Au y un cilindro de 35 bares. Se administró Aldara a la dosis y en los tiempos indicados en las tablas de más arriba. El imiquimod se administró en forma de crema Aldara (imiquimod al 5%) obtenido de un fármaco. En el experimento uno, se liberó una pequeña cantidad de Aldara no medida en los tiempos indicados utilizando un bastoncillo de algodón para frotar la crema. En el experimento dos, se midieron 20 ml de Aldara y se aplicaron a los ratones. La crema de control fue una crema de manos de venta sin receta que contenía muchos ingredientes iguales que la crema base de Aldara. En el grupo en el que Aldara se había diluido, se emulsionó una mezcla 5:1 de crema de control y Aldara entre dos jeringas utilizando una llave de paso de tres vías.

Se tomaron muestras de sangre de los ratones retro-orbitalmente a las 4 semanas para los grupos de cebado/refuerzo. Se recogió la sangre por medio de punción intracardiaca, y se separaron los bazo para los análisis celulares en el sacrificio cada 2 semanas (cebado solamente) o cada 6 semanas (refuerzo + 2 semanas). Se analizaron los sueros en busca de anticuerpos anti-sAg y anti-cAg utilizando ELISA de la empresa. Las células de bazo de los ratones individuales se estimularon con proteína o péptido para los análisis ELISPOT de g-IFN e IL-4. Se utilizaron tres grupos de antígeno: 1) cAg intacto de Bidesign; 2) una genoteca de péptidos sAg solapantes (15 meros desplazados por 3 aminoácidos sintetizados por Chiron); y 3) un péptido inmunodominante de sAg (aminoácidos 28-39) conocido por unirse a la molécula L^d del MHC de clase I. Se calcularon las células formadoras de manchas específicas restando el número de manchas generadas con las células cultivadas en medio solo.

Como se ha observado previamente, el imiquimod no intensificó las respuestas de anticuerpo a ningún antígeno de HBV (datos no mostrados). En el primer experimento, tampoco hubo efecto del imiquimod sobre la secreción de IL-4, según se midió mediante análisis ELISPOT (tampoco mostrado). Como se muestra en Figura 16, hubo un aumento de la frecuencia de células que secretaban g-IFN en respuesta al antígeno. Se muestra la respuesta a la genoteca del péptido sAg (principalmente células CD4+) pero se pudieron observar respuestas comparables con un péptido restringido a la clase 1 que estimula las células CD8+ (no mostrado). A la dosis baja de ADN que codifica HBV, el imiquimod aumenta la secreción de g-IFN cuando se administra en los tres puntos horarios, aunque la administración 24 horas después de PMID es la más eficaz. A la dosis más elevada de ADN, la administración de imiquimod es ligeramente inhibidora cuando se libera justo antes o justo después pero aumenta PMID cuando se administra 24 horas después.

En el segundo experimento, se intentaron regímenes de cebado/refuerzo así como la disminución de la dosis de imiquimod mezclando Aldara con una crema de control. Se debe observar que los autores de la presente invención no tenían modo de medir el imiquimod, los autores de la presente invención no estaban seguros de cuán eficaz era la mezcla. En este estudio, las respuestas en el ELISPOT con g-IFN de los ratones a los que se había administrado crema

de control eran mayores de lo normal después del cebado solamente. Por lo tanto, no hubo aumento de la respuesta por Aldara (datos no mostrados). Esto es, desafortunadamente, no coincidía con el primer estudio. En los animales que habían recibido refuerzo, sin embargo, se observó un aumento de la frecuencia de las células que secretaban g-IFN cuando se suministraba Aldara en los siguientes puntos horarios: 24 horas después del cebado solamente; 24 horas después del cebado y el refuerzo; 24 horas después del refuerzo solamente; y siete días después del refuerzo. El mayor efecto se produjo con la última dosis de Aldara (1 y 7 días después del refuerzo) (Figura 17).

Como los autores de la presente invención no han sometido a ensayo los ELISPOT en lapsos más prolongados después del refuerzo y el tratamiento con Aldara, no saben si este efecto es transitorio. Como en el experimento uno, las respuestas CD8+ eran similares a las respuestas CD4+ con la excepción de que el Aldara suministrado 24 horas después del refuerzo solamente no era mayor que cuando era liberado después del cebado solamente. A diferencia del experimento uno (estudios de cebado solamente), el aumento de las respuestas en el ELISPOT con IL-4 se observó después del refuerzo, particularmente con el grupo tratado 7 días después del refuerzo (datos no mostrados).

Estos experimentos demuestran que el imiquimod aumenta la frecuencia de las células que secretan g-IFN después de la vacunación con PMID. El punto horario óptimo para este efecto parece ser aproximadamente de un día hasta 7 días después de PMID.

Tabla 1

Grupo	Plásmido HBV sAg/cAg (µg)	Vector de Control (µg)	Aldara (tiempo relativo a PMID)
1	2	0	0
2	0,2	1,8	0
3	0,02	1,98	0
4	2	0	Justo antes
5	0,2	1,8	Justo antes
6	0,02	1,98	Justo antes
7	2	0	Justo después
8	0,2	1,8	Justo después
9	0,02	1,98	Justo después
10	2	0	Un día después
11	0,2	1,8	Un día después
12	0,02	1,98	Un día después
13	0	2	0

Tabla 2

Grupo	Tratamiento con Aldara (T=Tiempo post vacunación)	Día del Sacrificio
1	Crema control T=24 hr	14 post-cebado
2	Aldara puro T=24 hr	14 post-cebado
3	Aldara diluido 1:5 T=0	14 post-cebado
4	Aldara T=7 días	14 post-cebado
5	Sin tratamiento previo	14 post-cebado

Grupo	Tratamiento con Aldara (T=Tiempo post vacunación)	Día del Sacrificio
6	Crema control T=24 hr	14 post-refuerzo
7	Aldara puro T=24 hr en el cebado solamente	14 post-refuerzo
8	Aldara puro T=24 hr en el cebado y refuerzo	14 post-refuerzo
9	Aldara puro T=24 hr en el cebado solamente	14 post-refuerzo
10	Aldara T=7 días post-refuerzo	14 post-refuerzo
11	Sin tratamiento previo	14 post-refuerzo

Ejemplo 8

Actividad coadyuvante de Resiquimod

Se suministra tópicamente Resiquimod en la piel del abdomen de ratones Balb/c los días -2, -1, 0, 1, 2 o 3 con respecto a la inmunización el día 0. La inmunización utiliza una vacuna de ADN que expresa el antígeno de superficie de la Hepatitis B de manera que las respuestas celulares y de anticuerpos encontradas después del tratamiento con Resiquimod pueden ser evaluadas y comparadas con abundancia de datos históricos. La formulación consiste en una crema al 0,05%, una solución en DMSO (aproximadamente 5 mg/ml). Idealmente se someten a ensayo ambos tipos de fórmulas. La mitad de los ratones se sacrifican 7 días después de la inmunización para medir las respuestas inmunitarias celulares (ELISPOT CD8). El resto de los ratones se desangran 28 días después de la inmunización, se refuerzan con el mismo programa que la inmunización del cebado y después se sacrifican 2 semanas más tarde para someter a ensayo las respuestas de anticuerpos y celulares. Se utiliza suero para someter a ensayo el título de anticuerpo y para evaluar la distribución de las subclases de anticuerpo IgG que indica la tendencia de la respuesta inmunitaria.

