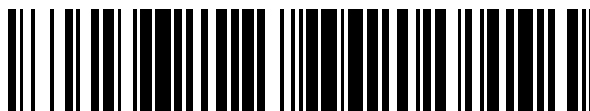


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 992**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/04** (2006.01)  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**A61K 38/14** (2006.01)  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 39/385** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03721571 .2**  
 96 Fecha de presentación: **09.04.2003**  
 97 Número de publicación de la solicitud: **1572918**  
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **GLUCOLIPOPÉPTIDOS SINTÉTICOS COMO VACUNAS.**

30 Prioridad:  
**15.04.2002 US 372105 P**  
**06.05.2002 US 377595 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.03.2012**

73 Titular/es:  
**ONCOTHYREON INC.**  
**2601 FOURTH AVENUE, SUITE 500**  
**SEATTLE, WA 98121, US**

72 Inventor/es:  
**KOGANTY, R., Rao;**  
**JIANG, Zi-Hua;**  
**YALAMATI, Damayanthi;**  
**GANDHI, Sham;**  
**BUDZYNSKI, Wladyslaw;**  
**KRANTZ, Mark, J. y**  
**LONGENECKER, B., Michael**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 375 992 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**

Glucolipopéptidos sintéticos como vacunas.

5 La presente solicitud es una solicitud no provisional de Koganty *et al.*, con número de serie 60/372.105, presentada el 15 de abril de 2002, número de expediente KOGANTY4-USA, y de la solicitud con número de serie 60/377.595, presentada el 6 de mayo de 2002 (KOGANTY4.1-USA).

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

10 Jiang, *et al.*, PCT/US00/31281, presentada el 15 de noviembre de 2000 (nuestro expediente JIANG3A-PCT).

Longenecker *et al.*, 08/229.606, presentada el 12 de abril de 1994 (nuestro expediente LONGENECKER5-USA), y PCT/US95/04540, presentada el 12 de abril de 1995 (nuestro expediente LONGENECKER5-PCT).

15 Wong, USP 6, 013, 779.

Budzynski *et al.*, 60/278.698, presentada el 27 de marzo de 2001, y PCT/IB02/02188, presentada el 27 de marzo de 2002, "Vaccine for modulating between T1 and T2 immune responses".

20 **Antecedentes de la invención**

**Campo de la invención**

25 La presente invención se refiere a inmunoterapia y diagnóstico. Particularmente, se refiere a la utilización de glucolipopéptidos sintéticos novedosos como vacuna contra cánceres y patógenos que presentan epítomos de reactividad cruzada. En una forma marcada o inmovilizada, los glucolipopéptidos también se pueden utilizar como reactivos de diagnóstico.

30 **Descripción de los antecedentes de la invención**

*Sistema inmunitario.*

35 La capacidad de los vertebrados de protegerse contra microbios infecciosos, toxinas, virus u otras macromoléculas extrañas se conoce como inmunidad. La técnica distingue entre inmunidad natural e inmunidad adquirida o específica (Abbas *et al.*, Cellular and Molecular Immunology, W. B. Saunders Company, 1991; Hood *et al.*, Immunology, 2ª edición, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1984).

40 La inmunidad natural consiste en mecanismos de defensa que ya están activos antes de la exposición a los microbios o macromoléculas extrañas, que no se potencian como consecuencia de dicha exposición y que no hacen distinciones entre la mayoría de sustancias extrañas al organismo. Los efectores de la inmunidad natural son barreras físicas como la piel o las membranas mucosas, células fagocíticas como los macrófagos o los neutrófilos, un tipo de linfocitos denominados linfocitos citolíticos naturales y el sistema del complemento. El complemento es un complejo de proteínas del suero que actúa destructivamente contra algunas bacterias y otras células sensibilizadas por anticuerpos específicos fijadores del complemento; su actividad se desarrolla mediante una serie de interacciones que provocan escisiones proteolíticas y que pueden tener lugar por lo menos a través de dos rutas (Illustrated Stedman's Medical Dictionary, 24ª edición, Williams and Wilkins, Baltimore/Londres, 1982).

50 La inmunidad específica o adquirida comprende mecanismos de defensa inducidos o estimulados por la exposición a sustancias extrañas.

55 En los vertebrados, los mecanismos de inmunidad natural y de inmunidad específica colaboran dentro de un sistema de defensas del huésped, el sistema inmunitario, a fin de eliminar los invasores externos. Además de microbios, células cancerosas, parásitos y células infectadas por virus, el sistema inmunitario también reconoce y elimina células o tejidos trasplantados a un receptor procedentes de un individuo genéticamente diferente de la misma especie (aloinjertos) o de una especie diferente (xenoinjertos).

60 Los acontecimientos a través de los cuales los mecanismos de inmunidad específica se involucran en la defensa frente a microorganismos invasores, células cancerosas, etc., se denominan respuesta inmunitaria. Los vertebrados presentan dos respuestas inmunitarias básicas: la humoral y la celular. La inmunidad humoral viene proporcionada por los linfocitos B, que, tras su proliferación y diferenciación, producen anticuerpos que circulan por el flujo sanguíneo y la linfa. La inmunidad celular viene proporcionada por los linfocitos T del sistema linfático. La respuesta inmunitaria celular es particularmente eficaz contra hongos, parásitos, infecciones víricas intracelulares, células cancerosas y cuerpos extraños, mientras que la respuesta humoral actúa principalmente contra las fases extracelulares de las infecciones bacterianas y víricas.

Un "antígeno" es una sustancia que es reconocida (mediante un enlace específico) por un anticuerpo o un receptor de linfocitos T, independientemente de si puede inducir una respuesta inmunitaria. Las sustancias extrañas que inducen inmunidad específica se denominan "antígenos inmunizantes" o "inmunógenos". Un "hapteno" es un antígeno que, por sí mismo, no puede desencadenar ninguna respuesta inmunitaria (aunque un conjugado de varias moléculas de dicho hapteno, o del hapteno con un portador macromolecular, sí pueda hacerlo). Dado que la presente solicitud se refiere a la inducción de una respuesta inmunitaria, en lo sucesivo el término "antígeno" se refiere, a menos que se indique lo contrario, a antígenos inmunizantes.

El desarrollo temporal de una respuesta inmunitaria se divide en la fase cognitiva, en la que los linfocitos específicos reconocen el antígeno extraño; la fase de activación, en la que dichos linfocitos específicos responden a dicho antígeno extraño; y la fase efectora, en la que los linfocitos activados por el antígeno intervienen en los procesos necesarios para eliminarlo. Los linfocitos son células inmunitarias especializadas en la mediación y el control de las respuestas inmunitarias específicas (Abbas *et al.*, *loc. cit.*; Hood *et al.*, *loc. cit.*).

El sistema inmunitario ha evolucionado de tal modo que es capaz de reconocer características superficiales de las macromoléculas que no son constituyentes normales del huésped. Una molécula extraña que es reconocida por el sistema inmunitario (por ejemplo, enlazándose a anticuerpos) se denomina "antígeno" independientemente de si puede provocar una respuesta inmunitaria o no, y la parte del antígeno a la cual se enlaza un anticuerpo se denomina "determinante antigénico" o "epítipo". Cuando el antígeno es un polipéptido, se suelen clasificar los epítipos como lineales (es decir, compuestos por una secuencia contigua de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica) o no lineales (es decir, compuestos por aminoácidos próximos entre sí como resultado del plegamiento de la cadena polipeptídica). (Los epítipos no lineales también se denominan "conformacionales", ya que se originan por el plegamiento de la cadena polipeptídica hasta que esta alcanza una determinada conformación.)

Para poder hacer frente a la enorme variedad de epítipos existentes, el sistema inmunitario de un mamífero contiene un repertorio extremadamente extenso de linfocitos. Cada clon de linfocito de dicho repertorio contiene receptores de superficie específicos para un epítipo. Se calcula que el sistema inmunitario de los mamíferos es capaz de distinguir, por lo menos,  $10^8$  determinantes antigénicos distintos (Abbas *et al.*, *loc. cit.*, pág. 8).

Una respuesta inmunitaria inicial o primaria a un antígeno extraño aumenta la capacidad del sistema inmunitario de responder nuevamente a ese mismo antígeno (en una respuesta inmunitaria secundaria). Esta característica de la inmunidad específica se denomina memoria inmunológica. A menudo, las respuestas inmunitarias secundarias son más eficaces que las primarias.

Los linfocitos de un individuo responden específicamente a los antígenos extraños, pero por lo general no responden a las sustancias potencialmente antigénicas nativas de dicho individuo. La ausencia de respuesta inmunitaria se denomina tolerancia. La autotolerancia se adquiere en una etapa temprana del desarrollo, cuando los linfocitos susceptibles de llevar a cabo el autorreconocimiento entran en contacto con los antígenos propios y se les impide desarrollarse hasta una etapa en la que podrían responder positivamente a dichos antígenos propios (Abbas *et al.*, *loc. cit.*).

Los linfocitos son los agentes de especificidad antigénica de la respuesta inmunitaria. Se dividen en dos grupos. Uno de estos grupos, compuesto por los "linfocitos B" o "células B", desempeña un papel central en la producción de anticuerpos. Los anticuerpos (inmunoglobulinas o Ig) son proteínas capaces de enlazarse a antígenos y ejercer funciones efectoras que participan en la eliminación de los antígenos extraños. El otro grupo está formado por los linfocitos T o células T, que llevan a cabo diversas funciones, entre las que se incluyen funciones auxiliares de los linfocitos B, la producción de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado y la eliminación específica de células infectadas por virus (Bjorkman *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 253, 1990).

Normalmente, las respuestas inmunitarias progresan hacia mecanismos efectoras característicos tanto de los linfocitos B como de los linfocitos T. Sin embargo, en el transcurso de muchas respuestas inmunitarias, los linfocitos B o los linfocitos T asumen un papel dominante y se da una participación menos significativa del otro tipo de linfocitos. Las respuestas inmunitarias cuyos mecanismos efectoras están mediados principalmente por linfocitos B y anticuerpos se denominan respuestas inmunitarias humorales. Las respuestas en las que los linfocitos T participan en las funciones efectoras más importantes se denominan respuestas inmunitarias mediadas por células o celulares.

Los linfocitos B constituyen la población de linfocitos esencial en las respuestas inmunitarias humorales. Los clones de linfocitos B expresan inmunoglobulinas de membrana (Ig de membrana, moléculas de anticuerpos unidas a la membrana) que funcionan como receptores antigénicos con un único epítipo específico para cada clon de linfocito B. Dichas moléculas de Ig de membrana (receptores antigénicos) son la única fuente de la especificidad de los linfocitos B (Bjorkman *et al.*, *loc. cit.*). Los antígenos que contienen un epítipo complementario a la Ig de membrana se unen al receptor antigénico. Dichos antígenos se denominan asimismo antígenos afines al anticuerpo. En los antígenos proteínicos, los anticuerpos pueden unirse a determinantes lineales (epítipos formados por residuos aminoácidos adyacentes en la secuencia covalente) o a determinantes conformacionales, que están formados por residuos aminoácidos procedentes de partes separadas del polipéptido lineal que se yuxtaponen de forma específica por plegamiento del polipéptido (Abbas *et al.*, *loc. cit.*). La unión al receptor antigénico (Ig de membrana) da lugar a

la diferenciación y la proliferación clonal del linfocito B. Algunos de sus descendientes se diferencian en células plasmáticas maduras, especializadas en la síntesis de anticuerpos que se corresponden en especificidad de epítipo a la Ig de membrana por la que el linfocito B se ha enlazado inicialmente al antígeno.

5 Por un mecanismo efector típico de las respuestas inmunitarias humorales, los anticuerpos se unen a epítopos afines de la superficie de las células invasoras diana, por ejemplo bacterias. Tras el enlazamiento de los anticuerpos, los componentes del sistema del complemento se unen al complejo célula diana-anticuerpo, lo que en último término provoca la ruptura de la membrana de la célula diana y la destrucción de la misma. Mediante otro mecanismo efector mediado por anticuerpos, los antígenos diana son enlazados y recubiertos (opsonizados) por los anticuerpos y, de este modo, se preparan para su digestión y posterior destrucción por parte de los fagocitos de origen reticuloendotelial, tales como granulocitos o macrófagos.

15 El propio anticuerpo es una molécula oligomérica que se clasifica, según su estructura, en una clase (por ejemplo, IgG) y una subclase (por ejemplo, IgG). Las moléculas de IgG son el componente más importante de la respuesta inmunitaria humoral y están compuestas por dos cadenas pesadas (largas) y dos ligeras (cortas) unidas por puentes disulfuro en una configuración de "Y". La molécula presenta dos regiones variables (en los brazos de la "Y") y una región constante (la bifurcación y base de la "Y"). Estas regiones se denominan así porque los anticuerpos de una determinada subclase, producidos por un determinado individuo como respuesta a antígenos diferentes, difieren en su región variable, pero no en la constante. A su vez, las regiones variables están compuestas por una estructura relativamente invariable y unos bucles hipervariables que confieren al anticuerpo su especificidad para un determinado epítipo. Un anticuerpo se une a un epítipo de un antígeno como resultado de su complementariedad molecular. La región del anticuerpo que participa directamente en la interacción se denomina "lugar de unión al antígeno" o "paratopo". Los antígenos a los que se une un determinado anticuerpo se denominan sus "antígenos afines".

25 Un anticuerpo de un animal es considerado como un antígeno extraño por el sistema inmunitario de otro animal, y por lo tanto desencadena una respuesta inmunitaria. Algunos de los anticuerpos resultantes son específicos para los epítopos únicos (idiotipos) de la región variable del anticuerpo inmunizante, por lo que se denominan anticuerpos antiidiotípicos. A menudo estos anticuerpos tienen características inmunitarias parecidas a las de un antígeno afín al anticuerpo inmunizante. Los anticuerpos antiisotípicos, en cambio, se unen a epítopos de la región constante del antígeno inmunizante.

35 La fase efectora típica de la respuesta inmunitaria mediada por células o celular comprende la lisis o destrucción de las células diana por parte de linfocitos T citotóxicos o citolíticos (CTL) mediante el contacto directo entre célula y célula. Las moléculas de dos familias diferentes de glucoproteínas de la superficie celular, los receptores de los linfocitos T (TCR) y las glucoproteínas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) son los elementos clave de la especificidad de la respuesta de los CTL a los antígenos extraños. Los receptores de los linfocitos T (TCR) reconocen determinantes peptídicos cortos lineales de 8-24 aminoácidos, cuya generación suele requerir el despliegue y la fragmentación proteolítica ("procesamiento") de la proteína antigénica (Allen, *Immunology Today*, 8, 270, 1987; Unanue *et al.*, *Science*, 236, 551, 1987; Bjorkman *et al.*, *loc. cit.*; Braciale *et al.*, *Immunol. Rev.*, 98, 95, 1987; Unanue, *Annu. Rev. Immunol.* 2, 395, 1984; Ziegler *et al.*, *J. Immunol.*, 127, 1869, 1981; Shimonkevitz *et al.*, *J. Exp. Med.*, 158, 303, 1983; Zweerink *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 7, 630, 1977). También pueden reconocer determinantes oligosacáridos. (Henningsson *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 25, 231, 1989; Fung *et al.*, *Cancer Res.*, 50, 4308, 1990). A diferencia de los anticuerpos, los receptores de los linfocitos T no pueden reconocer epítopos conformacionales.

50 La segunda diferencia en el reconocimiento de antígenos por parte de los anticuerpos y los receptores de los linfocitos T es la participación de una tercera molécula que desempeña la función de presentar el antígeno al receptor de los linfocitos T. En los linfocitos B, estas moléculas no resultan necesarias, ya que la Ig de membrana (anticuerpo) forma un complejo bimolecular estable con la proteína antigénica. En los linfocitos T, el péptido antigénico debe estar enlazado por una glucoproteína de MHC, y es este complejo de molécula de MHC más péptido el que forma la estructura reconocida por el receptor de los linfocitos T. De este modo, las glucoproteínas de MHC son proteínas enlazadoras de péptidos que funcionan como moléculas presentadoras de antígenos (Bjorkman *et al.*, *loc. cit.*).

55 Los linfocitos T citotóxicos, en tanto que células efectoras principales de la respuesta inmunitaria mediada por células, reconocen péptidos unidos a proteínas de MHC de clase I y son capaces de destruir células infectadas por virus y células cancerosas (Zinkernagel *et al.*, *Nature*, 248, 701, 1974; Rouse *et al.*, *Rev. Infect. Dis.*, 10, 16, 1988; Lukacher *et al.*, *J. Exp. Med.*, 160, 814, 1984; McMichael *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 309, 13, 1983; Wraith *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 68, 433, 1987; Cerundolo *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 17, 173, 1987; Kast *et al.*, *Cell*, 59, 603, 1989). Generalmente, los CTL expresan un marcador de superficie celular llamado CD8 (Abbas *et al.*, *loc. cit.*, pág. 310). La designación CD se refiere a un sistema de nomenclatura de los marcadores de superficie celular según el cual un marcador de superficie característico de un linaje celular o de la etapa de diferenciación que tiene una estructura definida y es reconocido por un grupo ("cluster") de anticuerpos monoclonales se denomina miembro de un *cluster* de diferenciación (CD; Abbas *et al.*, *loc. cit.*, pp. 19; 398-401).

Otro grupo importante de linfocitos T no expresa generalmente CD8 y sí el marcador CD4. Estos linfocitos T participan en las fases cognitiva y de activación tanto de la respuesta inmunitaria humoral como de la mediada por células, y se denominan linfocitos T auxiliares. Estos linfocitos T auxiliares reconocen, a través de sus receptores de linfocitos T, los antígenos extraños unidos a moléculas de MHC de clase II presentes en la superficie de células accesorias como los fagocitos mononucleares (macrófagos), las células dendríticas foliculares del bazo y los ganglios linfáticos, las células de Langerhans de la epidermis o las células endoteliales venulares (Abbas *et al.*, loc. cit., pág. 122-3).

Dos subgrupos distintos de linfocitos T auxiliares, denominados T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2, dirigen el sistema inmunitario hacia un tipo de respuesta mayoritariamente mediada por células o mayoritariamente humoral, respectivamente (Mosmann *et al.*, Adv. Immunol., 46, 111, 1989). Las células T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 se clasifican según sus diferentes funciones y según el conjunto de mediadores inmunitarios (citocinas) que producen. En general, las células T<sub>H</sub>1 secretan interferón  $\gamma$  e interleucina 2 (IL-2), y participan en las respuestas inmunitarias mediadas por células tales como hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y la activación de los macrófagos. Las células T<sub>H</sub>2 producen interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10), y ayudan a los linfocitos B a generar una respuesta de anticuerpos (Mosmann *et al.*, J. Immunol., 136, 2348, 1986; Cherwinski *et al.*, J. Exp. Med., 166, 1229, 1987; Fiorentino *et al.*, J. Exp. Med. 170, 2081, 1989).