En un punto horario antes o después de la inmunización el Resiquimod intensifica las respuestas inmunitarias a las vacunas de ADN. Es probable que la intensificación se produzca cuando el Resiquimod es suministrado 1 día después de la inmunización como se descubrió para Aldara, que es un compuesto similar. Muy probablemente se encuentra un refuerzo en la respuesta inmunitaria celular. El Resiquimod puede tener la capacidad de intensificar las respuestas de anticuerpos pero puede que esto no ocurra con el sitio de administración y el programa de administración que emplean los autores de la presente invención. En teoría, un punto horario (diferente del punto de intensificación) también puede encontrar un efecto supresor del Resiquimod, que puede ser explotado para otras aplicaciones. La dosis utilizada parece estar en el intervalo en el que se encuentra la actividad del Resiquimod in vivo, y una mejora adicional del método optimizará la dosificación y la formulación del Resiquimod.

Materiales y Métodos

Plásmidos

Para la inmunización se utilizaron plásmidos para vacuna de ADN con una respuesta inmunitaria bien conocida. El plásmido WRG7128 es una elección posible que expresa el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) que utiliza el promotor/intensificador de HCMV y genera una respuesta celular y de anticuerpos.

Coadyuvantes Tópicos

El Resiquimod se formula como una crema al 0,05%, o como una solución en DMSO de 5 mg/ml. Para aplicar la crema, esta se frota sobre los abdómenes de los ratones utilizando un bastoncillo de algodón. De este modo se suministran aproximadamente 20 ml de crema. La solución en DMSO se extiende sobre el abdomen de los ratones utilizando un pipeteador que libera 50 µg.

Vacunas de ADN

La precipitación de ADN sobre las partículas de oro se logra utilizando procedimientos convencionales para la formulación con calcio/espermidina de vacunas de ADN. Se mezcla el ADN con partículas de oro de 2 micras en tubo pequeño de centrífuga que contiene 300 ml de espermidina 50 mM. La cantidad de ADN añadido es de 2 µg por mg de partículas de oro y se elaboraron típicamente lotes de 26 mg de oro (52 µg de ADN). El ADN se hizo precipitar sobre oro mediante la adición de un 1/10 del volumen de CaCl₂ al 10% durante la agitación continua del tubo en una mezcladora giratoria. Los complejos de ADN-oro se lavaron tres veces con etanol absoluto, después se cargaron en tubos Tefzel, se secaron y se cortaron en segmentos de 11,27 centímetros para su uso el dispositivo XR-1.

Para la inmunización, se suministraron las vacunas de ADN por medio del dispositivo XR-1 en el abdomen de ratones Balb/C. Se realizó un único disparo para la inmunización. Algunos experimentos emplean solamente un cebado, y otros tendrán un cebado y un refuerzo a las 4 semanas.

ELISA de anticuerpos

Se analizan muestras de suero en busca de anticuerpos utilizando un análisis ELISA. Se recubren placas de microtitulación Falcon Pro Bind durante la noche a 4°C con antígeno en PBS (solución salina tamponada con fosfato, BioWhittaker). Para el ELISA con HBsAg el antígeno es HBsAg (BioDesign) purificado a 0,1 µg por pocillo. Las placas se bloquean durante 1 hora a la temperatura ambiente con leche en polvo al 5%/PBS después se lavan 3X con tampón de lavado (solución salina tamponada con Tris 10 mM, Brij-35 al 0,1%) y se añaden muestras de suero en tampón de dilución (leche en polvo al 2%/PBS/Tween 20 al 0,05%) a la placa y después se incuba durante 2 horas a la temperatura ambiente. Las placas se lavan 3X y se añade un anticuerpo anti-ratón de cabra biotinilado (Southern Biotechnology) diluido 1:8000 en tampón de dilución a la placa y se incuba durante 1 hr a la temperatura ambiente.

Después de la incubación, las placas se lavan 3X, después se añade un producto conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa de rábano picante (Southern Biotechnology) diluido 1:8000 en PBS y la placa se incuba 1 hora más a la temperatura ambiente. Las placas se lavan 3X, después se añade solución de sustrato (BioRad) y la reacción se detiene con H₂SO₄ 1N. Se lee la densidad óptica a 450 nm. Se calculan los títulos del criterio de valoración mediante comparación de las muestras con un patrón de título conocido. Para la evaluación de la subclase los anticuerpos anti-ratón utilizados son IgG1 o IgG2a específicos pero el análisis sigue siendo igual.

Cultivo Celular

Se obtienen suspensiones de una sola célula a partir de bazos de ratón. Los bazos se exprimen a través de una malla para producir una suspensión de una sola célula y después las células se sedimentan, y se tratan con tampón ACK (Bio Whittaker, Walquersville MD) para lisar los glóbulos rojos de la sangre. Después las células se lavan en medio RPMI 1640 con un suplemento de HEPES, glutamina al 1% (Bio Whittaker), y suero de ternera fetal inactivado con calor al 5% (FCS, Harlan, Indianapolis IN). Se cuentan las células, y se resuspenden hasta una concentración apropiada en medio "Total" que consiste en RPMI 1640 con HEPES y glutamina al 1%, con un suplemento de FCS inactivado con calor al 5%, mercaptoetanol 50 mM (Gibco-BRL, Long Island NY), gentamicina (Gibco-BRL), MEM con piruvato de sodio 1 mM (Gibco-BRL) y MEM con aminoácidos no esenciales (Sigma, St. Louis MO). Para los análisis específicos de CD8, se cultivan las células *in vitro* en presencia de un péptido correspondiente a epítopos CD8 conocidos. Para el HBsAg en ratones BALB/C la secuencia del péptido es IPQSLDSWWTSL (QCB Inc). Los péptidos se elaboran en DMSO (10 mg/ml) y se diluyen a 10 mg/ml en medio de cultivo.

ELISPOT

Para los análisis ELISPOT de IFN-γ se recubren placas de filtración con membrana Millipore Multiscreen con 50 µl de antisuero anti-IFN-γ de 15 µg/ml (Pharmingen) en tampón carbonato estéril 0,1 M, pH 9,6, durante la noche a 4°C. Las placas se lavan 6X con PBS estéril y después se bloquean con medio para el cultivo de tejidos que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS) durante 1-2 hr a la temperatura ambiente. El medio se separa y las células de bazo se dispensan en los pocillos con un total de 1X10⁶ células por pocillo. Para los pocillos en los que se añaden menos de 1X10⁶ células de los animales inmunizados, se utilizan células de animales no sometidos a tratamiento previo para llevar el total a 1X10⁶. Las células se incuban durante la noche en una incubadora para el cultivo de tejidos en presencia del péptido como se ha descrito antes. Las placas se lavan 2X con PBS y 1X con agua destilada. Esto está seguido de 3 lavados con PBS. Se añade anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ a (Pharmingen) a la placa (50 µl de una solución de 1 µg/ml en PBS) y se incuba durante 2 hr a la temperatura ambiente. Las placas se lavan 6X con PBS después se añaden 50 µl de un producto conjugado de Estreptavidina-Fosfatasa alcalina (1:1000 en PBS, Pharmingen) y se incuba durante 2 hr a la temperatura ambiente. Las placas se lavan 6X con PBS y se añade el sustrato coloreado (BioRad) y se permite que la reacción prosiga hasta que aparecen manchas oscuras. La reacción se detiene lavando con agua 3X. Las placas se secan al aire y se cuentan las manchas con un microscopio.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en un método para intensificar o estimular en un individuo una respuesta inmunitaria mediada por células a un antígeno, donde el compuesto es una imidazoquinolinamina, imidazopiridin-amina, 6,7-cicloalquilimidazopiridinamina fusionada, 1,2- imidazoquinolinamina puenteada, tiazolo- u oxazolo-quinolinamina, tiazolo- u oxazolo-piridinamina, imidazonaftiridina o tetrahidroimidazonaftiridinamina, y donde el compuesto se administra tópicamente o transdérmicamente al individuo de 12 a 36 horas después de administrar un polinucleótido recombinante aislado capaz de expresar el antígeno.
2. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto es una imidazoquinolina.
3. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el compuesto es imiquimod.
4. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polinucleótido se administra tópicamente o transdérmicamente.
5. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto y/o el polinucleótido está/se administra en forma de partículas.
6. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde el polinucleótido y/o el compuesto están recubiertos sobre un portador núcleo.
7. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el portador núcleo está constituido por partículas de oro.
8. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde las partículas se administran utilizando una jeringa sin aguja.
9. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto se administra en forma de crema.
10. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polinucleótido se administra repetidamente para proporcionar una administración de cebado y refuerzo.
11. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polinucleótido intensifica o estimula una respuesta inmunitaria contra una infección viral.
12. Un compuesto para su uso de acuerdo con reivindicación 11, donde el virus es el virus de la hepatitis B, el virus herpes simplex, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus influenza o el papilomavirus.
13. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polinucleótido es ADN.
14. Un polinucleótido recombinante aislado capaz de expresar un antígeno para su uso en un método para intensificar o estimular en un individuo una respuesta inmunitaria mediada por células a dicho antígeno, donde el polinucleótido se administra de 12 a 36 horas antes de la administración tópica o transdérmica al individuo de un compuesto que es una imidazoquinolinamina, imidazopiridinamina, 6,7-cicloalquilimidazopiridinamina fusionada, 1,2-imidazoquinolinamina puenteada, tiazolo- u oxazolo-quinolinamina, tiazolo- u oxazolo-piridinamina, imidazonaftiridina o tetrahidroimidazonaftiridinamina.
15. El uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para intensificar o estimular en un individuo una respuesta inmunitaria mediada por células a un antígeno, donde el compuesto es una imidazoquinolinamina, imidazopiridinamina, 6,7-cicloalquilimidazopiridinamina fusionada, 1,2-imidazoquinolinamina puenteada, tiazolo- u oxazolo-quinolinamina, tiazolo- u oxazolo-piridinamina, imidazonaftiridina o tetrahidroimidazonaftiridinamina, y donde el compuesto es para la administración tópicamente o transdérmicamente al individuo de 12 a 36 horas después de administrar un polinucleótido recombinante aislado capaz de expresar el antígeno.