Se cree que la tendencia a predominar por parte de la respuesta inmunitaria mediada por células o de la respuesta humoral es una consecuencia de una regulación cruzada (Parish, Transplant. Rev., 13, 35, 1972; Mosmann, Ann. New York Acad. Sci., 628: 337, 1991). Según esta explicación, las células T<sub>H</sub>1 inhiben el desencadenamiento de la respuesta T<sub>H</sub>2, por ejemplo mediante la secreción de interferón  $\gamma$ . Análogamente, las células T<sub>H</sub>2 pueden inhibir la generación de respuestas T<sub>H</sub>1 mediante la producción de citocinas como la IL-4 y la IL-10 (Salk *et al.*, Science, 260, 1270, 1993).

#### *Inmunógenos tradicionales y no tradicionales*

Generalmente, en la naturaleza los inmunógenos tradicionales son macromoleculares y son absorbidos por células presentadoras de antígenos, tales como los macrófagos, para su procesamiento y presentación en el contexto de los complejos principales de histocompatibilidad de las proteínas conocidas como MHC de clase I y II. Sin embargo, dichos inmunógenos macromoleculares generan diversos tipos de respuestas inmunitarias inespecíficas debido al tamaño de la proteína, que contiene un gran número de epítomos que el sistema inmunitario puede reconocer para desarrollar respuestas inmunitarias. Un espectro tan amplio de respuestas puede no siempre resultar beneficioso, sobre todo en el caso de los antígenos propios, que son la diana principal en los cánceres y las enfermedades autoinmunitarias. Los antígenos cancerosos tienen muchas características comunes con los antígenos normales, por lo que puede ocurrir que la respuesta inmunitaria al antígeno canceroso reconozca también el antígeno normal.

Otro problema de los inmunógenos tradicionales se refiere a la manera de producirlos. La purificación del inmunógeno natural hasta alcanzar la homogeneidad puede resultar difícil y costosa. Si se conoce la secuencia de aminoácidos de un inmunógeno proteínico, el mismo se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. Sin embargo, puede resultar complicado alcanzar la misma glucosilación que en el inmunógeno natural, y la expresión de ADN recombinante no elimina por sí sola los contaminantes biológicos. Por ejemplo, una proteína producida por recombinación en células bacterianas debe separarse de las proteínas bacterianas. En consecuencia, siempre que sea posible, resulta preferente la utilización de péptidos en sustitución de los productos basados en proteínas enteras.

Por estos motivos, ha surgido interés en la utilización como vacuna de fragmentos de inmunógenos tradicionales. Es probable que estos fragmentos desencadenen una respuesta inmunitaria más específica, ya que presentan menos epítomos, y los péptidos se pueden producir por procedimientos sintéticos no biológicos.

Desgraciadamente, en general, las secuencias peptídicas pequeñas no desencadenan una respuesta inmunitaria humoral. Una solución consiste en unir químicamente pequeños haptenos peptídicos a una proteína portadora inmunógena, tal como la hemocianina de lapa californiana (KLH). Otra consiste en unir diversos haptenos a un núcleo de lisina ramificada a fin de formar una molécula inmunógena mayor, como en la denominada MAP-4. Tam, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 85: 5409-13 (1988). Una tercera solución consiste simplemente en unir de extremo a extremo un número suficiente de copias del epítomo de interés, con o sin un espaciador, a fin de crear un antígeno artificial lo suficientemente grande para que actúe como inmunógeno.

Los péptidos pequeños pueden desencadenar una respuesta inmunitaria celular, pero dicha respuesta se puede potenciar asociando primero los péptidos a células presentadoras de antígeno o a liposomas.

#### *Glucolipopéptidos*

Boons y colaboradores han descrito un compuesto que contiene un hidrato de carbono de L-glicero-D-mano-heptosa que actúa como epítomo B, la secuencia peptídica YAFKYARHANVGRNAFELFL (SEC ID n°: 1), que ha sido identificada como un lugar de reconocimiento restringido del MHC de clase II para los linfocitos T humanos y se

deriva de una proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis*, y el lipopéptido S-2-3 [dipalmitoiloxi]-(R/S)-propil-N-palmitoil-L-cisteína (Pam<sub>3</sub>Cys). Dicho hidrato de carbono está unido a través de un espaciador (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHCO-Gly-) a la Leu terminal de la secuencia anterior. El lipopéptido está unido a la Tyr terminal. El lipopéptido Pam<sub>3</sub>Cys es un activador muy potente de los linfocitos B y los macrófagos derivado de la secuencia aminoterminal inmutariamente activa de la lipoproteína principal de *Escherichia coli* y se ha utilizado en el desarrollo de vacunas sintéticas basadas en péptidos y de vacunas contra el cáncer. Véase 128.192.9.100/boonsgroup/target.htm. Véase también Reichel, F. *et al.*, "Synthetic carbohydrate-based vaccines:synthesis of an L-glycero-D-manno-heptose antigen-T epitope-lipoptide conjugate", Chem. Commun., 2087-8 (1997).

En Toyokuni *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 116:395-96 (1994) se describe un conjugado de antígeno Tn dimérico y lipopéptido, concretamente, di-Tn acoplado a tripalmitoil-S-glicerilcisteinilserina (P<sub>3</sub>CS).

En Kudryashov *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 98:3264-9 (2001) se describen glucolipopéptidos con uno o tres pentasacáridos de Lewis Y unidos a residuos de serina de un heptapéptido terminado con un resto Pam<sub>3</sub>Cys.

#### Vacunas de lipopéptidos

El documento USP 5.019.383 de Hopp y la solicitud EP 93.851 dan a conocer el acoplamiento de un grupo lipófilo al terminal amínico de un péptido. El acoplamiento se produce a través de X, un grupo polifuncional que tiene de 3 a 5 grupos funcionales (preferentemente grupos carbonilo y amido), uno de los cuales por lo menos está enlazado al terminal amínico del péptido y otro de los cuales por lo menos está enlazado por lo menos a un grupo alquilo o alqueno C12-C36, que puede ser lineal o ramificado y sustituido o no sustituido.

El documento USP 5.837.249 de Heber-Katz (1998) y la solicitud EP 203.676 (1986) describen una vacuna que consiste en un conjugado de péptido y ácido graso. El péptido comprende un epitopo vírico. En una forma de realización, un espaciador Lys-Gly-Gly está unido al extremo aminoterminal del epitopo vírico y los grupos de ácido graso (palmitoil) están unidos al extremo aminoterminal libre y al grupo amino en épsilon de la Lys terminal. El documento de Heber-Katz contempla además la administración de estos lipopéptidos como parte de un liposoma.

Los lipopéptidos han sido considerados asimismo en Boutillon, USP 6.015.564, USP 5.993.823, USP 5.871.746, EP 1.065.212, EP 945.461, EP 491.628. Los grupos lipófilos están unidos a los extremos aminoterminal y carboxiterminal de los péptidos. Véase también Martinon *et al.*, J. Immunol. 149:3416-22 (1992); Sauzet *et al.*, Vaccine, 13: 1339-45 (1995); Vitiello *et al.*, J. Clin. Invest., 95:341-9 (1995); Mortara *et al.*, J. Virol., 72:1403-10 (1998).

Se ha puesto de manifiesto que un antígeno lipopeptídico sintético (BLP25), H<sub>2</sub>N-STAPPAHGVTAPDTRPAPGSTAPPK(Pal)G-OH (figura 34, de Jiang *et al.*, PCT/US00/31281) (SEC ID n°: 11.), una secuencia modificada de 25 aminoácidos derivada de la mucina MUC1 asociada a tumores, induce respuestas T<sub>H</sub>1 contra MUC1.

#### Síntesis de péptidos, glucopéptidos y lipopéptidos

Existen dos estrategias básicas para la síntesis de oligómeros y polímeros, la síntesis secuencial y la síntesis en bloque. En la síntesis secuencial, se añade de golpe un monómero a un oligómero o polímero en crecimiento. En la síntesis en fase sólida, uno de los extremos de este último está fijado sobre un soporte en fase sólida. En la síntesis en solución, el oligómero o polímero en crecimiento se encuentra libre en la solución, pero los grupos protectores limitan los lugares en los que se puede unir el monómero.

La síntesis secuencial en fase sólida de péptidos y glucopéptidos grandes presenta dificultades en cuanto a la pureza y el rendimiento del producto final. El aumento del número de aminoácidos que se pretende acoplar de forma secuencial provoca un aumento exponencial del número de péptidos que se eliminan como impurezas. Dichas impurezas, que se forman como resultado de los "no acoplamientos", persisten hasta la siguiente etapa debido a que están unidas a la fase sólida. Con cada acoplamiento, incluso con un 98% de eficacia de acoplamiento, el número de eliminaciones (péptidos no acoplados o mal acoplados) aumenta en un factor de 2<sup>n</sup>, en el que n es el número de aminoácidos acoplados. De este modo, la síntesis de una secuencia de 20 aminoácidos da lugar a la formación de 2<sup>20</sup>, es decir, más de un millón de péptidos que se eliminan como impurezas, además de a la formación de un producto correcto. Aunque muchos de estos productos eliminados se forman en trazas no detectables, suman cantidades significativas y su eliminación supone un problema. La identificación y definición de estas impurezas es una tarea imposible, ya que muchas de ellas son muy parecidas al producto deseado. En la detección de grado clínico, la identificación y la cuantificación de las impurezas significativas son probablemente los requisitos normativos más importantes, y deben cumplirse con una significativa inversión de dinero y tiempo.

En la síntesis en bloque, dos o más bloques oligoméricos se condensan juntos a fin de formar el oligómero o polímero final. Los bloques se pueden aislar directamente de la naturaleza, derivarse por fragmentación de una molécula de origen natural, o sintetizarse. En este último caso, dichos bloques también se pueden haber preparado mediante síntesis en bloque o secuencial.

La síntesis en bloque fue utilizada de forma esporádica antes del desarrollo de la síntesis secuencial en fase sólida. Desde entonces, la síntesis secuencial en fase sólida ha recibido una atención mucho mayor y los procedimientos de acoplamiento en bloque prácticamente han desaparecido. Uno de los ejemplos más conocidos de acoplamiento en bloque es la síntesis de formil-metionil-corticotropina (For-Met-hACTH). Esta secuencia de 40 aminoácidos fue sintetizada con éxito en su forma pura por Yajima y colaboradores (Chem. Pharm. Bull., 30, 866 (1982); Chem. Pharm. Bull., 34, 4362, 1986). Chillemi *et al.* han sintetizado seis péptidos con un tamaño comprendido entre 8 y 15 aminoácidos mediante síntesis en solución (Int. J. Peptide Protein Res., 35, 271, 1990). Más recientemente, G-J. Boons ha sintetizado un conjugado químicamente enlazado de una tripalmitoil-cisteína adyuvante (Pam<sub>3</sub>Cys) derivada de *E. coli* y un epítipo de linfocitos T derivado de *Neisseria meningitidis* y ácido siálico, una estructura que se puede clasificar como glucolipopéptido. Hasta el momento, no se han documentado péptidos relacionados con la MUC1 de ningún tipo por síntesis en bloque. La síntesis en bloque satisface las necesidades de los péptidos y glucopéptidos complejos. Aunque la síntesis empieza lentamente, presenta unas ventajas en cuanto a síntesis a gran escala, pureza de los péptidos y control de calidad en cada etapa que se echan en falta en la síntesis en fase sólida.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere al diseño y la síntesis de glucolipopéptidos multiepitópicos y a sus aplicaciones como agentes inmunoterapéuticos. Estas moléculas son menores en tamaño que los inmunógenos tradicionales, tales como la mucina, pero están bien definidos estructuralmente. Estas estructuras están diseñadas para integrar características tales como epítipos de hidratos de carbono y peptídicos derivados de glucoproteínas de origen humano o patógeno y cadenas lipídicas que les permiten autoensamblarse para formar partículas grandes.

Alternativamente, estas estructuras se pueden incorporar en la membrana de un liposoma, convirtiéndose en elementos integrantes que participan en la construcción de dicha membrana liposómica. Una vez incorporadas, funcionan como un inmunógeno macromolecular. Estas estructuras relativamente pequeñas pero bien definidas se caracterizan por su capacidad de autoensamblarse formando partículas más grandes a la vez que mantienen los múltiples epítipos que se han integrado en estas pequeñas moléculas. Como inmunógeno, la pequeña molécula imita la glucosa macromolecular original a la vez que es muy específica en el desencadenamiento de respuestas inmunitarias terapéuticas.

Preferentemente, los glucolipopéptidos según la presente invención pueden desencadenar una respuesta inmunitaria tanto humoral como celular, siendo dicha respuesta humoral por lo menos a un componente de epítipo B, y dicha respuesta celular por lo menos a un componente de epítipo T (los epítipos B y T pueden ser idénticos o distintos). Preferentemente, la respuesta inmunitaria humoral y/o celular al glucolipopéptido protege por lo menos frente a una enfermedad.

La presente invención se refiere también a procedimientos en solución novedosos desarrollados para la síntesis de glucolipopéptidos, así como a la producción a gran escala de los mismos en una forma muy purificada. La síntesis en solución por etapas a través de bloques progresivos permite la preparación de glucolipopéptidos de complejidad y tamaño considerables de un modo muy controlado de principio a fin. Dicho control del procedimiento por etapas no es posible en los procedimientos en fase sólida que se aplican ampliamente en la preparación de productos farmacéuticos basados en péptidos.

Como prueba del principio de la presente invención, en el presente documento se describen el diseño, la síntesis y las respuestas inmunitarias de dos glucolipopéptidos (figuras 1 y 2). Estas estructuras se basan en la mucina MUC1 humana asociada a cáncer (véase la lista de abreviaturas de la tabla 2) e incorporan dos de los epítipos de hidratos de carbono (figura 3) que se consideran ampliamente asociados al cáncer.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: secuencia y estructura completas del glucolipopéptido 1a. La secuencia peptídica es la SEC ID n°: 2.

Figura 2: secuencia y estructura completas del glucolipopéptido 1b. La secuencia peptídica es la SEC ID n°: 2.

Figura 3: estructuras de los epítipos de hidratos de carbono habituales asociados a cáncer.

Figura 4: estructuras completas de serinas y treoninas glucosiladas en O para la síntesis de glucopéptidos.

Figura 5: análisis retrosintético y descomposición de los glucolipopéptidos 1a y 1b, secuencia peptídica SEC ID n°: 2.

Figura 6: bloques peptídicos finales (SEC ID n°: 2) y productos desglosados en bloques.

Figura 7: bloques primarios e intermedios que se utilizan en la secuencia de acoplamiento.

Todos los bloques de las figuras 6 y 7 tienen secuencias peptídicas que son subsecuencias de SEC ID nº: 2, tal como sigue: 3 (AA 1-20), 4 (AA 21-43), 5 (AA 1-11), 6 (AA 12-20), 7a, 7b (AA 21-31), 8 (AA 32-43), 9 (AA 1-5), 10 (AA 6-11), 11 (AA 21-25), 12 (AA 26-31), 13 (AA 32-40) y 14 (AA 41-43).

Figura 8: esquema de la síntesis del bloque lipídico 14.

Figura 9: esquema de la síntesis de los bloques lipídicos 6 y 13. APPAHGV es AA 14-20 de SEC ID nº: 2. PAHGV es AA 16-20 de SEC ID nº: 2. TAPPAHGV es AA 13-20 de SEC ID nº: 2. Los compuestos 6 y 13 se han descrito anteriormente.

Figura 10: esquema sintético del bloque 9, AA 1-5 de SEC ID nº: 2.

Figura 11: esquema sintético del bloque 11, AA 21-25 de SEC ID nº: 2.

Figura 12: esquema sintético de los bloques 10 (AA 6-11) y 12 (AA 26-31 de SEC ID nº: 2).

Figura 13: esquema que muestra la síntesis simultánea de los dos glucolipopéptidos 1 y 2 (SEC ID nº: 2) utilizando una estrategia convencional de bloques.

Figura 14: cromatograma de HPLC del glucolipopéptido 1a.

Figura 15: cromatograma de HPLC del glucolipopéptido 2b.

Figura 16: estructura del lípido A sintético utilizado en las formulaciones de liposomas.

Figura 17: proliferación de linfocitos T y respuestas de interferón g (IFN-g) en ratones C57B1/6 inmunizados con formulaciones de liposomas de los glucolipopéptidos 1 y 2.

Figura 18: proliferación de linfocitos T y respuestas de interferón g (IFN-g) en ratones transfectados con el gen de la MUC1 humana inmunizados con formulaciones de liposomas de los glucolipopéptidos 1 y 2.

Figura 19: ejemplos de aminoácidos lipidados en los que las cadenas lipídicas están unidas a las cadenas laterales de aminoácidos de origen natural.

Figura 20: más ejemplos de aminoácidos lipidados.

Las estructuras I y II representan ejemplos en los que los lípidos están unidos al extremo carboxílico o terminal C, mientras que las estructuras III y IV son ejemplos de lípidos unidos al extremo amino o terminal N. Las estructuras V y VI son aminoácidos no naturales lipidados. Las estructuras I y II están diseñadas para el terminal C, las estructuras III y IV para el terminal N y las estructuras V y VI se pueden situar en cualquier lugar de una secuencia peptídica.

Figura 21: ejemplos de antígenos carbohidratos asociados a cáncer. Estas estructuras de hidratos de carbono o sus estructuras parciales se pueden preparar como glucolipopéptidos para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

Figura 22: síntesis de bloques constructivos de liposerinas (VII, IX) y su aplicación para la preparación de péptidos y glucopéptidos lipidados por procedimientos de síntesis peptídica en solución y en fase sólida.

En las figuras y reivindicaciones, "R" se utiliza como un símbolo estándar para el residuo aminoácido arginina y como un grupo que indica una cadena lateral unida a un determinado residuo.

#### Descripción detallada de las formas de realización preferentes de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un glucolipopéptido de procedencia no natural que comprende por lo menos un aminoácido que es un aminoácido glucosilado y por lo menos un aminoácido que es un aminoácido lipidado, en el que por lo menos un aminoácido lipidado es un aminoácido interior, en el que dicho glucolipopéptido comprende por lo menos dos epítomos MUC1 con la secuencia de aminoácidos P(D/E)(T/S)RP, y en el que

i) como mínimo un epítomo MUC1 con la secuencia de aminoácidos P(D/E)(T/S)RP comprende por lo menos un aminoácido glucosilado, y

ii) como mínimo un epítomo MUC1 con la secuencia de aminoácidos P(D/E)(T/S)RP no comprende ningún aminoácido glucosilado, y

en el que la secuencia de aminoácidos de dichos epítomos MUC1 puede ser idéntica o diferente.



Otro aspecto de la presente invención se refiere al glucolipopéptido de la invención para su utilización como medicamento.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización del glucolipopéptido de la invención para la preparación de un medicamento destinado a inducir una respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al glucolipopéptido de la invención para su utilización en un procedimiento destinado a inducir una respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende un glucolipopéptido de la invención y un liposoma.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición de la invención para su utilización como medicamento.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de una composición de la invención para la preparación de un medicamento destinado a inducir una respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición de la invención para su utilización en un procedimiento destinado a inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

#### Glucolipopéptidos

25 Los glucolipopéptidos según la presente invención comprenden por lo menos cinco aminoácidos, por lo menos uno de ellos glucosilado y por lo menos uno de ellos lipidado.

30 Preferentemente, como mínimo dos aminoácidos son lipidados. Preferentemente, como mínimo un aminoácido lipidado es un aminoácido interior, es decir, no es el primer ni el último aminoácido del residuo peptídico. Más preferentemente, como mínimo dos aminoácidos lipidados son aminoácidos interiores. De la forma más preferente, todos los aminoácidos lipidados son aminoácidos interiores.

Preferentemente, como mínimo dos aminoácidos son glucosilados. Más preferentemente, hay como mínimo dos aminoácidos glucosilados y como mínimo dos aminoácidos lipidados.

35 Preferentemente, el glucolipopéptido comprende por lo menos un epítipo peptídico de MUC1, más preferentemente, PDTRP (AA 6-10 de SEC ID n°: 10). En este caso, el aminoácido lipidado puede ser un aminoácido terminal o un aminoácido interior. Si hay dos aminoácidos lipidados, pueden ser los dos terminales, los dos interiores, o puede haber uno de cada.

40 Preferentemente, como mínimo un aminoácido glucosilado proporciona como mínimo un epítipo de hidratos de carbono. Más preferentemente, como mínimo un epítipo de hidratos de carbono es Tn o sialil-Tn. Aún más preferentemente, se proporcionan tanto Tn sin sialilo como sialil-Tn (unidos a diferentes aminoácidos).

45 Preferentemente, no hay más de 200 aminoácidos, más preferentemente no más de 150 aminoácidos, aún más preferentemente no más de 100 aminoácidos, todavía más preferentemente no más de 75 aminoácidos y de la forma más preferente no más de 50 aminoácidos. En cuanto al peso molecular, preferentemente no tienen más de 20.000 daltons, más preferentemente no más de 15.000 daltons, aún más preferentemente no más de 10.000 daltons, todavía más preferentemente no más de 7.500 daltons y de la forma más preferente no más de 5.000 daltons.

50 Los glucolipopéptidos comprenden además por lo menos un epítipo asociado a una enfermedad que puede ser un epítipo de linfocitos B (reconocido por anticuerpos) o un epítipo de linfocitos T. Preferentemente, el epítipo es un epítipo asociado a una enfermedad, más preferentemente específico de una enfermedad. Son particularmente interesantes los epítipos asociados a tumores, particularmente los específicos de un tumor.

55 Preferentemente, los glucolipopéptidos comprenden por lo menos un epítipo de linfocitos B y por lo menos un epítipo de linfocitos T. Preferentemente, como mínimo un aminoácido glucosilado está incluido por lo menos en uno de dichos epítipos.

#### 60 Aminoácidos lipidados

65 El glucolipopéptido comprende, por definición, uno o más aminoácidos lipidados. Un aminoácido lipidado es un aminoácido que no es un aminoácido glucosilado y que comprende un grupo fuertemente lipófilo, tal como se define a continuación. De este modo, el glucolipopéptido puede ser un glucomonolipopéptido (un aminoácido lipidado), un glucodilipopéptido (dos aminoácidos lipidados), un glucotrilipopéptido (tres aminoácidos lipidados), etc.

Preferentemente, como mínimo dos de los aminoácidos son aminoácidos lipidados. Aún más preferentemente, exactamente dos aminoácidos son aminoácidos lipidados.

5 Si se trata de un alfa-aminoácido lipidado interior, la cadena lateral comprende el grupo fuertemente lipófilo. Si se trata de un alfa-aminoácido lipidado terminal, la cadena lateral o el resto terminal, o ambos, pueden comprender un grupo fuertemente lipófilo.

10 Si el aminoácido no es un alfa-aminoácido, puede comprender más de una cadena lateral, en cuyo caso es posible que más de una cadena lateral del mismo aminoácido comprenda un grupo fuertemente lipófilo.

En una forma de realización preferente, si una cadena lateral comprende un grupo fuertemente lipófilo, la propia cadena lateral se puede considerar un grupo fuertemente lipófilo.

15 El aminoácido lipidado puede ser un derivado de uno de los veinte aminoácidos codificados genéticamente, caracterizándose dicho derivado por una cadena lateral lipitada, sobre todo como sigue:

AA lipidado	Cadena lateral lipitada
Ser	-CH <sub>2</sub> OZ
Thr	-CH (CH <sub>3</sub> ) OZ
Asp	-CH <sub>2</sub> -C(=O) OZ
Glu	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -C(=O) OZ
Cys	-CH <sub>2</sub> SZ
Tyr	-CH <sub>2</sub> -Phenyl-OZ
Lys	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHZ
Arg	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-C(=NH)-NHZ
Asn	-CH <sub>2</sub> -C(=O)-NHZ
Gln	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -C(=O)-NHZ

20 donde Z es un grupo fuertemente lipófilo. (Por supuesto, el propio aminoácido lipidado resultante es en sí mismo un aminoácido no codificado genéticamente.)

Por otro lado, el aminoácido lipidado también se puede caracterizar por una cadena lateral lipitada derivada de la cadena lateral de un aminoácido no codificado genéticamente. Este puede ser un homólogo u otro tipo de análogo de un aminoácido codificado genéticamente. De este modo, la cadena lateral puede ser, por ejemplo:

25 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>OR, m > 1 (derivado de Ser, Thr)

- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>SR, m > 1 (derivado de Cys)

30 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NHR, m ≠ 4 (derivado de Lys)

- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)NHR, m > 2 (derivado de Asn, Gln)

- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)OR, m > 2 (derivado de Asp, Glu)

35 Un aminoácido terminal se puede caracterizar alternativa o adicionalmente por un extremo amínico lipidado, si se trata de un residuo aminoterminal (R-NH-AA), o un extremo carboxílico lipidado, si se trata de un residuo carboxiterminal (AA-C(=O)-OR).

40 Las cadenas laterales de los aminoácidos codificados genéticamente se pueden clasificar como lipófilas (hidrófobas), lipófobas (hidrófilas) o neutras. La lipofilia de estas cadenas laterales, así como de las cadenas laterales de los aminoácidos no codificados genéticamente, se puede determinar midiendo el coeficiente de reparto de la molécula HZ (donde Z es la cadena lateral en cuestión) entre un disolvente apolar (por ejemplo, etanol, dioxano, acetona, benceno, n-octanol) y el agua, en condiciones normales de presión y temperatura. La lipofilia se puede definir como el logaritmo de este coeficiente de reparto; por lo tanto, es positivo para las moléculas que prefieren el disolvente apolar. De este modo, un grupo lipófilo es aquel para el cual el valor de log P es mayor que

45 cero.

El coeficiente de reparto (P) se define como el cociente entre las concentraciones en equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema de dos fases que consta de dos disolventes mayoritariamente inmiscibles. Un sistema de este tipo es n-octanol:agua; la fase de octanol contiene aproximadamente el 20% de agua y la fase acuosa aproximadamente el 0,008% de octanol. Así, el coeficiente de partición correspondiente (Pow) es el cociente entre la concentración molar del soluto en octanol saturado de agua y su concentración molar en agua saturada de octanol.

50

El n-octanol es un sustituto útil de las membranas biológicas, ya que, al igual que muchos componentes de estas, es anfífilo. (En lo sucesivo, a menos que se indique lo contrario, toda referencia a log P se refiere a log Pow.)

5 A los efectos de la presente descripción, un grupo fuertemente lipófilo se define como un grupo que comprende por lo menos cinco átomos distintos del hidrógeno para el que la lipofilia calculada como logaritmo del coeficiente de reparto n-octanol:agua por cualquiera de los tres procedimientos (A) – (C) reconocidos en la técnica y descritos a continuación es mayor que el calculado para cualquiera de las cadenas laterales de los aminoácidos codificados genéticamente (en lo sucesivo denominadas cadenas laterales de referencia). Los aminoácidos codificados genéticamente con cadenas laterales lipófilas son los aminoácidos alifáticos alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina, y los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina.

10 De la definición de “fuertemente lipófilo” se desprende que los glucolipopéptidos según la presente invención deben comprender por lo menos un aminoácido no codificado genéticamente, por ejemplo, una serina o una treonina lipidadas.

15 En una forma de realización, el grupo en cuestión es más lipófilo que cualquiera de las cadenas laterales de referencia cuando su lipofilia, y la de las cadenas laterales de referencia, se determinan según el siguiente procedimiento (A).

20 En una segunda forma de realización, el grupo en cuestión es más lipófilo que cualquiera de las cadenas laterales de referencia cuando su lipofilia, y la de las cadenas laterales de referencia, se determinan según el siguiente procedimiento (B).

25 En una tercera forma de realización, el grupo en cuestión es más lipófilo que cualquiera de las cadenas laterales de referencia cuando su lipofilia, y la de las cadenas laterales de referencia, se determinan según el siguiente procedimiento (C).

Los procedimientos (A) - (C) se definen este modo:

30 (A) para valores predichos de log Pow comprendidos entre 0 y 4, el procedimiento del frasco de agitación establecido en las directrices OPPTS 830.7550 EPA 712-c-96-038 (agosto de 1996) de la Agencia Norteamericana de Protección del Medio Ambiente (EPA). (Cabe tener en cuenta que los valores de log Pow negativos indican que el compuesto no es lipófilo en absoluto.)

35 (B) para valores predichos de log Pow comprendidos entre 4 y 6, el procedimiento de estimación por cromatografía líquida establecido en las directrices OPP13 830.7570, EPA 712-C-96-040 (agosto de 1996) de la EPA. (Este procedimiento se puede utilizar para estimar valores de Pow comprendidos entre 0 y 6.)

40 (C) para valores predichos de log Pow mayores de 6, el procedimiento de predicción descrito en Meylan *et al.*, “Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients”, J. Pharm. Sci., 84: 83-92 (1995). (Cabe tener en cuenta que si los valores predichos de log Pow son mayores de 6, resulta necesaria una determinación experimental).

45 En el procedimiento de Meylan, el valor predicho de log Pow se obtiene sumando los coeficientes ponderados para cada fragmento (el coeficiente individual multiplicado por el número de copias de ese fragmento) a la constante 0,2290. Entre los fragmentos considerados se incluyen: -CH<sub>3</sub> (0,5473), -CH<sub>2</sub>- (0,4911), -CH (0,3614), -OH (-1,4086), -NH<sub>2</sub> (-1,4148), -C(=O)N (-0,5236), -SH (-0,0001), -NH- (-1,4962), -N=C (-0,0010), -O- (-1,2566), aldehído -CHO (-0,9422), C tert, es decir 3+ C enlazado (0,2676), C no H no tert (0,9723), C aromático (0,2940), N aromático (anillo de 5 miembros) (-0,5262), y -OH enlazado aromáticamente (-0,4802); todos alifáticos o alifáticamente enlazados, a menos que se indique lo contrario.

50 En una cuarta forma de realización, el grupo en cuestión es más lipófilo que cualquiera de las cadenas laterales de referencia cuando su lipofilia y la de las cadenas laterales de referencia se determinan de acuerdo con un procedimiento preferente de determinación del coeficiente de reparto, el cual se elige sobre la base del valor predicho para log Pow (valor predicho que a su vez se determina mediante el procedimiento (C)):

(1) para valores predichos de log Pow comprendidos entre 0 y 4, el procedimiento (A),

55 (2) para valores predichos de log Pow comprendidos entre 4 y 6, el procedimiento (B), y

60 (3) para valores predichos de log Pow mayores de 6, el procedimiento (C).

Para más información sobre los procedimientos de determinación de Pow, véase Sangster, J., Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry (abril de 1997) (ISBN 0-471-9739).

65

Para consultar tablas de coeficientes de reparto de octanol-agua, consúltese el documento de la EPA "Chemicals in the Environment: OPPT Chemicals Fact Sheets", la base de datos de propiedades de plaguicidas de la USDA, Sangster, J., "Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds", J. Phys. Chem. Ref. Data, 18:1111-1230 (1989); Verbruggen, E.M.J. *et al.*, "Physicochemical Properties of Higher Nonaromatic Hydrocarbons: Literature Study", J. Phys. Chem. Ref. Data, 29:1435-46 (2000). Para más información, véanse las referencias citadas en Penn State University Libraries, Physical Sciences Library, Octanol-water Partition Coefficients (última actualización: 21 de agosto de 2001), en la dirección URL [libraries.psu.edu/crsweb/phisci/coefficients.htm](http://libraries.psu.edu/crsweb/phisci/coefficients.htm). Cabe señalar que los valores de Pow indicados para diferentes compuestos pueden haber sido determinados por diferentes metodologías.

El algoritmo de Meylan está implementado en el programa LogPow (KowWin). Una versión en línea del programa, disponible en [esc.syrres.com/interkow/kowdemo.htm](http://esc.syrres.com/interkow/kowdemo.htm), acepta números de registro CAS o cadenas SMILES. Asimismo, el programa también proporciona valores determinados experimentalmente siempre que estén en su base de datos.

Se espera que un grupo sea lipófilo si su log P predicho por el algoritmo de Meylan es mayor que cero. Preferentemente, el valor de log P predicho por el algoritmo de Meylan es como mínimo 1, como mínimo 2, como mínimo 3, como mínimo 4, como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9 o como mínimo 10, cuanto mayor más preferente.

Preferentemente, como mínimo un grupo lipófilo es un "grupo muy lipófilo (según Meylan)". A efectos de la presente descripción, un "grupo muy lipófilo (según Meylan)" se define como aquel para el cual la lipofilia calculada mediante el algoritmo de Meylan es por lo menos de 2,7. El log P más elevado predicho por el algoritmo de Meylan para las cadenas laterales de los aminoácidos codificados genéticamente es de 2,60 (Trp); el log P más elevado determinado experimentalmente para las mismas cadenas laterales es de 2,89 (Ile). Cabe señalar que la mayoría de los "grupos fuertemente lipófilos" también son "grupos muy lipófilos (según Meylan)" y viceversa.

Un alfa-aminoácido tiene una cadena lateral, si la tiene (la glicina no tiene ninguna cadena lateral), y, por lo tanto, un alfa-aminoácido interior lipidado comprende necesariamente un solo grupo fuertemente lipófilo. Los aminoácidos que no son alfa-aminoácidos tienen más de un posible sitio de unión de cadena lateral. Para un aminoácido no alfa-aminoácido lipidado interior, si el aminoácido en cuestión tiene más de una cadena lateral, como mínimo una de ellas comprende un grupo fuertemente lipófilo.

Preferentemente, el grupo fuertemente lipófilo no comprende más de 100 átomos distintos de hidrógeno, más preferentemente no más de 80 átomos, aún más preferentemente no más de 60 átomos, todavía más preferentemente no más de 40 átomos.

Tal como se ha señalado anteriormente, el grupo fuertemente lipófilo debe comprender por lo menos cinco átomos distintos de hidrógeno (las cadenas laterales de leucina e isoleucina tienen cuatro átomos de este tipo). Preferentemente, dicho grupo comprende por lo menos seis (la cadena lateral de Lys tiene cinco), más preferentemente por lo menos 8 (las cadenas laterales de Arg y Phe tienen 7), aún más preferentemente por lo menos 9 (Tyr tiene 8), todavía más preferentemente comprende por lo menos 11 átomos de este tipo (el triptófano tiene 10), aún más preferentemente por lo menos 13 átomos de este tipo, y de la forma más preferente por lo menos 21 átomos de este tipo.

Preferentemente, el grupo fuertemente lipófilo tiene una composición elemental que se limita a los elementos carbono, silicio, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Preferentemente, la mayoría de los enlaces presentes en la cadena lateral que no implican átomos de hidrógeno son enlaces carbono-carbono.

Dado que la presencia de oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo tiende a reducir la lipofilia, en el grupo fuertemente lipófilo preferentemente más del 50% de los átomos que no son hidrógeno, aún más preferentemente más del 75%, son átomos de carbono.

Por el mismo motivo, el grupo fuertemente lipófilo comprende preferentemente, como mínimo 5, como mínimo 6, como mínimo 7, como mínimo 8, como mínimo 9 o como mínimo 10 átomos de carbono.

Preferentemente, la cadena lateral tiene la forma general -A-Y-Z, en la que A es opcional, pero, si existe, es un grupo orgánico de no más de 12 átomos distintos de hidrógeno; Y es un espaciador de no más de 12 átomos distintos de hidrógeno que comprende nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo, y Z es un grupo fuertemente lipófilo.

El grupo A, si está presente, es preferentemente alifático. Más preferentemente, es alquilo. Preferentemente, no tiene más de 10, más preferentemente no más de 8, átomos distintos de hidrógeno. De la forma más preferente, si está presente, es un alquilo con de 1 a 8 átomos de carbono.

El espaciador Y comprende preferentemente por lo menos un resto seleccionado entre el grupo formado por -O-, -S-, -NH-, -NR- (donde R es alquilo 1-4), -RO<sub>4</sub>-, C(=O), -C(=S), -C(=NH)- y -C(=NR)-. Más preferentemente, el

espaciador consta de uno o dos restos de este tipo. Los espaciadores más preferentes son -O-, -S-, -NH-, -C(=O)- y -C(=S)-.

Preferentemente, los radicales -Y-Z y/o -A-Y-Z se pueden considerar por sí mismos restos fuertemente lipófilos.

El grupo fuertemente lipófilo puede ser un resto o restos totalmente alifáticos, un resto o restos totalmente aromáticos, o una combinación de por lo menos un resto alifático y por lo menos un resto aromático. Resulta preferente un resto alifático.

Cada resto alifático puede ser independientemente lineal, cíclico, una combinación de lineal y cíclico, ramificado pero acíclico o ramificado pero con una o más ramificaciones que comprenden un resto cíclico. Dichos restos también pueden ser saturados o insaturados. Si son saturados, pueden estar presentes uno o más dobles enlaces y/o uno o más triples enlaces. Los restos alifáticos, tales como los de -Z, pueden comprender independientemente uno o más espaciadores, que se seleccionan preferentemente entre el grupo definido anteriormente.

El propio grupo Z fuertemente lipófilo puede comprender uno o más restos de la forma -A'-Y'-Z', donde A', Y' y Z' se definen de manera análoga a A, Y y Z.

Puede presentar la forma lineal

$-A'(-Y'-Z')_n$ , donde  $n > 1$ ,

por ejemplo, -A'-Y'-Z'-Y'-Z', donde cada Y' y cada Z' se seleccionan independientemente.

En una forma de realización preferente, el grupo fuertemente lipófilo Z comprende un resto alifático de forma -A-O-Q, donde A es opcional y es un grupo alquilo y Q es un grupo alquilo. Más preferentemente, A es  $-(CH_2)_i-$ , donde i es 0 o 1 y Q es  $-(CH_2)_jCH_3$ , donde j está comprendido entre 6 y 26.