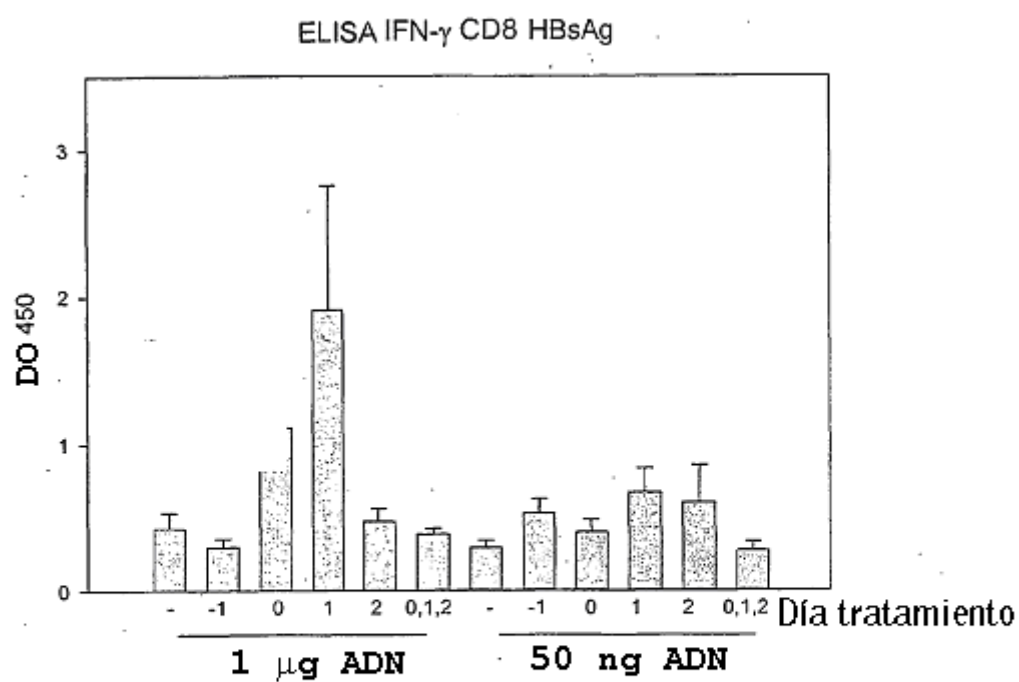


Figura 1

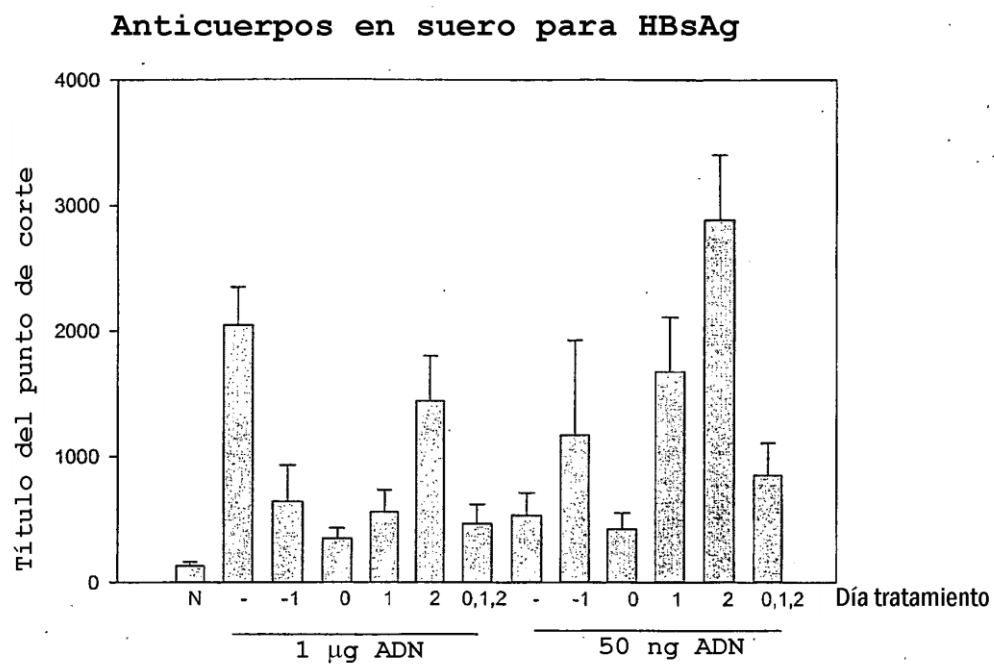


Figura 2

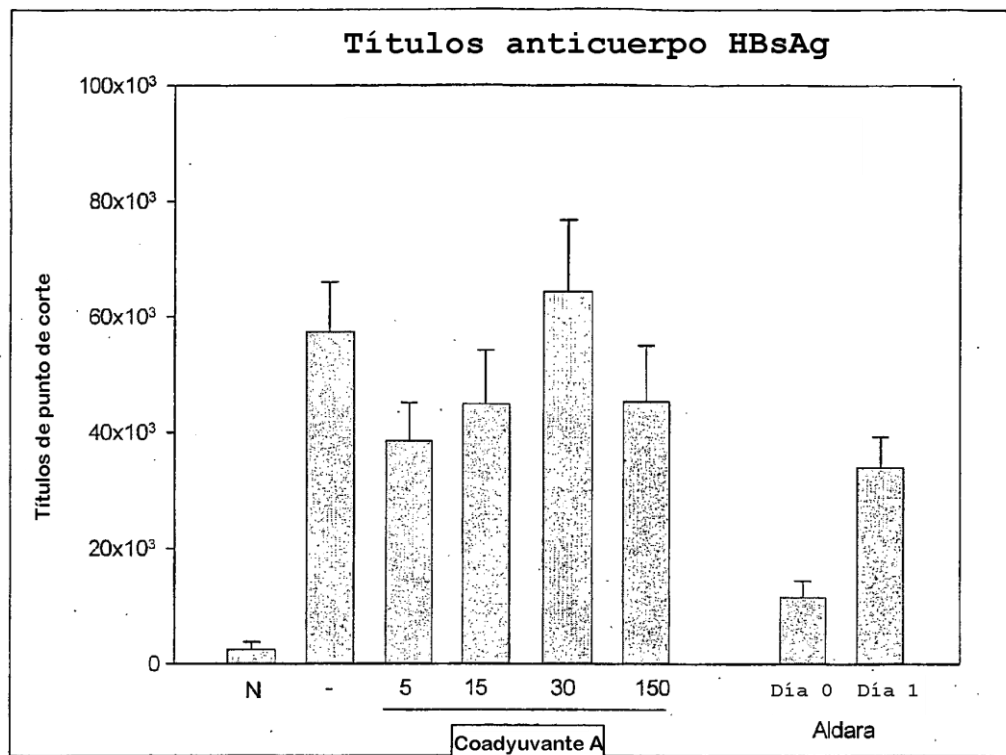


Figura 3

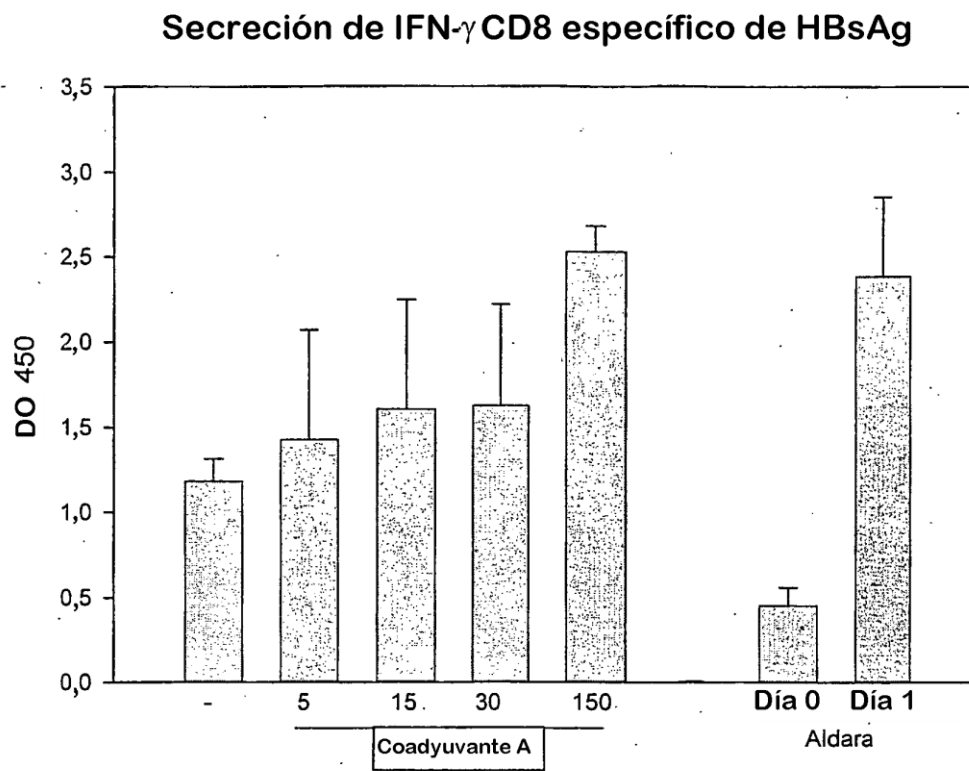