En otra forma de realización preferente, el grupo fuertemente lipófilo comprende uno o más restos de ácido graso. De este modo, como mínimo un Z (o Z') comprende un grupo de ácido graso de forma -O-CO-Q, donde Q es principalmente alquilo pero puede incluir alquenoilo, alquinoilo o enlaces éter. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos, a menudo derivados de una grasa o aceite animal o vegetal, o contenidos en los mismos. Todos los ácidos grasos están compuestos por una cadena de grupos hidrocarburos que contienen de 4 a 22 átomos de carbono y se caracterizan por la presencia de un radical carboxilo terminal. Se pueden nombrar según la nomenclatura "número de átomos de carbono:número de dobles enlaces" y, opcionalmente, la ubicación de las isomerías cis/trans. Así, entre los ácidos grasos adecuados se incluyen los designados 4:0, 6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 16:1 (9c), 18:0, 18:1 (9c), 18:2 (9c, 12c), 18:3 (9c, 12c, 15c), 18:4 (6c, 9c, 12c, 15c), 18:3 (9c, 11t, 13t), 18:1 (9c) 12-OH, 20:1 (9c), 20:1 (11c), 20:4 (8c, 11c, 14c, 17c), 20:5 (5c, 8c, 11c, 14c, 17c), 22:0, 22:1 (11c), 22:1 (13c), 22:5 (7c, 10c, 13c, 16c, 19c) y 22:6 (4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c), todos ellos presentes en glucósidos de procedencia natural.

Si el grupo fuertemente lipófilo comprende diversos restos cíclicos, estos pueden estar fusionados (formando un resto policíclico) o no, y pueden tener el mismo número de lados o no. Habitualmente, tienen cada uno de 3 a 6 lados. Uno o más de dichos lados puede ser un enlace doble o triple. Los restos cíclicos pueden tener carácter heterocíclico. En una forma de realización preferente, la cadena lateral comprende un resto esteroide. Dicho resto consiste en un resto policíclico con cuatro anillos fusionados, uno de cinco lados y tres de seis.

Los restos alifáticos pueden comprender uno o más grupos fosforilo y, si efectivamente los comprenden, el número de dichos grupos presentes en la cadena lateral es preferentemente no mayor de dos. Los grupos fosforilo se encuentran en los lípidos de las membranas bacterianas, por ejemplo, el lípido monofosforil lípido A (MPLA).

Los restos aromáticos pueden comprender uno o más anillos. Si hay más de un anillo, los mismos pueden estar fusionados o no.

El grupo fuertemente lipófilo puede comprender una estructura ramificada, preferentemente de naturaleza alifática, tal como

$-B(-Y'-Z')_n$

siendo B un grupo orgánico ramificado con una valencia por lo menos de 2, por lo demás definido de forma parecida a A y A', n es como mínimo 2 e Y' y Z' son tal como se han definido anteriormente, aunque cada Y' y cada Z' se pueden seleccionar independientemente para cada ramificación -Y'-Z' enlazada a B. Más preferentemente, n es 2 o 3.

Preferentemente, cada ramificación -Y'-Z' se puede considerar en sí misma un grupo fuertemente lipófilo.

## ES 2 375 992 T3

En una forma de realización particularmente preferente, todos los Y' son -O- y todos los Z' son  $(\text{CH}_2)_j\text{CH}_3$ , donde  $j = 6$  a  $26$  (seleccionado independientemente para cada ramificación). Si  $n = 2$ , B es de la forma más preferente  $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ . Si  $n = 3$ , B es más preferentemente  $-\text{C}(\text{CH}_2)_3$ .

- 5 Utilizando el programa LogKow, los presentes solicitantes han calculado (véase a continuación) el valor de  $\log \text{Pow}$  para las cadenas laterales de diversos aminoácidos codificados genéticamente, así como de diversas cadenas laterales preferentes. Cuando el programa proporcionó además un valor experimental, este se indica asimismo a continuación.

<u>Compuesto</u>	<u>SMILES</u> (en minúsculas significa aromático)	<u>Comentarios</u>	Log P	
			Pred.	Exp.
n-butano	CCCC	Cadena lateral de Ile	2,31	2,89
2-metilpropano	CC(C)C	Cadena lateral de Leu	2,23	2,76
tolueno	Cc1ccccc1	Cadena lateral de Phe	2,54	2,73
p-cresol	Cc1ccc(O)cc1	Cadena lateral de Tyr	2,06	1,94
3-metil indol	Cc1cnc2cccc12	Cadena lateral de Trp	2,60	2,60
n-pentano	CCCCC	Un C más que Leu	2,80	3,39
-	COCCCC CCCC CCCC CCCC MW228,42	Cadena lateral de los AA lipidados en el compuesto 1a	6,45	?
-	COCCCC CCCC CCCC CC	2 más largo que el anterior	7,43	?
-	COCCCC CCCC CCC	2 más corto que en 1a	5,47	?
-	CO CCCCC CC	Cadena lateral preferente más corta de este tipo	3,01	?
-	CO CCCCC CCCC CCCC CCCC CCCC CCCC CC MW410,77	33 cadena lateral preferente más larga de este tipo	12,84	?
metil-n-butil éter	CO CCCC	Compuesto relacionado con log P conocido; indicado únicamente a título comparativo	1,54	1,66
-	CO CCCCC CCCC CCCC	Como en 1a pero con carbono beta metilado	7,43	?
-	O=CC (COCCCCCCC) COCCCCCCC	diéter enlazado con -CH(=O)CH< con m = n = 6	5,11	?

-	-	-	diéter enlazado con -CH(=O)CH< con m = n = 14	12,96	?
-	MW 524,92				
-	-	-	diéter enlazado con -CH(=O)CH< con m = n = 26	24,75	?
-	MW 861,57				
-	NC (COCCCCCCC)		diéter enlazado con -NHCH< con m = n = 6	5,23	?
-	COCCCCCCC				
-	-	-	diéter enlazado con -NHCH< con m = n = 14	13,09	?
-	-	-			
-	MW 848,57		diéter enlazado con -NHCH< con m = n = 26	24,88	?
-	C (COCCCCCCC)				
-	COCCCCCCC		diéter enlazado con -CH< con m = n = 6	6,18	?
-	-	-	diéter enlazado con -CH< con m = n = 14	14,03	?
-	-	-			
-	MW833,56		diéter enlazado con -CH< con m = n = 26	25,82	?
-	-	-	triéter m = n = k = 6	8,78	?
-	-	-			



Relación de los aminoácidos lipidados con la formulación liposómica

Normalmente, la lipidación facilita la incorporación del inmunógeno a un liposoma, que a su vez puede mejorar la presentación inmunológica del inmunógeno. Para una incorporación más eficiente, la cadena lateral fuertemente lipófila del aminoácido lipidado debe ser preferentemente parecida en tamaño por lo menos a uno de los componentes lipídicos del liposoma. Por ejemplo, el tamaño debe estar comprendido entre el 50% y el 200% del tamaño del componente lipídico de referencia del liposoma. El tamaño se puede medir contando el número de átomos distintos de hidrógeno de cada uno de ellos, calculando el peso molecular de cada uno de ellos o calculando (con la ayuda de modelos moleculares en tres dimensiones) el volumen molecular o la dimensión más larga de cada uno de ellos.

Preferentemente, como mínimo uno de los aminoácidos lipidados comprende un resto lipófilo que ayuda a la respuesta inmunitaria humoral o celular al glucolipopéptido.

15 Aminoácidos glucosilados

Por definición, un glucolipopéptido comprende uno o más aminoácidos glucosilados. Preferentemente, como mínimo uno de los aminoácidos glucosilados comprende un epítipo de hidratos de carbono asociado a una enfermedad, por ejemplo un epítipo de hidratos de carbono asociado a un tumor.

Una modificación co-traducción o post-traducción habitual de las proteínas es la glucosilación de determinados aminoácidos. La glucosilación es la unión covalente de una o más unidades de hidratos de carbono a un aminoácido.

A efectos de las reivindicaciones, un aminoácido glucosilado es aquel cuya cadena lateral comprende por lo menos una unidad monomérica de hidrato de carbono. Puede comprender además otros restos alifáticos y/o aromáticos. Un aminoácido simplemente glucosilado es aquel cuya cadena lateral está formada por un conector seleccionado entre el grupo formado por -O-, -S- y -NH-, y una o más unidades de hidrato de carbono.

Las unidades monoméricas unidas con mayor frecuencia a las proteínas en la naturaleza son la galactosa, la manosa, la glucosa, la N-acetilglucosamina, la N-acetilgalactosamina, el ácido siálico, la fucosa y la xilosa. El número de unidades de hidrato de carbono es variable y habitualmente está comprendido entre 1 y 20; preferentemente entre 1 y 10. Si se une una cadena de oligosacáridos (es decir, una cadena de dos o más unidades de hidratos de carbono), la misma puede ser lineal o ramificada. Si se trata de una cadena ramificada, la longitud de la secuencia lineal más larga está comprendida habitualmente entre 1 y 10 unidades de hidrato de carbono; más preferentemente, está comprendida entre 1 y 5.

Las uniones más habituales son uniones -O- y -N-. En la naturaleza, la glucosilación en O tiene lugar en aminoácidos que contienen grupos hidroxílicos, como la serina o la treonina. La tirosina también puede estar glucosilada en O. En el colágeno, está presente un aminoácido poco habitual, la hidroxilisina (Hyl), que está glucosilada en O cuando aparece en la secuencia Gly-Xaa-Hyl-Xaa-Arg-, donde Xaa es cualquier aminoácido. La hidroxiprolina también puede estar glucosilada en O.

En la naturaleza, la glucosilación en N se produce en cadenas laterales de aminoácidos que contienen grupos amídicos, tales como Asn, o en el extremo amino de una proteína. Por lo general, tiene lugar en la Asn de las secuencias -Asn-Xaa-Ser- o -Asn-Xaa-Thr-. En una unión por N, el nitrógeno puede ser no sustituido (-NH-) o sustituido (-NZ-).

También es posible la glucosilación en S, por ejemplo del grupo tiol de la cisteína. Dicha glucosilación da lugar a una unión de tipo -S-.

Dado que las moléculas según la presente invención no deben ser necesariamente biosintetizadas, la presente invención no se limita a la glucosilación de los aminoácidos codificados genéticamente.

Los aminoácidos glucosilados en O de la presente invención pueden ser cualquier aminoácido con una cadena lateral que comprende la estructura -C-O-hidrato de carbono, donde "hidrato de carbono" se refiere a una o más unidades de sacárido. -C- puede ser -CH<sub>2</sub>- o puede estar más sustituido. Puede tratarse, aunque no necesariamente, del carbono alfa del aminoácido.

Todos los aminoácidos que contienen hidroxilo pueden estar glucosilados en O, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, serina, treonina, hidroxiprolina e hidroxilisina.

Análogamente, los aminoácidos glucosilados en N según la presente invención pueden ser cualquier aminoácido con una cadena lateral que comprende la estructura -N-hidrato de carbono, donde "hidrato de carbono" se refiere a una o más unidades de sacárido. -N- puede ser -NH- o puede estar más sustituido. El mismo puede estar enlazado, aunque no necesariamente, al carbono alfa del aminoácido.

Todos los aminoácidos que contienen grupos amina pueden estar glucosilados en N, incluida, aunque sin limitarse a la misma, la asparagina. Todos los aminoácidos que contienen grupos tiol pueden estar glucosilados en S, incluida, aunque sin limitarse a la misma, la cisteína.

5 La glucosilación se puede llevar a cabo antes, durante o después de la síntesis de la secuencia peptídica. Preferentemente, todos los aminoácidos glucosilados se preparan primero y a continuación se incorporan al péptido (o a un bloque del mismo).

10 Un aminoácido glucosilado puede comprender, aunque no es necesario, uno o más grupos fuertemente lipófilos.

#### Aminoácidos y péptidos

15 Un péptido está compuesto por diversos residuos aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos (-NHCO-). Un péptido biógeno es un péptido en el que todos los residuos son residuos de aminoácidos codificados genéticamente; no es necesario que el péptido biógeno esté efectivamente producido por expresión génica.

20 Los aminoácidos son los bloques constructivos básicos con los que se constituyen los péptidos y proteínas. Poseen un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxílico (-COOH). Muchos aminoácidos, aunque no todos, tienen la estructura de alfa-aminoácido NH<sub>2</sub>-CHR-COOH, donde R es hidrógeno o cualquier grupo de entre multitud de grupos funcionales.

25 Existen veinte aminoácidos codificados genéticamente: Alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Todos menos la glicina presentan isomería óptica, aunque en el ser humano se encuentra únicamente su isómero L. Aun así, los isómeros D de estos aminoácidos tienen importancia biológica; la D-Phe, por ejemplo, es un conocido analgésico.

30 Técnicamente hablando, la prolina no es un aminoácido, sino más bien un iminoácido cíclico, en el que la cadena lateral -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- está unida no sólo al carbono alfa, sino también al nitrógeno amídico del enlace peptídico, formando un anillo pirrolidínico de cinco miembros. No existe ningún hidrógeno amídico en los residuos de prolina. Según la convención habitual, cuando nos referimos a un "aminoácido" debe considerarse incluida la prolina (y sus formas sustituidas, como la 3-hidroxiprolina), a menos que dichos compuestos se excluyan explícitamente.

35 Se conocen muchos otros aminoácidos, entre los cuales: ácido 2-aminoadípico; ácido 3-aminoadípico; ácido beta-aminopropiónico; ácido 2-aminobutírico; ácido 4-aminobutírico (ácido piperidínico); ácido 6-aminocaproico; ácido 2-aminoheptanoico; ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico; ácido 2-aminopimélico; ácido 2,4-diaminobutírico; desmosina; ácido 2,2'-diaminopimélico; ácido 2,3-diaminopropiónico; N-etilglicina; N-etilasparagina; hidroxilisina; alo-hidroxilisina; 3-hidroxiprolina; 4-hidroxiprolina; isodesmosina; alo-isoleucina; N-metilglicina (sarcosina); N-metilisoleucina; N-metilvalina; norvalina; norleucina; y ornitina.

40 Los péptidos se construyen por condensación de aminoácidos y/o péptidos pequeños. El grupo amino de un aminoácido (o péptido) reacciona con el grupo carboxílico de un segundo aminoácido (o péptido), formando un enlace peptídico (-NHCO-) y liberando una molécula de agua. Por lo tanto, cuando se incorpora un aminoácido a un péptido, técnicamente hablando debería hacerse referencia a un residuo de aminoácido. El núcleo de dicho residuo es el resto excluidos los grupos funcionales enlazantes -NH y -CO que lo unen a los otros residuos. Dicho resto está compuesto por uno o más átomos de cadena principal (véase a continuación) y por cadenas laterales unidas a los mismos.

45 El resto de cadena principal de cada AA está compuesto por los grupos funcionales enlazantes -NH y -CO y un resto de cadena principal nuclear. Generalmente, este último es un único átomo de carbono. Sin embargo, el resto de cadena principal nuclear puede incluir átomos de carbono adicionales, y también puede incluir átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre, que conjuntamente forman una sola cadena. En una forma de realización preferente, los átomos de la cadena principal nuclear consisten únicamente en átomos de carbono.

50 Las cadenas laterales están unidas a los átomos de la cadena principal nuclear. En los alfa-aminoácidos, en los que la cadena lateral está unida al carbono alfa y el C-1, el C-2 y el N-2 de cada residuo forman la unidad repetitiva de la cadena principal, la expresión "cadena lateral" se refiere a los átomos de carbono C-3 y de numeración superior y sus sustituyentes. También incluye los átomos de hidrógeno unidos a los átomos de la cadena principal.

55 Los aminoácidos se pueden clasificar según el número de átomos de carbono que aparecen en la cadena principal entre el carbono del grupo carbonilo y el nitrógeno del grupo amino, que participan en los enlaces peptídicos. Entre los aproximadamente 150 aminoácidos que se encuentran en la naturaleza, se conocen los aminoácidos alfa, beta, gamma y delta. Estos tienen de 1 a 4 átomos de carbono intermedios. En las proteínas se encuentran únicamente alfa-aminoácidos. La prolina es un caso especial de alfa-aminoácido; su cadena lateral también está unida al nitrógeno del enlace peptídico.

Para los aminoácidos beta y de orden superior, se puede escoger a qué carbono nuclear de la cadena principal se une una cadena lateral distinta de H. El sitio de unión preferente es el carbono C-2 (alfa), es decir, el adyacente al carbono carboxílico del grupo funcional enlazante -CO. También es posible que más de un átomo de la cadena principal esté unido a una cadena lateral distinta de H. Sin embargo, en una forma de realización preferente, únicamente un átomo de la cadena principal nuclear está unido a una cadena lateral distinta de H.

Un átomo de carbono de la cadena principal puede estar unido a una o dos cadenas laterales; lo más habitual es que sea una. Una cadena lateral puede estar unida a un átomo de carbono de la cadena principal a través de un enlace sencillo o doble; lo más habitual es que se trate de un enlace sencillo.

### Inmunógeno

El inmunógeno según la presente invención es un glucolipopéptido tal como se ha definido anteriormente, que comprende por lo menos un epítipo de linfocito B o T asociado a una enfermedad tal como se define a continuación, y que, cuando se administra adecuadamente a un sujeto (lo que, a veces, significa que va asociado a un liposoma o a una célula presentadora de antígeno), provoca una respuesta inmunitaria humoral y/o celular que protege al sujeto frente a la enfermedad.

### Epítipo

Los epítipos de la presente invención pueden ser epítipos de linfocitos B o de linfocitos T y tener cualquier naturaleza química, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, péptidos, hidratos de carbono, lípidos, glucopéptidos y glucolípidos. El epítipo es como mínimo esencialmente idéntico a un epítipo de origen natural. Puede ser idéntico a un epítipo de origen natural o una forma modificada de un epítipo de origen natural.

El término "epítipo de MUC1", sin mayor especificación, incluye no sólo epítipos nativos de MUC1, sino también epítipos mutantes esencialmente idénticos a dichos epítipos nativos. Un epítipo mutante de este tipo debe presentar reactividad cruzada con un epítipo de MUC1 nativo. Análogamente, el término "epítipo asociado a tumor" incluye epítipos nativos y mutantes, pero el epítipo mutante debe presentar reactividad cruzada con un epítipo nativo asociado a tumor.

### Epítipos de linfocitos B

Los epítipos de linfocitos B son epítipos que reconocen los linfocitos B y los anticuerpos.

Habitualmente, los epítipos peptídicos de linfocitos B tienen por lo menos cinco aminoácidos de longitud, más frecuentemente por lo menos seis aminoácidos, aún más frecuentemente por lo menos siete u ocho aminoácidos, y pueden ser continuos ("lineales") o discontinuos ("conformacionales") (estos últimos se forman por el plegamiento de una proteína que provoca que las partes no contiguas de la secuencia de aminoácidos primaria se aproximen físicamente).

Los epítipos de los linfocitos B también pueden ser epítipos de hidratos de carbono.

### Epítipos de linfocitos T

El epítipo de linfocito T, si está presente, puede ser cualquier epítipo de linfocito T que es por lo menos esencialmente idéntico a un epítipo de linfocito T de un antígeno (incluido un hapteno) asociado con una enfermedad o trastorno en un grado tal que podría resultar profiláctica o terapéuticamente útil para estimular o potenciar una respuesta inmunitaria celular a dicho epítipo. Entre dichas enfermedades y trastornos se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, enfermedades parasitarias, como la esquistosomiasis y la leishmaniasis, infecciones por hongos, como la candidiasis, infecciones bacterianas, como la lepra, infecciones víricas, como las infecciones por el VIH, y cánceres, particularmente los tumores sólidos. Por supuesto, cuanto mayor es el grado de especificidad del epítipo con respecto a la enfermedad o trastorno asociados, mayor es la probabilidad de que la estimulación de una respuesta inmunitaria a ese epítipo no presente efectos adversos.

Por supuesto, el epítipo debe ser susceptible al reconocimiento por parte de los receptores de linfocitos T para que pueda tener lugar una respuesta inmunitaria celular. En los péptidos, los epítipos de linfocitos T pueden interactuar con moléculas de MHC de clase I o clase II. Generalmente, los epítipos de clase I tienen una longitud comprendida entre 8 y 15 aminoácidos, más a menudo entre 9 y 11 aminoácidos. Generalmente, los epítipos de clase II tienen una longitud comprendida entre 5 y 24 aminoácidos (un péptido de 24 monómeros es el más largo de los que se pueden incluir entre los de clase II), más frecuentemente entre 8 y 24 aminoácidos. Si el inmunógeno es mayor, el sistema inmunitario lo divide en fragmentos de un tamaño más adecuado para la interacción con las moléculas de MHC de clase I o II.

Los epítomos de linfocitos T formados por hidratos de carbono pueden tener una longitud tan corta como de una única unidad sacárida (por ejemplo, Tn). Preferentemente, no tienen más de cinco unidades sacáridas.

5 Se conocen muchos epítomos de linfocitos T. En el sector se conocen diversas técnicas de identificación de epítomos de linfocitos T adicionales. Generalmente, dichas técnicas incluyen la preparación de una molécula capaz de proporcionar un epítomo de linfocitos T y la caracterización de la respuesta inmunitaria a dicha molécula. Los procedimientos de caracterización de la respuesta inmunitaria se describen en una sección posterior.

10 La referencia a un epítomo de CTL como “restringido” por un determinado alelo de moléculas de MHC de clase I, tal como el HLA-A1, indica que el epítomo está unido a dicha forma alélica y es presentado por la misma. Esto no significa que dicho epítomo no pueda estar unido a otra forma alélica de MHC distinta, como HLA-A2, HLA-A3, HLA-B7 o HLA-B44, y ser presentado por la misma.

15 Epítomos asociados a una enfermedad y epítomos específicos de una enfermedad

Una enfermedad es un estado clínico adverso causado por la infección o parasitación por parte de un virus, un organismo unicelular o un organismo pluricelular, o por el desarrollo o proliferación de células cancerosas (o tumorales).

20 Dicho organismo unicelular puede ser cualquier patógeno o parásito unicelulares, incluidos los hongos, las bacterias o los protozoos. El organismo pluricelular puede ser cualquier patógeno o parásito, incluidos los protozoos, los gusanos o los artrópodos. Los organismos pluricelulares incluyen tanto los endoparásitos como los ectoparásitos. Es más probable que los endoparásitos desencadenen una respuesta inmunitaria, pero, en la medida en que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria protectora, los ectoparásitos y sus antígenos se encuentran dentro del  
25 ámbito de la presente invención.

Se puede decir que un epítomo está directamente asociado a una enfermedad vírica si lo presenta una partícula vírica o si lo codifica el genoma vírico y se expresa en una célula infectada.

30 Se puede decir que un epítomo está directamente asociado a una enfermedad causada por un organismo unicelular o pluricelular si lo presenta un antígeno intracelular, de superficie o secretado del organismo causante.

35 Se puede decir que un epítomo está directamente asociado a un determinado tumor si lo presenta un antígeno intracelular, de superficie o secretado de dicho tumor. No tiene que estar necesariamente presentado por todas las líneas celulares del tipo de tumor en cuestión, ni por todas las células de un determinado tumor, ni durante toda la vida del mismo. No tiene que ser necesariamente específico para el tumor en cuestión. Se puede decir que un epítomo es “asociado a tumor” en general si está asociado del modo descrito a cualquier tumor (cáncer, neoplasia).

40 Los tumores pueden tener un origen mesenquimatoso o epitelial. Entre los cánceres se incluyen el cáncer de colon, de recto, de cuello uterino, de mama, de pulmón, de estómago, de útero, de piel, de boca, de lengua, de labios, de laringe, de riñón, de vejiga, de próstata, de cerebro y de los glóbulos sanguíneos.

45 Un epítomo puede estar indirectamente asociado a una enfermedad si es un epítomo de un antígeno producido específicamente o en exceso por las células infectadas del individuo, o producido específicamente o en exceso por otras células del individuo en una respuesta específica pero no inmunitaria a una enfermedad, por ejemplo, un factor angiogénico expresado en exceso por las células cercanas a consecuencia de la secreción de sustancias reguladoras por parte de un tumor.

50 El término “epítomo asociado a una enfermedad” también incluye cualquier epítomo de origen no natural lo suficientemente parecido a un epítomo naturalmente asociado a dicha enfermedad, de tal modo que los anticuerpos o linfocitos T que reconocen el epítomo naturalmente asociado a la enfermedad también reconocen el epítomo no natural parecido. Las mismas consideraciones se aplican a los epítomos asociados con enfermedades o clases de enfermedades específicas.

55 Se puede decir que un epítomo es específico para una determinada fuente (tal como un organismo causante de una enfermedad o, más particularmente, un tumor), si se asocia más frecuentemente con dicha fuente que con otras en una proporción detectable y clínicamente útil. No es necesario que se dé una especificidad absoluta siempre y cuando se obtenga un efecto profiláctico, terapéutico o diagnóstico útil.

60 En un epítomo “específico para un tumor”, dicho epítomo está asociado más frecuentemente al tumor en cuestión que a otros tumores o células normales. Preferentemente, debe haber una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,05$ ) entre su frecuencia de aparición asociado a dicho tumor y su frecuencia de aparición asociado a (a) células normales del tipo del que se deriva el tumor, y (b) como mínimo otro tipo de tumor. Se puede decir que un epítomo es “específico de tumor” en general si se asocia más frecuentemente a tumores (de cualquier tipo o de todos los tipos)  
65 que a las células normales. Dicho epítomo no tiene que estar asociado necesariamente a todos los tumores.

El término “epítipo específico de tumor” también incluye cualquier epítipo de origen no natural lo suficientemente parecido a un epítipo de origen natural específico para el tumor en cuestión (o, según el caso, específico para los tumores en general), de tal modo que los anticuerpos o linfocitos T estimulados por dicho epítipo parecido son esencialmente tan específicos como los CTL estimulados por el epítipo natural.

En general, la especificidad a un tumor frente a las células normales es más importante que la especificidad a un tumor frente a otro tumor, ya que (dependiendo de la vía de administración y del tejido normal afectado en concreto) una mayor especificidad generalmente da lugar a menos efectos adversos. Al contrario que en las aplicaciones terapéuticas, la especificidad a un tumor frente a otro tumor es más importante en las aplicaciones diagnósticas.

El término “específico” no se refiere a una especificidad absoluta, sino únicamente a una diferencia clínicamente útil entre la probabilidad de aparición en asociación con un patógeno o un tumor y la probabilidad de aparición en un sujeto normal.

#### Epítipos asociados a parásitos

En una forma de realización, el epítipo es un epítipo asociado a parásito, por ejemplo un epítipo asociado a la leishmaniasis, el paludismo, la tripanosomiasis, la babesiosis o la esquistosomiasis. Entre los epítipos asociados a parásitos adecuados se incluyen los siguientes, aunque no se limitan a los mismos.

Parásito	Epítipo	Referencias
<i>Plasmodium falciparum</i> (paludismo)	(NANP) 3 (SEC ID nº: 3)	Good <i>et al.</i> (1986), J. Exp. Med. 164:655
	Proteína de circunsporozoíto, AA 326-343	Good <i>et al.</i> (1987), Science 235:1059
<i>Leishmania donovani</i>	Péptido repetitivo	Liew <i>et al.</i> (1990), J. Exp. Med. 172:1359
<i>Leishmania major</i>	EAEAAARLQA (SEC ID nº: 4)	Longenecker <i>et al.</i> , 08/229, 606
<i>Toxoplasma gondii</i>	Proteína de superficie P30	Darcy <i>et al.</i> (1992), J. Immunol. 149:3636
<i>Schistosoma mansoni</i>	Antígeno Sm-28GST	Wolowxuk <i>et al.</i> (1991), J. Immunol 146:1987

#### Epítipos asociados a virus

En otra forma de realización, el epítipo es un epítipo vírico, por ejemplo un epítipo asociado al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de Epstein-Barr (VEB) o el virus de la hepatitis. Entre los epítipos víricos adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos:

Virus	Epítipo	Referencia
gp120 de VIH	Bucle V3, 308-331	Jatsushita, S. <i>et al.</i> (1988), J. Viro. 62:2107
gp120 de VIH	AA 428-443	Ratner <i>et al.</i> (1985), Nature 313:277
gp120 de VIH	AA 112-124	Berzofsky <i>et al.</i> (1988), Nature 334:706
VIH	Transcriptasa inversa	Hosmalin <i>et al.</i> (1990), PNAS USA 87:2344
Gripe	Nucleoproteína AA 335-349, 366-379	Townsend <i>et al.</i> (1986), Cell 44:959
Gripe	Hemaglutinina AA 48-66	Mills <i>et al.</i> (1986), J. Exp. Med. 163:1477
Gripe	AA 111-120	Hackett <i>et al.</i> (1983), J. Exp. Med 158:294
Gripe	AA 114-131	Lamb, J. y Green N. (1983), Immunology 50:659
Epstein-Barr	LMP 43-53	Thorley-Lawson <i>et al.</i> (1987), PNAS USA 84:5384
Hepatitis B	Ag de superficie AA 95-109; AA 140-154	Milich <i>et al.</i> (1985), J. Immunol. 134:4203
	Antígeno pre-S AA 120-132	Milich <i>et al.</i> (1986), J. Exp. Med. 164:532
Herpes simplex	Proteína gD AA 5-23	Jayaraman <i>et al.</i> (1993), J. Immunol. 151:5777
	Proteína gD AA 241-260	Wyckoff <i>et al.</i> (1988), Immunobiology 177:134
Rabia	Glucoproteína AA 32-44	MacFarlan <i>et al.</i> (1984), J. Immunol 133:2748

#### Epítipos asociados a bacterias

El epítipo también puede estar asociado a un antígeno bacteriano. Entre los epítipos adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos:

Bacteria	Epítopo	Referencia
Tuberculosis	Proteína 65 kD AA 112-126 AA 163-184 AA 227-243 AA 242 y -266 AA 437-459	Lamb <i>et al.</i> (1987), EMBO J. 6:1245
Estafilococo	Proteína nucleasa AA 61-80	Finnegan <i>et al.</i> (1986), J. Exp. Med 164:897
<i>E. coli</i>	Enterotoxina termoestable  Enterotoxina termolábil	Cardenas <i>et al.</i> (1993), Infect Immunity 61:4629  Clements <i>et al.</i> (1986), Infect. Immunity 53:685
<i>Shigella sonnei</i>	Antígeno de forma I	Formal <i>et al.</i> (1981), Infect. Immunity 34:746

#### Epítomos asociados al cáncer

- 5 En otra forma de realización, el epítopo está asociado a un cáncer (tumor), incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, cánceres del aparato respiratorio (pulmón, tráquea, laringe), del aparato digestivo (boca, garganta, estómago, intestinos), del sistema excretor (riñón, vejiga, colon, recto), del sistema nervioso (cerebro), del aparato reproductor (ovario, útero, cuello uterino), del sistema glandular (mama, hígado, páncreas, próstata), de la piel, etc. Los dos grupos principales de cánceres son los sarcomas, que tienen un origen mesenquimatoso y afectan a tejidos de tipo muscular y óseo, y los carcinomas, que tienen un origen epitelial y constituyen la inmensa mayoría de los casos de cáncer glandular de mama, estómago, útero, piel y lengua. Entre los sarcomas se incluyen fibrosarcomas, linfosarcomas, osteosarcomas, condrosarcomas, rhabdomyosarcomas y liposarcomas. Entre los carcinomas se incluyen adenocarcinomas, carcinomas basocelulares y carcinomas espinocelulares o escamosos.
- 10
- 15 Entre los epítomos asociados al cáncer se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, epítomos peptídicos tales como los de p53 mutante, el producto génico de oncogén Ras con mutación puntual, HER-2/neu, c-erb2 y la proteína nuclear MUC1, y epítomos de hidratos de carbono como sialil-Tn (STn), TF, Tn, CA 125, sialil-Le<sup>x</sup>, sialil-Le<sup>a</sup> y P97.

#### Epítomos de hidratos de carbono

- 20 También tienen interés los epítomos de hidratos de carbono. Por ejemplo, se puede presentar cualquiera de los tres tipos de epítomos de hidratos de carbono asociados a tumores que se expresan abundantemente en los cánceres humanos comunes. Entre estos se incluyen concretamente las cadenas de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2, las cadenas ganglio asociadas a cáncer y los glucoesfingolípidos neutros. Algunos ejemplos de cadenas de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2 son: Lewis a, Lewis a dimérico, Lewis b, Lewis b/Lewis a, Lewis x, Lewis y, Lewis a/Lewis x, Lewis x dimérico, Lewis y/Lewis x, trifucosil Lewis y, trifucosil Lewis b, sialosil Lewis x, sialosil Lewis y, sialosil Lewis x dimérico, Tn, sialosil Tn, sialosil TF, TF. Algunos ejemplos de cadenas ganglio asociadas a cáncer son: GM3, GD3, GM2, GM4, GD2, GM1, GD-1a, GD-1b. Entre los esfingolípidos neutros se incluyen globotriosa, globotetraosa, globopentaosa, isoglobotriosa, isoglobotetraosa, mucotriosa, mucotetraosa, lactotriosa, lactotetraosa, neolactotetraosa, gangliotriosa, gangliotetraosa, galabiosa y 9-O-acetil-GD3.
- 25
- 30

- Numerosos antígenos de importancia clínica tienen determinantes formados por hidratos de carbono. Un grupo de antígenos de este tipo comprende las mucinas asociadas a tumor (Roussel *et al.*, Biochimie 70, 1471, 1988).
- 35

- En términos generales, las mucinas son glucoproteínas presentes en la saliva, los jugos gástricos, etc., que forman soluciones viscosas y actúan como lubricantes o protectores en las superficies externas e internas del cuerpo. Habitualmente, tienen un peso molecular alto (con frecuencia > 1.000.000 daltons) y están muy glucosiladas. Las cadenas de glicanos de las mucinas están enlazadas en O (a residuos de serina o treonina) y pueden constituir más del 80% de la masa molecular de la glucoproteína. Las mucinas están producidas por células epiteliales ductales y por tumores del mismo origen, y pueden ser secretadas o estar unidas a la célula como proteínas integrales de la membrana (Burchell *et al.*, Cancer Res., 47, 5476, 1987; Jerome *et al.*, Cancer Res., 51, 2908, 1991).
- 40

- Los tejidos cancerosos producen mucinas anormales, de las que se sabe que son relativamente menos glucosiladas que sus homólogos normales (Hull *et al.*, Cancer Commun., 1, 261, 1989). Debido a las alteraciones funcionales del mecanismo de glucosilación de las proteínas en las células cancerosas, las mucinas asociadas a tumor contienen habitualmente glicanos cortos e incompletos. Así, mientras que la mucina humana normal asociada a los glóbulos de grasa de la leche humana contiene principalmente el glicano tetrasacárido gal  $\beta$ 1-4 glcNAc $\beta$ 1-6(gal  $\beta$ 1-3)gal NAc- $\alpha$  y
- 45

5 sus análogos sialilados (Hull *et al.*), el hapteno Tn asociado a tumor consiste únicamente en el residuo monosacárido  $\alpha$ -2-acetamido-3-desoxi-D-galactopiranosilo, y el hapteno T en el disacárido  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-3) $\alpha$ -acetamido-2-desoxi-D-galactopiranosilo. Otros haptenos de mucinas asociadas a tumor, como los haptenos sialil-Tn y sialil-(2-6) T, surgen de la unión de los residuos terminales de sialilo a los glicanos cortos de Tn y T (Hanisch *et al.*, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 370, 21, 1989; Hakormori, Adv. Cancer Res., 52:257, 1989; Torben *et al.*, Int. J. Cancer, 45 666, 1980; Samuel *et al.*, Cancer Res., 50, 4801, 1990).

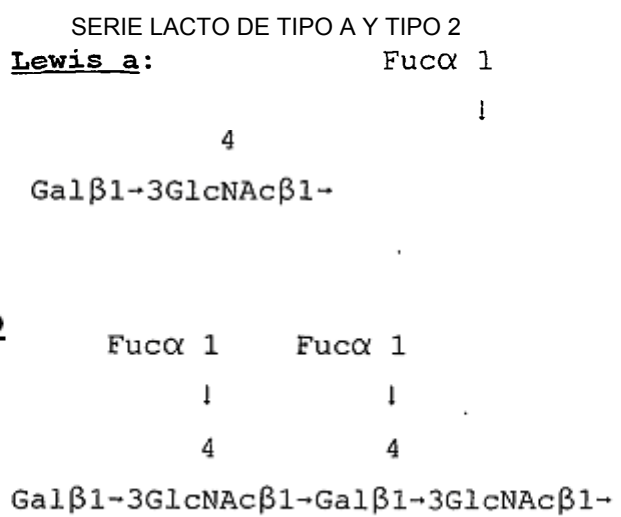
10 Los antígenos T y Tn (Springer, Science, 224, 1198, 1984) se encuentran en forma inmunorreactiva en las membranas externas de muchas células de carcinoma primario y sus metástasis (> 90% de todos los carcinomas humanos). Como marcadores de cáncer, T y Tn permiten la detección inmunohistoquímica temprana y el pronóstico de la capacidad de invasión de algunos carcinomas (Springer). Recientemente, se ha identificado la presencia del hapteno sialil-Tn en el tejido tumoral como un parámetro de pronóstico desfavorable (Itzkowitz *et al.*, Cancer, 66, 1960, 1990; Yonezawa *et al.*, Am. J. Clin. Pathol., 98 167, 1992). En los cánceres humanos comunes, se expresan en un nivel elevado tres tipos diferentes de antígenos de hidratos de carbono asociados a tumor. Los haptenos T y Tn se incluyen en las cadenas de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2. Además, las cadenas ganglio y los glucoesfingolípidos asociados a cáncer se expresan en diversos cánceres humanos.