Figura 4

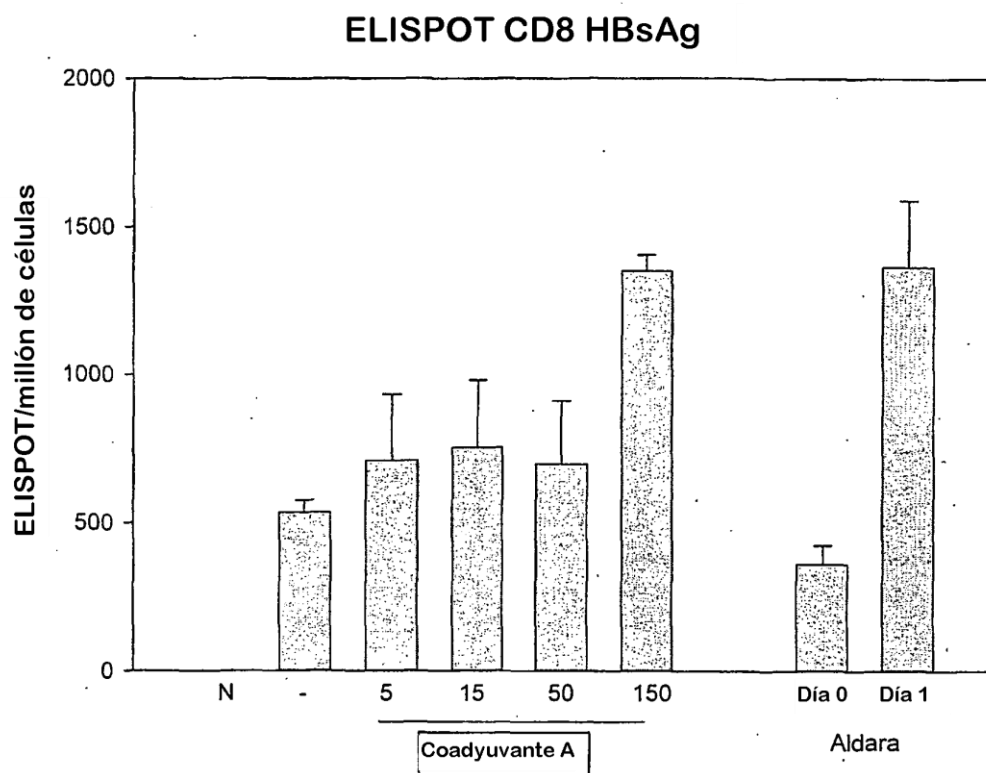


Figura 5

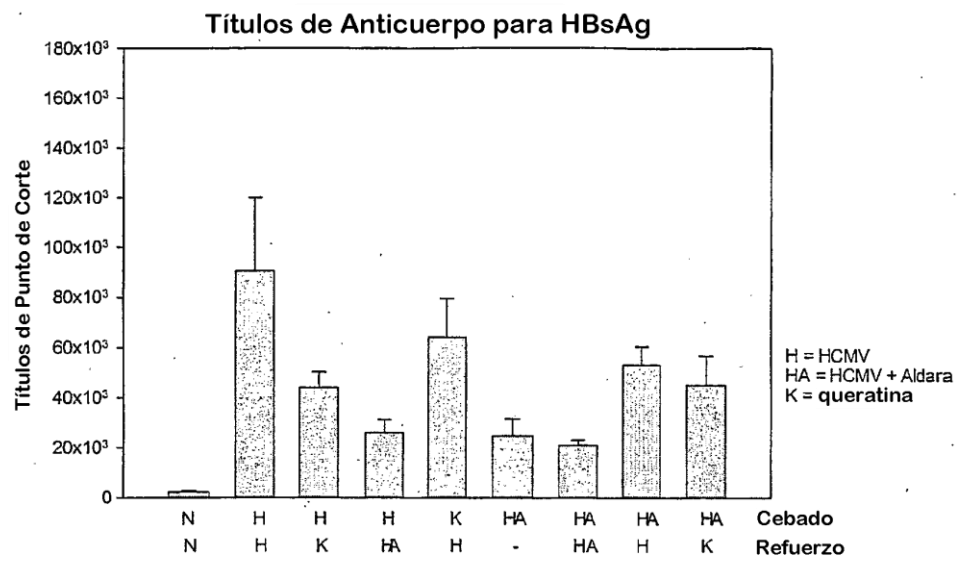


Figura 6

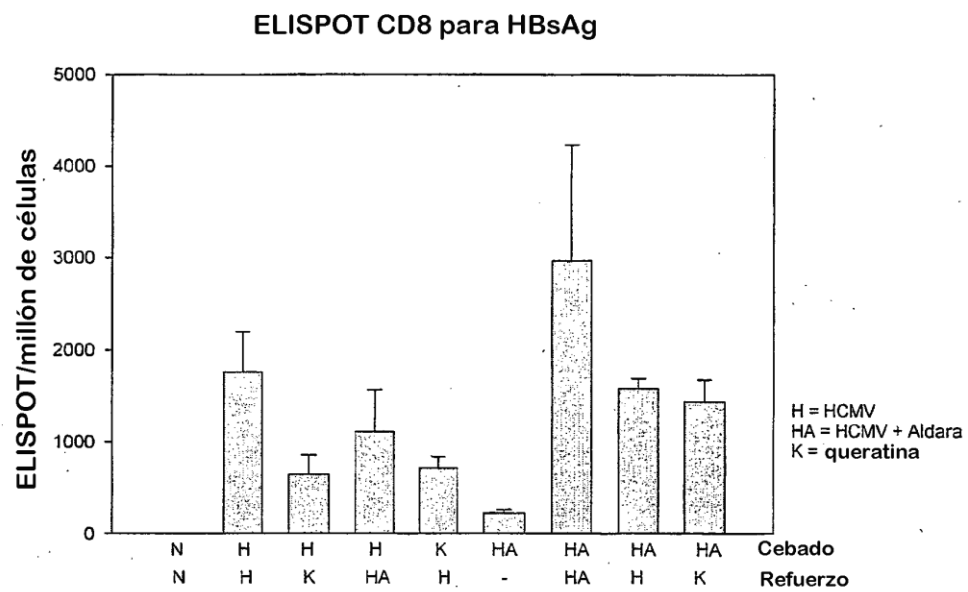


Figura 7