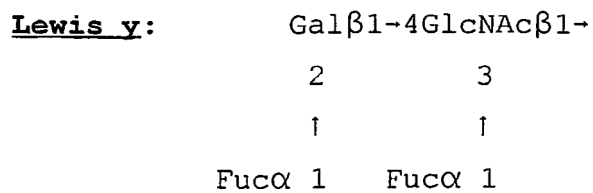
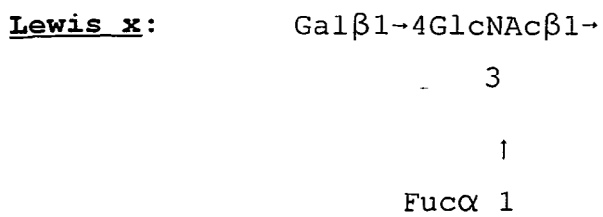
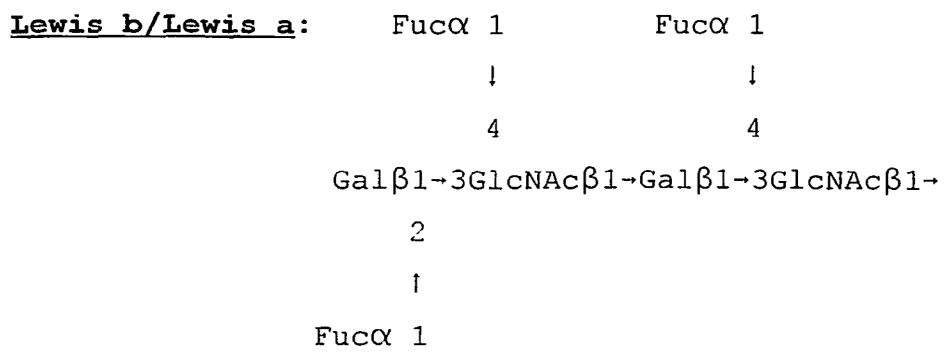
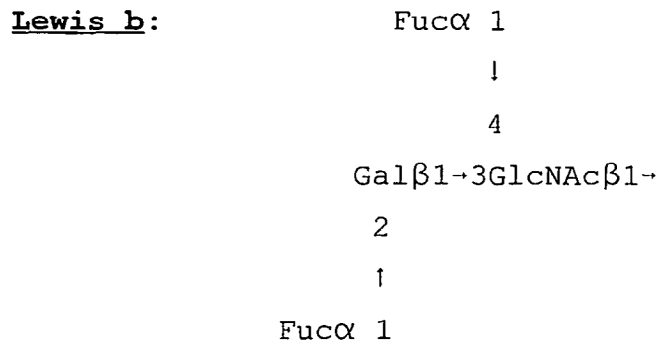
20 Los determinantes glicanos modificados que presentan las mucinas asociadas a cáncer son reconocidos como ajenos o extraños por el sistema inmunitario del paciente (Springer). De hecho, en la mayoría de pacientes, se observa una fuerte respuesta autoinmunitaria al hapteno T. Estas respuestas se pueden medir fácilmente y permiten la detección de carcinomas con mayor sensibilidad y especificidad, y antes de lo que era posible hasta ahora. Por último, el grado de expresión de T y Tn a menudo está relacionado con el grado de diferenciación de los carcinomas. (Springer).

25 En Wong, USP 6.013.779 se facilita una amplia descripción de haptenos de hidratos de carbono. Según la presente invención, hay diversos hidratos de carbono que se pueden incorporar en un inmunógeno glucolipopéptido sintético, particularmente para su utilización en la detección y el tratamiento de tumores. Los haptenos Tn, T, sialil-Tn y sialil(2-->6)T son particularmente preferentes.

30 Particularmente, para la detección y el tratamiento de tumores, los tres tipos de epítomos de hidratos de carbono asociados a tumor que se expresan en un grado elevado en los cánceres humanos comunes se conjugan con compuestos aminados. Entre estos se incluyen concretamente las cadenas de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2, las cadenas ganglio asociadas a cáncer y los glucoesfingolípidos neutros.

35 Algunos ejemplos de cadenas de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2 son:

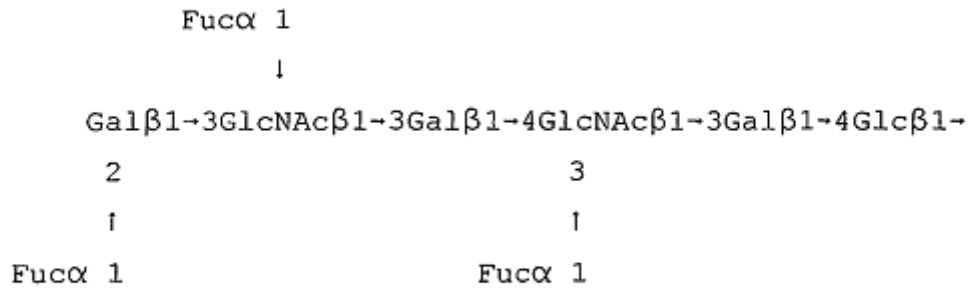




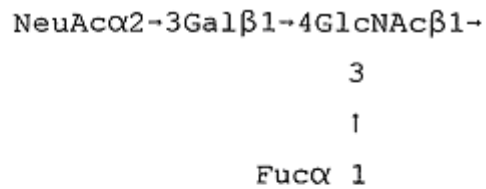




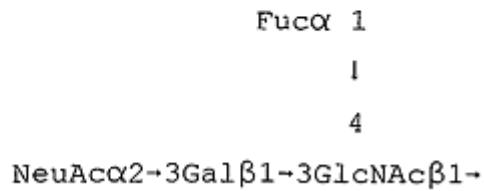
**Trifucosil Lewis b:**



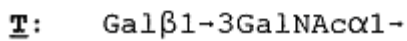
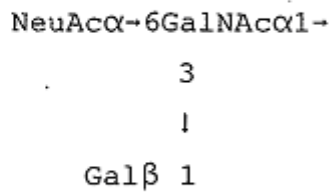
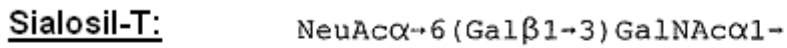
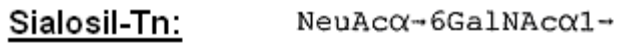
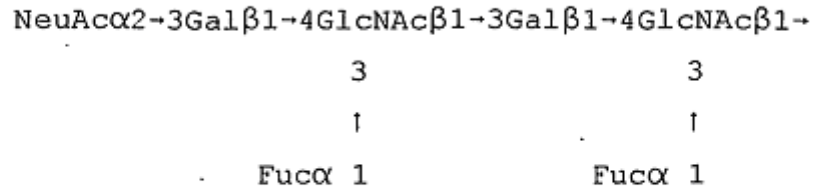
**Sialosil Le\*:**



**Sialosil Le\*:**



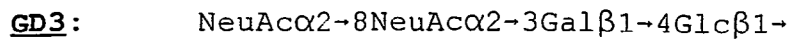
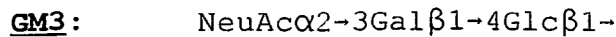
Sialosil dimérico Le\*:



Algunos ejemplos de cadenas ganglio que se pueden conjugar con compuestos aminados según la presente invención son:

5

CADENAS GANGLIO ASOCIADAS A CÁNCER





## GLUCOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS SELECCIONADOS

- Globotriosa: Gal $\alpha$ →4Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 Globotetraosa: GalNAc $\beta$ 1→3Gal $\alpha$ →4Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 5 Globopentaosa: GalNAc $\alpha$ 1→3GalNAc $\beta$ 1→3Gal $\alpha$ →4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1→  
 Isoglobotriosa: Gal $\alpha$ →3Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 Isoglobotetraosa: GalNAc $\beta$ 1→3Gal $\alpha$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 Mucotriosa: Gal $\beta$ 1→4Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 Mucotetraosa: Gal $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 10 Lactotriosa: GalNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 Lactotetraosa: GalNAc $\beta$ 1→3GalNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 Neolactotetraosa: Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1→  
 Gangliotriosa: GalNAc $\beta$ 1→4Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 Gangliotetraosa: Gal $\beta$ 1→GlcNAc $\beta$ 1→4Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→  
 15 Galabiosa: Gal $\alpha$ →4Gal $\beta$ 1→  
 9-O-acetil-GD3: 9-0-Ac-NeuAc $\alpha$ 2→8NeuAc $\alpha$ 2→3Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→

Epítipo de mucina

- 20 En una forma de realización preferente, el epítipo es un epítipo de una mucina asociada a cáncer. Las mucinas son glucoproteínas caracterizadas por un peso molecular elevado (> 1.000.000 daltons) y un grado elevado de glucosilación (más del 80%). Las mucinas pueden expresarse extracelularmente o como glucoproteína integral de la membrana celular con distintos dominios externo, transmembranario y citoplásmico. Las mucinas de la membrana celular son como varillas flexibles que sobresalen de la superficie celular hasta distancias relativamente grandes,
 25 formando un componente importante del glucocáliz (Jentoff, 1990), y las regiones terminales de las mismas, formadas por hidratos de carbono, son probablemente el primer punto de contacto con los anticuerpos y las células del sistema inmunitario.

- Se sabe que las mucinas anormales o asociadas a cáncer son relativamente menos glucosiladas (Hull *et al.*, 1989)
 30 y, por lo tanto, antigénicamente diferentes de sus homólogos normales, se exponen normalmente epítipos crípticos de hidratos de carbono (Hanish *et al.*, 1989; Torben *et al.*, 1990; Samuel *et al.*, 1990), peptídicos (Burchell *et al.*, 1987) y quizá incluso glucopeptídicos. Por consiguiente, dado que las mucinas de la superficie celular sobresalen, ellas mismas pueden actuar como diana para un ataque inmunitario (Henningson *et al.*, 1987; Fung *et al.*, 1990; Singhal *et al.*, 1991; Jerome *et al.*, 1991; Oncogen, EP 268.279; Biomembrane Institute, W089/08711; Longenecker, USP 4.971.795). En algunas circunstancias, las mucinas de la membrana celular asociadas a cáncer pueden
 35 "enmascarar" otros antígenos de superficie celular y proteger a las células cancerosas de un ataque inmunitario (Codington *et al.*, 1983; Friberg, 1972; Miller *et al.*, 1977).

- El epítipo de mucina puede ser un péptido nuclear, un hidrato de carbono o un glucopéptido. Entre los ejemplos no
 40 limitativos de mucinas que pueden presentar epítipos se encuentran el antígeno de Thomsen-Friedenreich humano asociado a tumor (MacLean, 1992), la glucoproteína relacionada con epiglicanina (Codington, 1984), la mucina submaxilar ovina, la mucina submaxilar bovina, las mucinas asociadas a tumores de mama (por ejemplo, la mucina epitelial polimórfica humana, incluidas las mucinas de tumores de mama, Gendler, 1988, 1990; antígeno de tumor epitelial de cáncer de mama, Hareuveni, 1990, el carcinoma de mama, Hull, 1989), mucinas de tumor mamario
 45 (como el adenocarcinoma mamario murino, Fung, 1990), mucinas de carcinoma, como las mucinas que aparecen en los riñones (por ejemplo, en el carcinoma de células renales) en los ovarios (por ejemplo, el antígeno de glándula sebácea asociado a carcinoma de ovario, Layton, 1990), en la vejiga, en el colon (por ejemplo, sialosil-Tn en el cáncer colorrectal, Itzkowitz, 1990), mucinas de tumor pancreático (Lan, 1990), de vesícula biliar, de vejiga, de colon (por ejemplo, las mucinas de la mucosa de colon con tumor maligno, Torbin, 1980) y algunos tejidos pulmonares, las
 50 mucinas de melanoma (por ejemplo, antígeno asociado a melanoma, Kahn, 1991), mucinas de células epiteliales tumorales, mucinas asociadas a leucemia, antígeno carcinoembrionario o cualquier otra mucina asociada a células anormales según las características conocidas de las mucinas asociadas a cáncer o mucinas anormales, tales como la glucosilación anormal (Hakomori, 1989, y Singhal, 1990).

55 Epítipos de MUC1

- El producto génico MUC1 humano se ha designado con diversos nombres, entre ellos MAM6, antígeno de mucina de leche; globulina de grasa de leche humana (HMFG); antígeno epitelial mamario humano, CA 15-3, CA 27.29; episialina; y mucina epitelial polimórfica (PEM) (descrita en Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1988) (para las citas
 60 completas de las referencias no citadas completamente en este apartado, véase Longenecker *et al.*, 08/229, 606). Esta mucina está fuertemente expresada en las células cancerosas de mama humana (Gendler *et al.*, 1988), de páncreas (Lan *et al.*, 1990) y de determinadas células ováricas (Layton *et al.*, 1990). A pesar de que las mucinas codificadas MUC1 expresadas en diversos cánceres contienen la misma secuencia peptídica nuclear repetida en tándem, existen diferencias de glucosilación (Gendler *et al.*, 1988; Lan *et al.*, 1990). Debido a la infraglicosilación
 65 que se da en las células cancerosas, las moléculas de MUC1 presentes en las mismas expresan epítipos crípticos que no se expresan (por ejemplo, son crípticos) en las células epiteliales normales.

MUC1 es el primer gen de mucina asociado a cáncer que se ha clonado y mapeado (Gendler *et al.*, 1990), y recientemente se ha transfectado en una línea celular mamaria murina, la 410.4 (Lalani *et al.*, 1991). Las células 410.4 transfectadas con MUC1 expresan el producto del gen MUC1 en la superficie celular.

5 El patrón de glucosilación es parecido, aunque distinto, al de las mucinas derivadas de células malignas que expresan los mismos epítomos peptídicos crípticos expresados por MUC1 asociado a cáncer humano (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1988). Lalani y colaboradores (1991) han examinado la inmunogenicidad de los transfectantes 410.4 en ratones. Estos investigadores han demostrado que los ratones que rechazaban una dosis baja de células 410.4 transfectadas no desarrollaban tumores tras un trasplante posterior de una dosis elevada de células 410.4 transfectadas, aunque no se observó ningún efecto en el desarrollo tumoral de las células 410.4 naturales sin transfectar (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1988). (Para las citas completas, véase Longenecker5-USA y también las referencias 4-11 del mismo).

15 Se ha puesto de manifiesto que las vacunas contra el cáncer compuestas por antígenos peptídicos sintéticos que imitan las secuencias peptídicas crípticas de MUC1 en las células cancerosas son capaces de inducir una inmunoterapia eficaz contra el cáncer contra las células tumorales que expresan MUC1 en un modelo murino. Finn y colaboradores han puesto de manifiesto que los pacientes de cáncer son capaces de producir linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos no restringidos por el MHC que reconocen los epítomos peptídicos expresados en las moléculas MUC1 de las células cancerosas. (véanse las referencias 12 y 53-55 de Longenecker5-USA). De hecho, se ha puesto de manifiesto que la secuencia de MUC1 SAPDTRP (AA 4-10 de SEC ID n°: 10) es a la vez un epítomo de linfocito T y de linfocito B. Se ha puesto de manifiesto que la inmunización de chimpancés con antígenos sintéticos de MUC1 induce el desarrollo de anticuerpos específicos y CMI contra MUC1.

25 La mucina epitelial humana MUC1 está sobreexpresada en más del 90% de los carcinomas de mama, ovario y páncreas, y en estos tumores se encuentra anormalmente glucosilada. El anticuerpo SM3 se une a la proteína nuclear de MUC1; también se une a las glucoproteínas del tumor, presumiblemente debido a que el epítomo SM3 está expuesto a consecuencia de la glucosilación anormal anteriormente mencionada.

30 La secuencia de aminoácidos de MUC1 humana está disponible en la base de datos SWISS-PROT con el código P15941. El número de repeticiones es altamente polimórfico. Varía entre 21 y 125 en la población del norte de Europa. Los alelos más frecuentes contienen 41 y 85 repeticiones. El icosapéptido repetido en tándem presenta polimorfismo en tres posiciones, tal como se indica entre corchetes: P<sub>1</sub>APG<sub>2</sub>STAP[P/A/Q/T]AHGVTSAP[D/E][T/S]R (SEC ID n°: 5). Los polimorfismos comunes son la doble mutación coordinada DT -> ES y las sustituciones puntuales P -> A, P -> Q y P -> T. La sustitución más frecuente DT -> ES se produce hasta en el 50% de las repeticiones. Para MUC1 de ratón, véase SWISS-PROT Q02496.

40 Moller *et al.*, Eur. J. Biochem. 269:1444-55 (marzo de 2002) han utilizado espectroscopia de RMN para estudiar la unión del anticuerpo SM3 al epítomo de MUC1 pentapeptídico PDTRP y al glucopentapéptido relacionado en el que la treonina está alineada en O con alfa-D-GalNAc. Moller ha puesto de manifiesto que el PDT interactúa con el anticuerpo SM3 más intensamente que el RP, lo que sugiere que el RP podría ser más tolerante a la mutación. En cambio, el glucopéptido interactúa con el SM3 utilizando todos sus aminoácidos, aunque el efecto más fuerte se ha puesto de manifiesto con Pro1. Se han llevado a cabo estudios de acoplamiento que se han podido realizar con péptidos mutantes cuyas estructuras tridimensionales eran deducibles o estaban determinadas.

45 Hiltbold *et al.*, Cancer Res., 58:5066-70 (1998), han puesto de manifiesto que los linfocitos T CD4+ tratados *in vitro* con un péptido de MUC1 sintético de 100 aminoácidos, que representa cinco repeticiones en tándem no glucosiladas y está presentado por las células dendríticas, producen IFN-gamma y tienen una actividad citolítica moderada. También han identificado una secuencia peptídica nuclear, PGSTAPPAHGVT (SEC ID n°: 6), que desencadena esta respuesta cuando está presentada por HLA-DR3.

50 Heukamp *et al.*, Int. J. Cancer, 91:385-92 (2001) han inducido una inmunidad CTL específica de péptido en ratones transgénicos A2/K(b) con tres péptidos derivados de MUC1 que están mapeados fuera de la región de repeticiones en tándem de número variable. Estos péptidos son MUC(79-87)(TLAPATEPA)(SEC ID n°: 7), MUC(167-175)(ALGSTAPPV) (SEC ID n°: 8) y MUC (264-72) (FLSFHISNL) (SEC ID n°: 9). Todos cumplen con el motivo de unión a péptidos para HLA-A\*0201.

Engelmann *et al.*, J. Biol. Chem. 276:27764-9 (julio de 2001) han señalado que existen tres variantes de secuencia en la región de repeticiones en tándem de MUC1. La variante 1 sustituye DT por ES.

60 Soares *et al.*, J. Immunol. 166: 6555-63 (junio de 2001) han utilizado un péptido de MUC1 de siete repeticiones en tándem para desencadenar una respuesta inmunitaria. Cuando el péptido se administró a las células dendríticas, únicamente indujo inmunidad de linfocitos T. Cuando se inyectó junto con un péptido soluble, también se desencadenó la producción de Ac.

65

Von Mensdorff-Pouilly *et al.*, J. Clin. Oncol. 18:574-83 (febrero de 2000) han utilizado un péptido de MUC1 de triple repetición en tándem conjugado con BSA en un inmunoensayo de los niveles de anticuerpos anti-MUC1 en pacientes de cáncer de mama.

5 Denton *et al.*, Pept. Res. 7:258-64 (septiembre/octubre de 1994), han unido colinealmente un epítipo peptídico de linfocito B de mucina MUC1 a un epítipo murino de linfocitos T conocido en las dos orientaciones T-B y B-T. Brossart *et al.*, Blood, 93:4309-17 (junio de 1999) han analizado la secuencia de aminoácidos de MUC1 e identificado dos nuevos péptidos con una elevada probabilidad de unión a la molécula HLA-A2. Uno de ellos estaba en la región de repeticiones en tándem de número variable, y el otro fuera de ella.

10 Carmon *et al.*, Int. J. Cancer, 85:391-7 (febrero de 2000) han evaluado el potencial antitumoral de los péptidos seleccionados por el motivo HLA-A2.1 de las regiones de repetición no en tándem de la molécula. Véase también Pietersz *et al.*, Vaccine, 18:2059-71 (abril de 2000).

15 Keil *et al.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 40:366-9 (enero de 2001) han conjugado un epítipo MUC1 con un epítipo de toxina tetánica.

Von Mensdorff-Pouilly *et al.*, Int. J. Cancer, 86:702-12 (junio de 2000) han señalado que las secuencias epitópicas mínimas más frecuentes de los anticuerpos naturales IgG e IgM anti-MUC1 eran RPAPGS (AA 9-14 de SEC ID n°: 10), PPAHGVT (AA 4-10 de SEC ID n°: 11; equivalente a los AA 17-20 seguidos de los AA 1-3 de SEC ID n°: 10) y PDTRP (AA 6-10 de SEC ID n°: 10). La vacunación con péptidos de MUC1 induce títulos elevados de anticuerpos IgM e IgG predominantemente dirigidos, respectivamente, a las secuencias PDTRPAP (AA 6-12 de SEC ID n°: 10) y STAPPAHGV (AA 1-9 de SEC ID n°: 2) de la repetición en tándem. Los anticuerpos naturales anti-MUC de pacientes con cáncer de mama reaccionan más fuertemente con péptidos glucosilados GalNAc que con péptidos no glucosilados.

Véase también la solicitud EP 1.182.210; Sandrin, USP 6.344.203; Finn, USP 5.744.144.

30 Véase también Petrakou *et al.*, "Epitope Mapping of Anti-MUC1 Mucin protein Core Monoclonal Antibodies" (21-29); Imai *et al.*, "Epitope Characterization of MUC1 Antibodies" (30-34), Schol *et al.*, "Epitope Fingerprinting Using Overlapping 20-mer peptides of the MUC1 Tandem repeat sequence" (35-45), and Blockzjil, "Epitope characterization of MUC1 Antibodies" (46-56), todos ellos incluidos en ISOBM TD-4 International Workshop on Monoclonal Antibodies against MUC1 (noviembre de 1996), reeditado en Tumor Biology, 19 Suppl. 1: 1-152 (1998).

35 Véase también Von Mensdorff-Pouilly *et al.*, "Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein," Int J. Biol. Markers, 15:343-56 (2000).

40 En consecuencia, la presente invención se refiere a glucolipopéptidos que comprenden por lo menos un epítipo nativo de linfocitos B y/o T de MUC1, o como mínimo un epítipo mutante esencialmente idéntico a un epítipo nativo de este tipo. El mismo puede comprender además una secuencia de MUC1 adicional que no forma parte de ningún epítipo.

45 Preferentemente, el glucolipopéptido comprende un epítipo de linfocitos B y un epítipo de linfocitos T de MUC1 (que, en cada caso, puede ser un epítipo natural o un mutante permitido del mismo), y dichos epítipos pueden ser idénticos, solapados o distintos. Los epítipos de linfocitos T y de linfocitos B de un antígeno se pueden solapar. Por ejemplo, en MUC1, la secuencia SAPDTRP (AA 4-10 de SEC ID n°: 10) es un epítipo de linfocito T, mientras que la secuencia PDTRP (AA 6-10 de SEC ID n°: 10) no es sino un epítipo de linfocito B.

50 El mismo puede comprender además epítipos adicionales de linfocitos B y/o epítipos adicionales de linfocitos T. Los epítipos de linfocitos B pueden ser iguales o diferentes, así como los epítipos de linfocitos T pueden ser iguales o diferentes.

55 Si el inmunógeno según la presente invención comprende una secuencia relacionada con MUC1, como mínimo esencialmente idéntica a una secuencia de MUC1 de como mínimo cinco aminoácidos, dicha secuencia relacionada con MUC1 puede comprender uno o más sitios de glucosilación que se encuentran en la correspondiente secuencia de MUC1. La misma puede diferir de la correspondiente secuencia de MUC1 en el número de sitios potenciales de glucosilación a consecuencia de una mutación, o puede tener el mismo número de sitios potenciales de glucosilación.

60 Los sitios potenciales de glucosilación pueden ser (1) sitios ya glucosilados en la glucoproteína tumoral derivada de MUC1, (2) sitios potencialmente glucosilables pero no glucosilados en la glucoproteína tumoral en cuestión, y/o (3) sitios extraños a dicha glucoproteína. Análogamente, los sitios de glucosilación pueden ser (1) sitios ya glucosilados en la glucoproteína tumoral derivada de MUC1, (2) sitios potencialmente glucosilables pero no glucosilados en la glucoproteína tumoral en cuestión, y/o (3) sitios extraños a dicha glucoproteína. Ninguno, uno, algunos o todos los sitios de glucosilación normalmente glucosilados en la glucoproteína tumoral derivada de MUC1 pueden estar glucosilados en el inmunógeno según la presente invención.

MUC1 es un antígeno polimórfico caracterizado por un número variable (normalmente 21-125, particularmente 41 u 85) de repeticiones perfectas e imperfectas con la secuencia siguiente:

5 GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH (SEC ID n°: 10)

Puesto que hay múltiples repeticiones de esta secuencia, el punto de partida que se muestra es arbitrario y un epítopo puede abarcar dos repeticiones.

10 En consecuencia, los inmunógenos según la presente invención pueden comprender la secuencia de repetición completa anteriormente mencionada o una permutación cíclica de la misma. Además, pueden comprender dos o más copias de la repetición mencionada anteriormente o una permutación cíclica de la misma. Así, en los compuestos 1a y 1b, hay dos copias de una permutación cíclica (que empieza en TSA... y termina en HGV) de la secuencia anterior, seguida de la secuencia SSL no relacionada con la misma.

15 Cada epítopo de MUC1 puede corresponder a un epítopo de la región de repeticiones en tándem de número variable o a un epítopo situado fuera de la misma. Ejemplos del primer caso incluyen las secuencias RPAPGS (AA 9-14 de SEC ID n°: 10), PPAHGVT (AA 4-10 de SEC ID n°: 11) y PDTRP (AA 6-10 de SEC ID n°: 10). La secuencia PDTRPAPGS (AA 6-14 de SEC ID n°: 10) tiene un interés particular, dado que incluye dos epítopos que se solapan. La secuencia PDTRP forma la punta de una protuberancia expuesta a los disolventes que forma un giro beta de tipo II.

20 Entre los epítopos que no pertenecen a la región VNTR se incluyen MUC(79-87)(TLAPATEPA) (SEC ID n°: 7), MUC(167-175)(ALGSTAPPV) (SEC ID n°: 8) y MUC(264-72)(FLSFHISNL) (SEC ID n°: 9).

25 Preferentemente, el glucolipopéptido comprende el epítopo polimórfico P[D/E][T/S]RP o un mutante sustancialmente idéntico del mismo. Más preferentemente, comprende PDTRP o un mutante sustancialmente idéntico del mismo.

30 En algunas formas de realización, el glucolipopéptido comprende por lo menos una secuencia de 20 aminoácidos (una repetición en tándem eficaz) que difiere únicamente en una o más sustituciones conservativas y/o una única sustitución no conservativa de una repetición en tándem de MUC1, y comprende un epítopo de la región de repeticiones en tándem de número variable de MUC1 (idéntico o un mutante permitido). Preferentemente, si se diferencia en algo, lo hace únicamente en sustituciones conservativas, más preferentemente en no más de una única sustitución conservativa, y de la forma más preferente es idéntica a dicha repetición en tándem. Cabe señalar que las repeticiones en tándem de MUC1 son imperfectas y, por lo tanto, la secuencia podría ser idéntica a una repetición pero no a otra. Además, existen variaciones alélicas en estas repeticiones, por lo que la secuencia podría ser idéntica a la secuencia para un alelo pero no para otro.

40 En un subgrupo de estas formas de realización, el glucolipopéptido comprende más de una repetición en tándem eficaz que no se solapan, por ejemplo, dos (para un total de 40 aminoácidos), tres (para un total de 60 aminoácidos), cuatro, cinco, seis, siete u ocho. Estas repeticiones en tándem eficaces pueden ser idénticas, pero no tienen que serlo necesariamente. (A título comparativo, téngase en cuenta que en la mucina MUC1 humana natural el número de repeticiones es habitualmente de 21-125.)

45 Además de una o más repeticiones en tándem eficaces, la parte peptídica del glucolipopéptido puede comprender subsecuencias adicionales de aminoácidos. Si es así, dichas subsecuencias pueden comprender epítopos adicionales que pueden ser epítopos de la región de repetición en tándem variable de MUC1 (a la que falta una repetición en tándem eficaz), epítopos de MUC1 de fuera de esa región o epítopos de los antígenos de cáncer. También puede incluir un elemento inmunomodulador, véase Longenecker *et al.*, 08/229, 606.

50 Preferentemente, una o más de las serinas y/o treoninas de la repetición en tándem de MUC1 está glucosilada, preferentemente con Tn o sialil-Tn. En la mucina MUC1 natural humana hay cinco sitios normales de glucosilación por repetición. En MUC1 normal, una media de 2,6 de estos cinco sitios están efectivamente ocupados. El número medio de aminoácidos glucosilados por repetición puede ser inferior, igual o superior al valor "natural".

55 Preferentemente, el glucolipopéptido comprende en su región carboxiterminal la secuencia SSL, en la que las dos serinas están lipidadas.

#### Identificación de epítopos de procedencia natural

60 Los epítopos de origen natural se pueden identificar por un proceso de división y análisis. Se empieza con una proteína conocida de la que se conoce la naturaleza antigénica o inmunógena. A continuación, se analiza la actividad inmunológica en fragmentos de la proteína. Estos fragmentos se pueden obtener mediante el tratamiento de la proteína con un agente proteolítico, o, si se conoce la secuencia peptídica, se pueden sintetizar péptidos más pequeños que correspondan a subsecuencias de la proteína. Los fragmentos analizados pueden abarcar la

65



secuencia completa de la proteína o únicamente una parte de la misma, y pueden ser colindantes, solapados o separados.

5 Por ejemplo, se puede preparar una serie de péptidos de veinte aminoácidos con solapamiento progresivo de 5 aminoácidos, por ejemplo los residuos 1-20, 16-35, 31-50, etc., del polipéptido original. La longitud de los péptidos y el grado de solapamiento quedan a discreción del responsable del ensayo. La superposición es preferentemente de como mínimo cinco aminoácidos, o, más generalmente, igual a la longitud del epítipo de interés más pequeño.

10 Los fragmentos se preparan fácilmente si se conoce la secuencia de aminoácidos del péptido; a continuación se puede construir una secuencia de codificación para cualquier fragmento deseado y el fragmento se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. Si el fragmento es pequeño, también se puede preparar por síntesis peptídica en fase líquida o sólida.

15 Si no se dispone de información sobre la secuencia, se puede fragmentar un antígeno polipeptídico con agentes de escisión específicos de lugar, tales como el bromuro de cianógeno, el ácido yodosobenzoico y la tripsina. Se pueden obtener fragmentos más grandes mediante el uso de agentes con sustratos más raros o utilizando los agentes en concentraciones bajas, a temperaturas más bajas o con tiempos de reacción menores. Se pueden obtener fragmentos más pequeños mediante el uso simultáneo de combinaciones de agentes o utilizando altas concentraciones, temperaturas más altas o tiempos de reacción más prolongados y, opcionalmente, utilizando agentes caotrópicos para facilitar el desplegamiento del péptido. Los fragmentos, grandes o pequeños, se examinan. Aquellos que arrojan un resultado positivo se pueden fragmentar más a fin de localizar el epítipo.

20 Si alguno de los fragmentos es inmunológicamente activo, se puede someter a su vez al proceso de división y análisis, y el procedimiento se puede proseguir hasta que se han identificado las secuencias inmunológicamente activas de longitud mínima. Este procedimiento se puede utilizar para identificar epítopos de linfocitos B o linfocitos T, aunque los ensayos, por supuesto, son distintos en cada caso. Geysen da a conocer el cribado sistemático de la actividad inmunológica de todos los posibles fragmentos oligopeptídicos (pref. 6-10 aminoácidos) colindantes o solapados de una proteína concreta con el fin de identificar los epítopos lineales. Véase el documento WO 84/03564.

25 El número de fragmentos a examinar se puede reducir si se conoce la secuencia de aminoácidos, ya que se puede utilizar para predecir qué fragmentos tienen mayor probabilidad de actuar como epítopos de respuesta humoral o de linfocitos T. En general, estos procedimientos de predicción funcionan mediante la recopilación de una base de datos de sitios antigénicos humorales o de linfocitos T conocidos (y según el caso una segunda base de datos de secuencias de las que se sabe que no son epítopos humorales ni de linfocitos T) y comparando dichos sitios con (a) estructuras tridimensionales conocidas de las proteínas en cuestión, y/o (b) la secuencia de aminoácidos conocida, particularmente en las cercanías del sitio.

30 Cuando se analiza la actividad epitópica humoral o de linfocitos T en un gran número de fragmentos, es posible utilizar una estrategia de tipo «divide y vencerás» para reducir al mínimo el número de animales o cultivos que se requieren. Los fragmentos se pueden dividir en dos o más grupos conocidos, y todos los fragmentos de un grupo se pueden administrar a un único animal o cultivo. Si no se observa ninguna respuesta inmunitaria, todos los fragmentos han dado negativo. Si la mezcla de fragmentos da positivo, en cambio, se puede dividir en subgrupos más pequeños y a continuación repetir el proceso.

35 Los fragmentos se pueden analizar contra linfocitos T de un único haplotipo o de varios haplotipos diferentes.

Los epítopos de linfocitos T de procedencia natural se pueden recuperar disociándolos de sus complejos con las moléculas de MHC de clase I y secuenciándolos a continuación, por ejemplo, mediante técnicas de espectroscopia de masas.

40 Una vez identificado un epítipo, los epítopos funcionalmente equivalentes se pueden identificar mediante una combinación de conocimientos sobre similitudes entre aminoácidos y la variación sistemática de la secuencia del epítipo.

#### 55 Predicción de epítopos de linfocitos B (humorales) y linfocitos T

Es posible predecir la ubicación de epítopos peptídicos de linfocitos B o linfocitos T si se dispone de una secuencia de aminoácidos. Los epítopos de linfocitos B suelen encontrarse en regiones con una elevada hidrofilia media. Véase Hopp and Wood, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 78: 3824 (1981); Jameson y Wolf, CABIOS, 4: 181 (1988).

60 Los epítopos de linfocitos T se pueden predecir sobre la base de secuencias consenso conocidas para los péptidos unidos a moléculas de MHC de clase I de las células de un determinado haplotipo. Véase, por ejemplo, Slingluff, WO98/33810, especialmente las páginas 15-16; Parker *et al.*, "Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side chains", J. Immunol. 152: 163 (1994).

65

Margalit *et al.*, "Prediction of Immunodominant Helper T Cell Antigenic Sites from the Primary Sequence", *J. Immunol.*, 138=2213-29 (1987) han identificado (con el programa AMPHI) un subconjunto de epítomos de linfocitos T que se caracterizan por la presencia de una estructura anfipática. En el algoritmo de Margalit, la secuencia de aminoácidos se convierte en una secuencia de valores de hidrofobia (la escala preferente es la de Fauchere y Pliska) y esta secuencia se divide en bloques solapados (preferentemente de longitud 11). En dichos bloques, se examinó la periodicidad de la hidrofobia compatible con una estructura helicoidal anfipática regular; el procedimiento de espectro de potencia preferente es una regresión por mínimos cuadrados de una curva sinusoidal. Margalit ha optado por buscar un segmento de diversos bloques conservativos que tiene una puntuación anfipática (suma de los índices anfipáticos de los bloques) mayor que 4.

Se pueden desarrollar otros algoritmos mediante el estudio de la base de datos de epítomos de linfocitos T.

#### Epítomos mutantes

En términos generales, además de los epítomos idénticos a los epítomos de procedencia natural específicos para una enfermedad o un tumor, la presente invención comprende epítomos diferentes aunque sustancialmente idénticos a dichos epítomos, y, por lo tanto, específicos para una enfermedad o un tumor por ellos mismos. También comprende epítomos que no son sustancialmente idénticos a un epítomo de origen natural pero que presentan reactividad cruzada con este último gracias a su similitud en la conformación tridimensional.

Una clase de modificaciones permitidas de la secuencia de aminoácidos de un resto peptídico son las sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones conservativas sustituyen un aminoácido por otro de tamaño, carga y polaridad parecidos; estos aminoácidos son menos propensos a alterar significativamente la conformación del péptido. Los tipos de sustituciones que se pueden llevar a cabo en la molécula proteínica o peptídica según la presente invención se pueden basar en el análisis de la frecuencia de cambios de aminoácidos que se dan entre proteínas homólogas de diferentes especies, como los indicados en la tabla 1-2 de Schulz *et al.*, *supra*, y en las figuras 3-9 de Creighton, *supra*. Sobre la base de dicho análisis, las sustituciones conservativas se definen en el presente documento como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

#### TABLA V

1. Residuos alifáticos pequeños, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2. Residuos polares con carga negativa y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;
3. Residuos polares con carga positiva: His, Arg, Lys;
4. Residuos alifáticos grandes, apolares o ligeramente polares: Met, Leu, Ile, Val (Cys); y
5. Residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

Los grupos 1 a 3 están relacionados hasta cierto punto y las mutaciones dentro de los mismos se pueden considerar semiconservativas. Del mismo modo, las mutaciones dentro de los grupos 4-5 se pueden considerar semiconservativas.

Los residuos Pro, Gly y Cys se encuentran entre paréntesis por su papel especial en la arquitectura de las proteínas. La Pro da rigidez a la cadena peptídica y tiene tendencia a interferir en la formación de la hélice alfa. La Gly da flexibilidad a la cadena peptídica y a menudo se encuentra en "bucles" entre hélices alfa o hebras beta. Los grupos tiol de los residuos de cisteína se pueden oxidar y formar enlaces disulfuro entre residuos cisteínicos no adyacentes.

Dentro de los grupos anteriores, las siguientes sustituciones se consideran "muy conservativas":

Asp/Glu  
His/Arg/Lys  
Phe/Tyr/Trp  
Met/Leu/Ile/Val

Las sustituciones semiconservativas se definen como intercambios entre dos de los grupos (I) a (V) anteriores que se limitan al supergrupo (A), que comprende los grupos (I), (II) y (III) anteriores, o al supergrupo (B), que comprende los grupos (IV) y (V) anteriores. Además, la Ala se considera una sustitución semiconservativa para todos los aminoácidos que no sean del grupo (I).