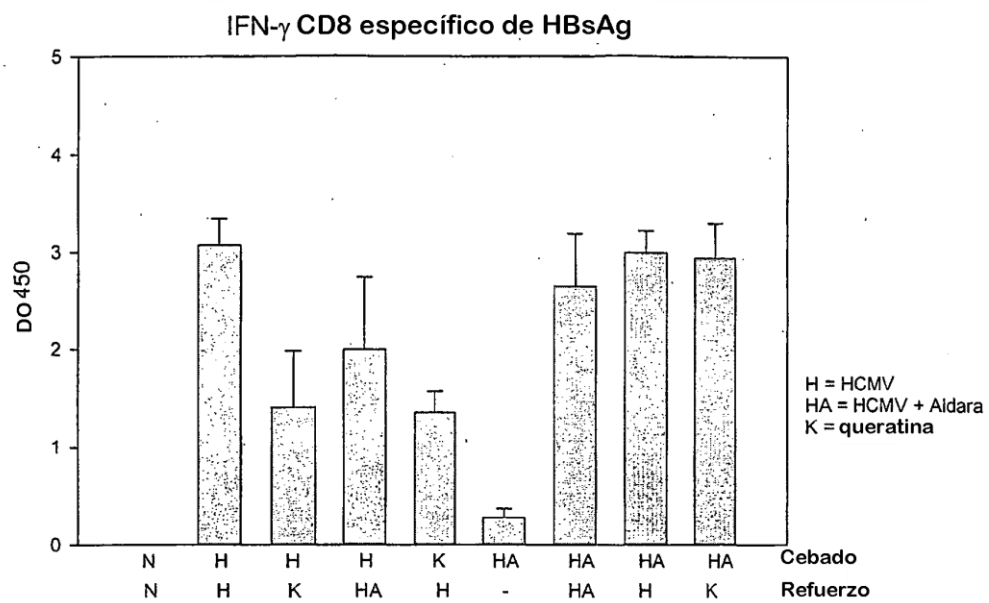


Figura 8

Secreción de IFN- γ en respuesta a HSV-2 inactivado con UV

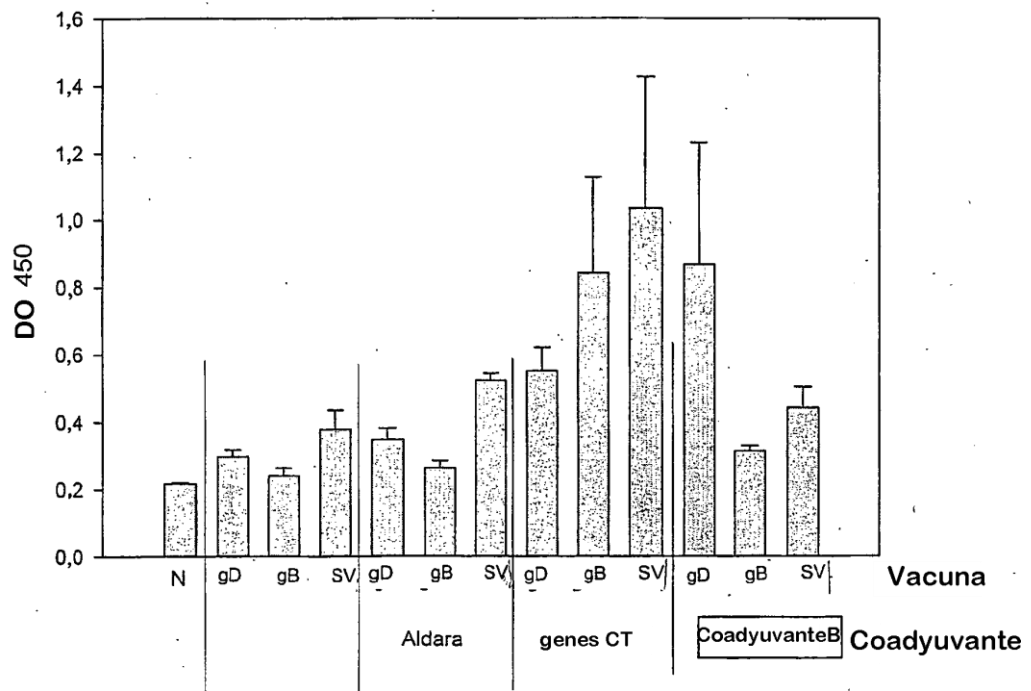


Figura 9

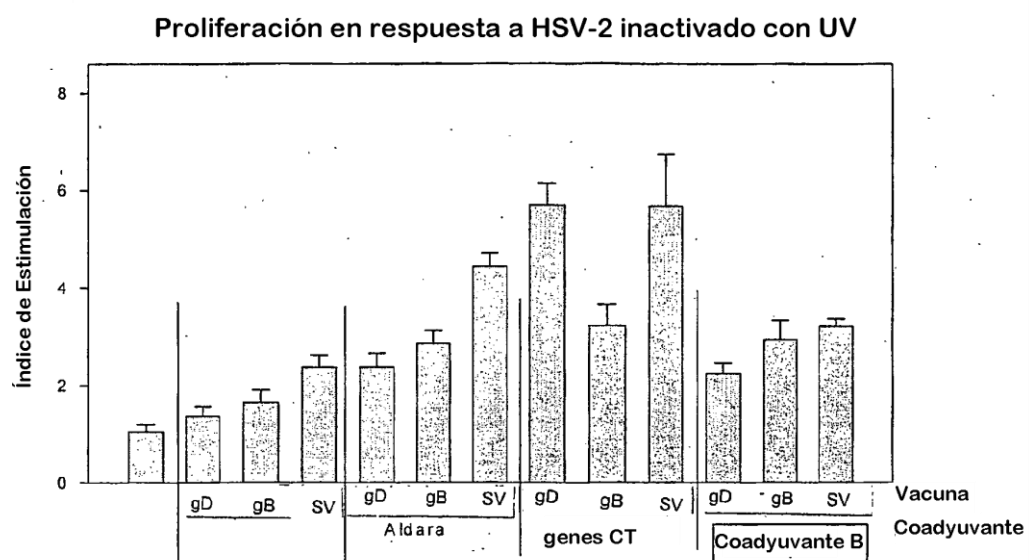


Figura 10

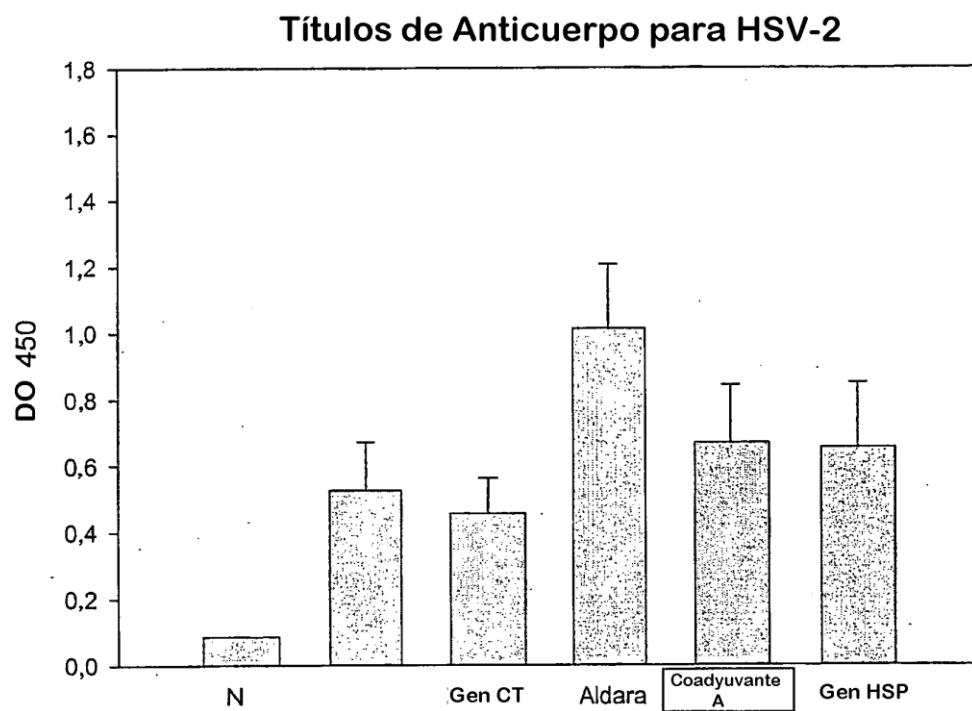


Figura 11

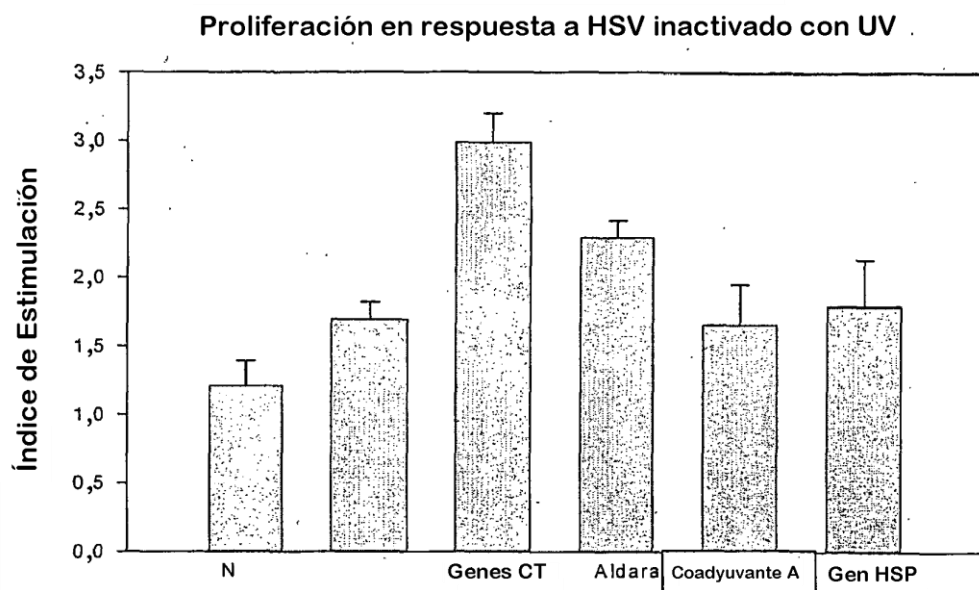


Figura 12

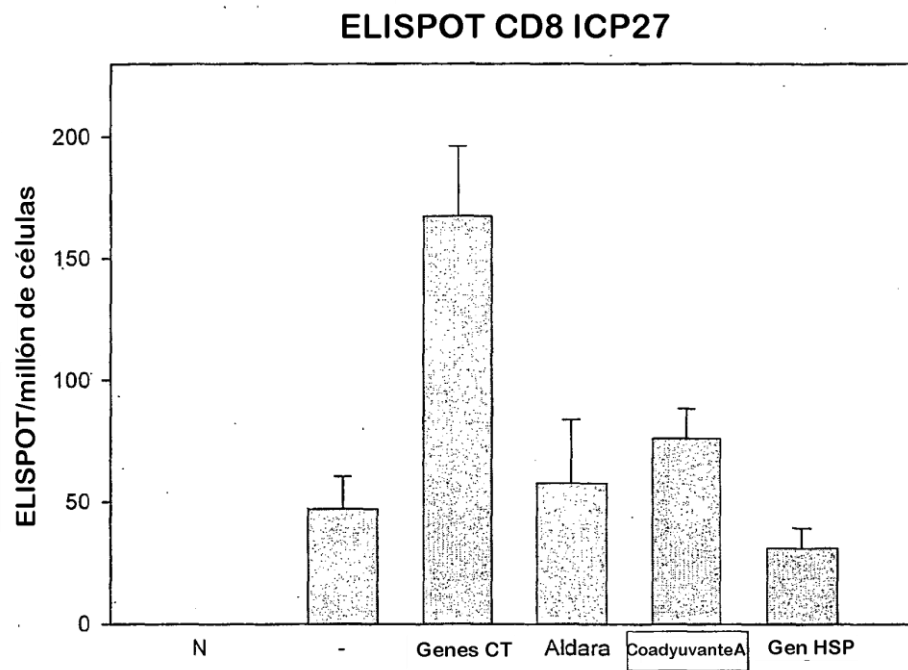


Figura 13

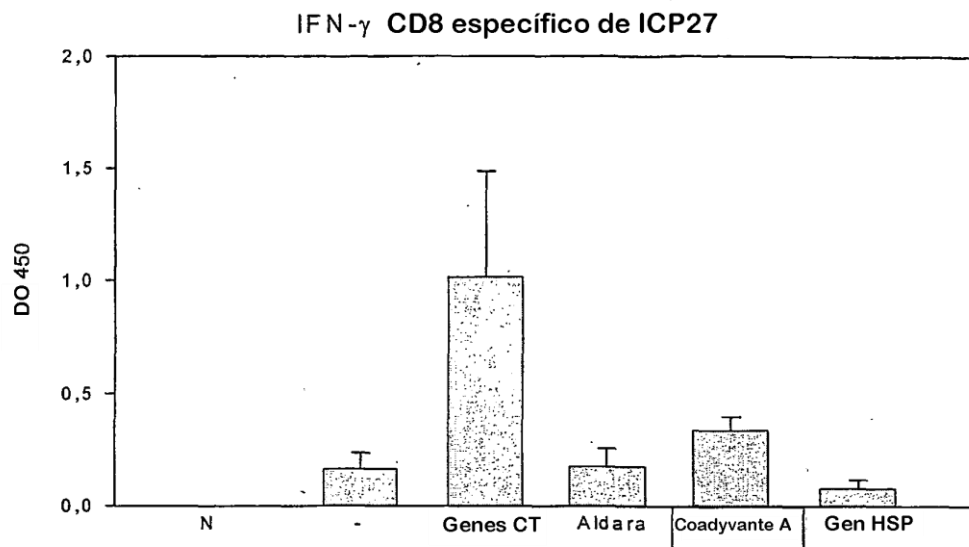


Figura 14

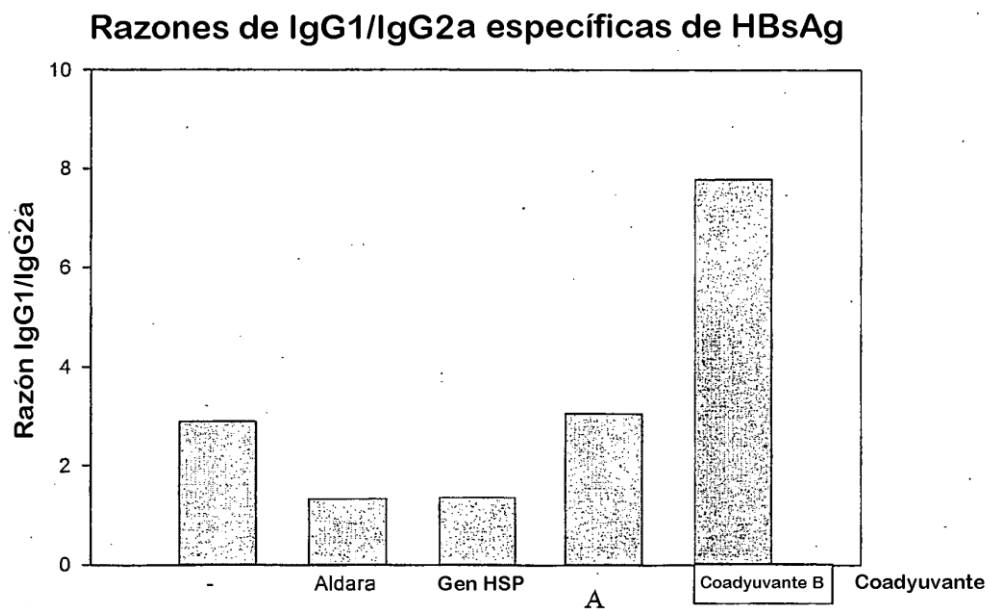


Figura 15

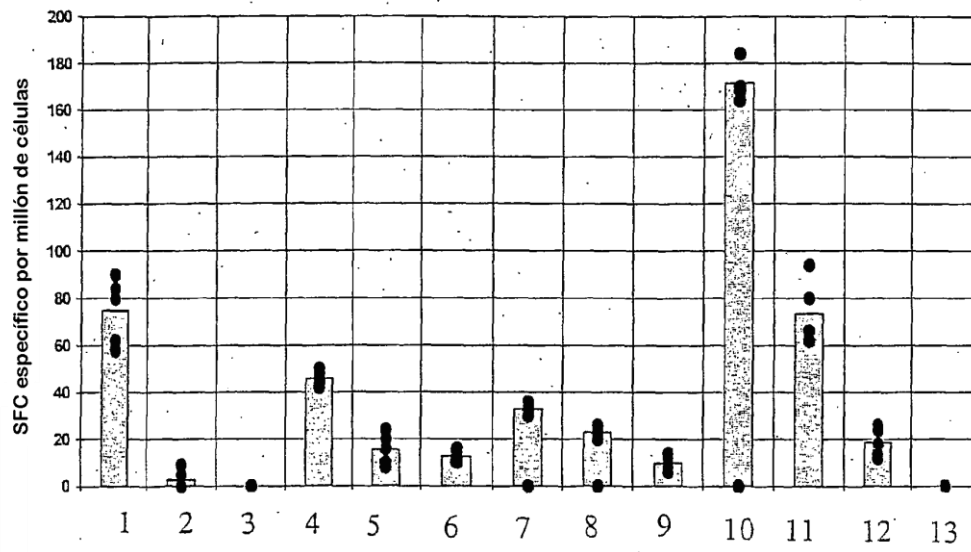


Figura 16

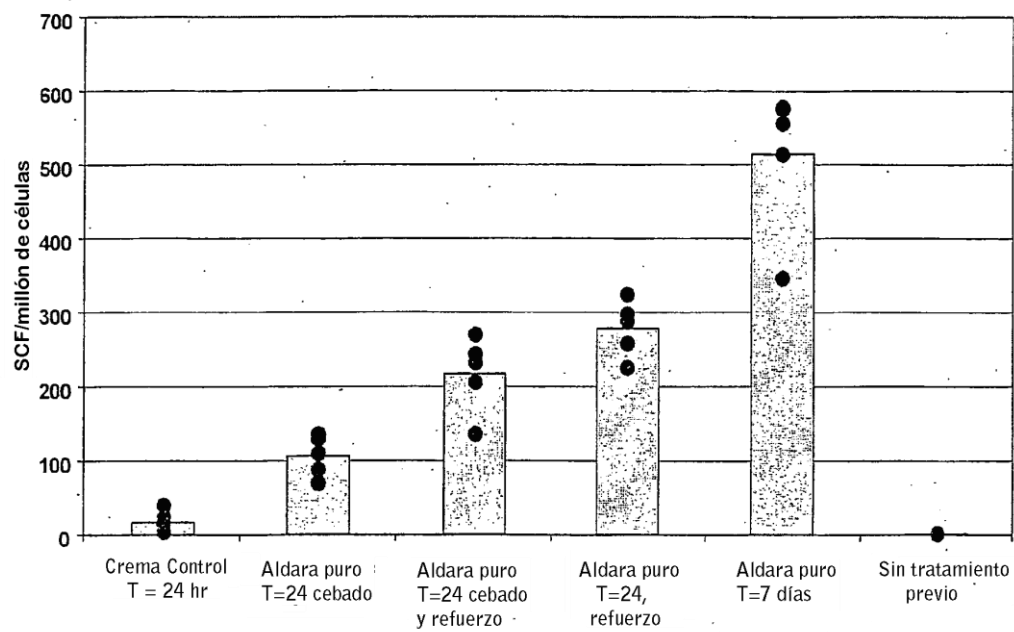


Figura 17