Un epítomo se considera sustancialmente idéntico a un epítomo de referencia (por ejemplo, un epítomo de origen natural), si tiene por lo menos el 10% de la actividad inmunitaria del epítomo de referencia y difiere del mismo en no más de una sustitución no conservativa (con las excepciones indicadas a continuación). Preferentemente, todas las

sustituciones no conservativas son sustituciones semiconservativas. Preferentemente, no hay ninguna sustitución no conservativa.

5 Puede haber un número cualquiera de sustituciones conservativas. Preferentemente, no hay más de tres sustituciones de este tipo, más preferentemente no más de dos, y aún más preferentemente no más de una.

10 Si se trata de un epítipo de CTL, puede incorporar además sustituciones no conservativas sugeridas por un motivo de unión conocido de la molécula de MHC pertinente. Kast *et al.*, J. Immunol, 152:3904-12 (1994) establece motivos de unión peptídicos específicos de HLA-A para las moléculas HLA A1, A2.1, A3, A11 y A24. Engelhard *et al.*, en Sette, ed., Naturally Processed Peptides, 57:39-62 (1993), han explorado las características que determinan la unión a HLA-A2.1 y HLA-B7. Véase también Hobohim *et al.*; Eur. J. Immunol., 23:1271-6 (1993); Kawakami *et al.*, J. Immunol., 154:3961-8 (1995). Con base en estas y otras fuentes, entre los AA preferentes y tolerados para diversas moléculas HLA se incluyen (aunque sin limitarse a los mismos) los siguientes:

Tabla A			
Molécula	Posición	Preferencia AA	AA tolerado
A1	2	T, S, M	
	3	D, E	A, S
	9	Y	
A2.1	2	L, M	I, V, A, T
	9	L, V, I	A, M, T
A3	2	L, M, I, V, S A, T, F	C, G, D
	9	K, R, Y, H, F	A
A11	2	M, L, I, V, S A, T, G, N	C, D, F
	9	K	R, H, Y
A24	2	Y, F, W	M
	9	F, L, I, W	
B7	1	A	M, S, R, L
	2	P	V
	3	R	A, K, S, M
	9	L	I, A, V
B8	3	K	No se conoce
	5	K	No se conoce
	9	L	No se conoce
B27	2	R	No se conoce
	9	R, K, H	No se conoce
B35	2	P	No se conoce
	9	Y	No se conoce
B53	2	P	No se conoce

15 Los estudios han puesto de manifiesto una mayor variabilidad de AA para las posiciones no incluidas en la lista que para las incluidas. En cuanto a las posiciones incluidas, los AA no incluidos en la lista pueden ser tolerados, sobre todo si son sustituciones conservativas o semiconservativas para AA "preferentes" o "tolerados".

20 Resulta evidente que las sustituciones muy conservativas son menos propensas a alterar la actividad que otras sustituciones conservativas, las sustituciones conservativas son menos propensas a alterar la actividad que las sustituciones sólo semiconservativas y las sustituciones semiconservativas menos que otras sustituciones no conservativas. Además, las sustituciones puntuales son menos propensas a alterar la actividad que las mutaciones múltiples.

25 Aunque un mutante de sustitución, ya sea puntual o múltiple, de los péptidos de interés puede no tener la potencia del péptido original, puede resultar útil.

30 Las sustituciones no se limitan a los aminoácidos codificados genéticamente, ni siquiera a los de procedencia natural. Cuando el epítipo se prepara mediante síntesis peptídica, el aminoácido deseado se puede utilizar directamente. Alternativamente, un aminoácido codificado genéticamente se puede modificar haciéndolo reaccionar

con un agente orgánico derivatizante capaz de reaccionar con determinadas cadenas laterales o residuos terminales.

5 Un aminoácido no codificado genéticamente se considera una sustitución conservativa para un aminoácido codificado genéticamente si es más parecido en tamaño (volumen) e hidrofobia (lipofilia) al aminoácido original y a otros aminoácidos del mismo grupo de intercambio que a aminoácidos codificados genéticamente pertenecientes a otros grupos de intercambio.

10 Los epítomos peptídicos sustancialmente idénticos se pueden identificar mediante diversas técnicas, algunas de las cuales no dependen del conocimiento preexistente del motivo de unión. De este modo, en la técnica se conoce el hecho de que se pueden sintetizar todos los posibles mutantes de sustitución puntual de un epítomo peptídico conocido. Para un nonapéptido, hay  $(20 \times 9 - 1 = 179)$  mutantes de este tipo. Geysen *et al.*, Proc Nat. Acad. Sci. (USA), 81:3998-4002 (1984). Si bien los efectos de diferentes sustituciones no siempre son aditivos, es razonable esperar que dos sustituciones puntuales favorables o neutras llevadas a cabo en residuos con diferentes posiciones en el epítomo se puedan combinar muchas veces de manera segura.

15 También se sabe que se pueden mutar aleatoriamente uno o más residuos de un péptido de tal modo que pueda aparecer en esa posición de residuo cualquiera de los veinte aminoácidos posibles, o un conjunto seleccionado de los mismos (por ejemplo, todas las sustituciones conservativas) y llevar a cabo un análisis para encontrar mutantes con una actividad inmunitaria deseada. Parmley y Smith, Gene, 73:305-18 (1988); Devlin *et al.*, Science, 25:49:404-6 (1990); Scott y Smith, Science, 249:386-90 (1990); Greenwood *et al.*, J. Mol. Biol., 220:821-7 (1991); Cwirla *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 87:6378-82 (1990); Stephen y Lane, J. Mol. Biol., 225:577-83 (1992); Barrett *et al.*, Anal. Biochem., 204:357-64 (1992); Ladner, USP 5.223.409.

20 Por ejemplo, se pueden explorar todas las posibles sustituciones conservativas de un nonapéptido. Existen 3-5 posibilidades en cada posición; suponiendo un promedio de 4, el espacio de secuencia sería de  $4^9$ , o aproximadamente 250.000. Una biblioteca combinatoria puede fácilmente explorar un espacio de secuencia de  $10^8$  o más.

25 Se pueden identificar epítomos peptídicos de procedencia natural o no si se dispone de un anticuerpo u otro receptor adecuado mediante el cribado de una biblioteca combinatoria de péptidos para encontrar péptidos que se unen a la diana.

30 Se pueden identificar epítomos peptídicos humorales mediante el cribado de una biblioteca combinatoria de fagos peptídicos para encontrar uniones específicas a un anticuerpo monoclonal diana del que se sabe que reconoce el antígeno de interés. Preferentemente, la biblioteca se somete a un precibado para eliminar péptidos que se unen al anticuerpo en un sitio que no sea el sitio de unión epitópico del anticuerpo; esto se puede hacer mediante la eliminación de los fagos que se unen a un segundo anticuerpo de control del mismo isotipo.

35 Análogamente, para identificar epítomos peptídicos de CTL, se puede sintetizar una familia de mutantes relacionados con sustituciones puntuales o múltiples, presentar la mezcla a la línea celular linfoblastoide T2 con HLA-A2.1 (u otra línea celular capaz de presentar epítomos específicos de CTL), y exponer las células T2 a CTL con la especificidad deseada. Si se lisan las células T2, los epítomos eficaces se pueden identificar por recuperación directa a partir de las células T2 o por un proceso progresivo de análisis de subconjuntos de mezclas de los péptidos eficaces. Se describen procedimientos para la preparación de péptidos degenerados en Rutter, USP 5.010.175, Haughten *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 82:5131-35 (1985), Geysen *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 81:3998-4002 (1984); W086/06487; W086/00991.

40 Gavin *et al.*, Eur. J. Immunol., 24:2124-33 (1994) han aplicado una estrategia de mutagénesis múltiple en su búsqueda de péptidos que imiten un epítomo H-Y.

45 Se puede utilizar mutagénesis múltiple para cribar unas cuantas posiciones intensamente o un mayor número de posiciones de forma más difusa. Un procedimiento consiste en explorar al menos un miembro representativo de cada tipo de aminoácido en cada posición, por ejemplo, un aminoácido representativo de cada uno de los grupos de intercambio I-V tal como se definen a continuación. Preferentemente, se exploran la Gly y la Pro además de otro residuo del grupo I. Preferentemente, como mínimo uno de los residuos examinados es un residuo que establece enlaces por puente de hidrógeno. Si un mutante positivo presenta un determinado aminoácido representativo, los aminoácidos parecidos se pueden explorar a continuación en una biblioteca. Por ejemplo, si una sustitución de Phe mejora la unión, la Tyr y el Trp se pueden examinar en la siguiente ronda.

50 Para determinar qué residuos variar, el experto en la materia también puede establecer comparaciones de las secuencias de los péptidos asociados a MHC procesados naturalmente y puede obtener estructuras tridimensionales de los complejos MHC:péptido:TCR a fin de identificar los residuos que participan en la unión con MHC o TCR. Dichos residuos se pueden dejar como están o someterlos juiciosamente a mutación para intentar mejorar la unión con MHC o TCR.

El resto peptídico puede ser un péptido consenso, por ejemplo, un péptido distinto de las secuencias peptídicas conocidas nucleares de mucinas asociadas a cáncer, pero derivadas de una combinación de secuencias peptídicas conocidas nucleares de mucinas asociadas a cáncer. Dichos péptidos consenso se pueden obtener por modelización molecular, opcionalmente en combinación con análisis de hidrofobia y/o adaptación a hélices modelo, como ejemplos no limitativos. Este tipo de modelización se puede llevar a cabo según etapas de procedimiento conocidas por medio de algoritmos de modelización, como por ejemplo, aunque sin limitarse a los mismos, ECEPP, INSIGHT, DISCOVER, CHEMDRAW, AMBER, FRODO y CHEM-X. Dichos algoritmos comparan péptidos para determinar probables fragmentos consenso polipeptídicos alternativos adecuados.

#### 10 Formulaciones liposómicas

Los liposomas son vesículas microscópicas formadas por una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos. Véase, por ejemplo, Bakker-Woudenberg *et al.*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Suppl.1): S61 (1993) y Kim, Drugs, 46: 618 (1993). Dado que los liposomas se pueden formular con moléculas lipídicas que se encuentran en las membranas celulares naturales, en general se pueden administrar de forma segura y son biodegradables.

Los liposomas son partículas globulares formadas por el encaje físico de lípidos polares que determinan la organización membranaria de dichos liposomas. Pueden formarse como vesículas monolaminares o multilaminares de diferentes tamaños. Aunque están constituidos por moléculas pequeñas sin propiedades inmunogénicas por sí mismas, se comportan como partículas macromoleculares y muestran fuertes características inmunógenas.

Según el procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser monolaminares o multilaminares y pueden variar en tamaño, con diámetros comprendidos entre aproximadamente 0,02 micrómetros y más de aproximadamente 10 micrómetros. Se pueden encapsular en liposomas una gran variedad de agentes. Los agentes hidrófobos se alojan en las bicapas y los agentes hidrófilos se alojan en el espacio o espacios acuosos interiores. Véase, por ejemplo, Machy *et al.*, Liposomes in Cell Biology and Pharmacology (John Libbey, 1987), y Ostro *et al.*, American J. Hosp. Pharm. 46: 1576 (1989).

Los liposomas se pueden adsorber prácticamente a cualquier tipo de célula y a continuación liberar el agente incorporado. Alternativamente, el liposoma se puede fusionar con la célula diana, con lo que vacía su contenido en la misma. Alternativamente, el liposoma puede sufrir endocitosis por parte de células fagocíticas. Tras dicha endocitosis tiene lugar una degradación intralisosómica de los lípidos liposómicos y la liberación de los agentes encapsulados. Scherphof *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 446: 368 (1985).

Otros liposomas adecuados que se utilizan en los procedimientos de la presente invención incluyen vesículas multilaminares (MLV), vesículas oligolaminares (OLV), vesículas monolaminares (UV), vesículas monolaminares pequeñas (SUV), vesículas monolaminares medianas (MUV), vesículas monolaminares grandes (LUV), vesículas monolaminares gigantes (GUV), vesículas multivesiculares (MVV), vesículas individuales u oligolaminares preparadas por el procedimiento de evaporación en fase inversa (REV), vesículas multilaminares preparadas por el procedimiento de evaporación en fase inversa (MLV-REV), vesículas multilaminares estables (SPLV), MLV congeladas y descongeladas (FATMLV), vesículas preparadas por procedimientos de extrusión (VET), vesículas preparadas por prensa de émbolo (FPV), vesículas preparadas por fusión (FUV), vesículas de deshidratación-rehidratación (DRV) y *bubblesomes* o "burbujosomas" (BSV). El experto en la materia es consciente de que las técnicas para la preparación de estos liposomas son bien conocidas en la técnica. Véase Colloidal Drug Delivery Systems, vol. 66 (J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., 1994).

Una "formulación liposómica" es una formulación de vesículas lipídicas creadas *in vitro* en las que se puede incorporar un antígeno según la presente invención. Así, la expresión "unido liposómicamente" se refiere a un antígeno que se encuentra parcialmente incorporado o unido a un liposoma. El inmunógeno según la presente invención puede ser un antígeno unido liposómicamente que, si no fuera por el liposoma, no sería inmunógeno, o que puede ser inmunógeno incluso sin estar asociado a un liposoma.

Se pueden incorporar diversos glucolipopéptidos en el mismo liposoma, o cada uno de ellos en un liposoma diferente, y los liposomas se pueden administrar al sujeto juntos o por separado.

Un glucolipopéptido se puede incorporar a un liposoma porque la región lipídica de la molécula se integra de forma espontánea en la bicapa lipídica. Por lo tanto, un glucolipopéptido se puede presentar sobre la "superficie" de un liposoma. Alternativamente, un péptido se puede encapsular en un liposoma. Las técnicas para la preparación de liposomas y su formulación con moléculas tales como péptidos son bien conocidas por el experto en la materia.

La formación de un liposoma requiere uno o más lípidos. Se puede utilizar cualquier lípido que, solo o combinado, sea capaz de formar una estructura liposómica de bicapa. Habitualmente, dichos lípidos incluyen por lo menos un fosfolípido. Los fosfolípidos pueden ser fosfolípidos de procedencia natural, fosfolípidos naturales modificados, fosfolípidos semisintéticos, fosfolípidos totalmente sintéticos o fosfolípidos (necesariamente sintéticos) con grupos de

cabeza no naturales. Los fosfolípidos con un mayor interés son las fosfatidilcolinas, las fosfatidiletanolaminas, las fosfatidilserinas, los fosfatidilgliceroles, los ácidos fosfatídicos y los fosfatidilinositoles.

5 Los liposomas pueden incluir lípidos neutros, de carga positiva y/o de carga negativa. La fosfatidilcolina es un fosfolípido neutro. El fosfatidilglicerol es un glucolípido con carga negativa. El cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio es un lípido sintético con carga positiva. Otro ejemplo es el 3-beta-[N-(N',N''-dimetilaminoetan)-carbamoil]-colesterol.

10 Habitualmente, los lípidos comprenden uno o más grupos de ácido graso. Estos pueden ser saturados o insaturados y variar en el número de átomos de carbono, presentando generalmente entre 12 y 24. Son fosfolípidos de interés particular los que presentan los siguientes ácidos grasos: C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 (alfa y gamma), C20:0, C20:1, C20:3, C20:4, C20:5, C22:0, C22:5, C22:6 y C24:0, donde el primer número se refiere al número total de átomos de carbono de la cadena de ácido graso y el segundo al número de dobles enlaces. Todos los ácidos grasos derivados de mamíferos o vegetales tienen un número par de átomos de carbono y sus insaturaciones están separadas en intervalos de tres átomos de carbono, cada uno con un grupo metileno.

15 El colesterol reduce la permeabilidad de las bicapas en "estado cristalino líquido".

20 Un liposoma puede incluir lípidos con una afinidad particular por determinadas células diana. Por ejemplo, la lactosilceramida tiene una afinidad específica por los hepatocitos (y quizás también por las células hepáticas cancerosas).

25 En una formulación liposómica preferente, entre los lípidos constituyentes se incluye la fosfatidilcolina. Más preferentemente se incluye también colesterol, y aún más preferentemente el fosfatidilglicerol.

30 Aprovechando las propiedades de autoencaje de los lípidos, se pueden unir uno o más inmunógenos a los lípidos polares que, a su vez, pasan a formar parte de la partícula liposómica. Cada inmunógeno comprende uno o más determinantes antigénicos (epítomos). Dichos epítomos pueden ser epítomos de linfocitos B (reconocidos por los anticuerpos) o epítomos de linfocitos T (reconocidos por los linfocitos T). El liposoma puede actuar como adyuvante en la respuesta inmunitaria desencadenada por los inmunógenos asociados. Es más probable que dicho liposoma sea más eficaz que un adyuvante que simplemente se mezcla con un inmunógeno, ya que tendrá una mayor concentración eficaz local.

35 Además, se puede unir un hapteno en el lugar del inmunógeno mencionado anteriormente. Al igual que un inmunógeno, un hapteno comprende un determinante antigénico, pero por definición es demasiado pequeño para provocar una respuesta inmunitaria por sí solo (por lo general, los haptenos son menores de 5.000 daltons). En este caso, el resto lipídico puede actuar no sólo como adyuvante, sino también como vehículo inmunógeno, con lo que el conjugado formado por el hapteno y el lípido actúa como un inmunógeno sintético (es decir, como una sustancia contra la cual se pueden desencadenar respuestas inmunitarias humorales y/o celulares).

40 Incluso aunque el lípido no actúe como vehículo inmunógeno, el hapteno unido al liposoma puede actuar como un antígeno sintético (es decir, como una sustancia que es reconocida por un componente del sistema inmunitario humoral o celular, como un anticuerpo o un linfocito T). El término "antígeno" incluye haptenos e inmunógenos.

#### 45 Adyuvantes

50 En términos generales, se entiende que un antígeno sintético de bajo peso molecular puede ser débilmente inmunógeno, lo que constituye el mayor obstáculo para el éxito de una vacuna totalmente sintética. Una forma de mejorar la inmunogenicidad de un antígeno sintético de este tipo consiste en administrarlo integrado en un medio adyuvante. Como resulta convencionalmente conocido en la técnica, los adyuvantes son sustancias que actúan en conjunción con estímulos antigénicos específicos para potenciar la respuesta específica al antígeno. Un adyuvante ideal es aquel que estimula de forma no específica el sistema inmunitario del huésped, con lo que cuando se encuentra con cualquier antígeno extraño puede producir una respuesta inmunitaria intensa y específica a ese antígeno extraño. Dicha respuesta inmunitaria intensa y específica, que también se caracteriza por su memoria, sólo se puede producir cuando se activan los linfocitos T (o células T) del sistema inmunitario del huésped.

60 La blastogénesis de los linfocitos T y la producción de IFN-g son dos parámetros importantes para medir la respuesta inmunitaria. Experimentalmente, la blastogénesis de los linfocitos T mide la síntesis de ADN que se relaciona directamente con la proliferación de linfocitos T, que a su vez es resultado directo de la activación de los linfocitos T. Por otro lado, el IFN-g es una importante citocina secretada por los linfocitos T cuando estos se activan. Por consiguiente, la blastogénesis de los linfocitos T y la producción de IFN-g indican la activación de los linfocitos T, lo que da idea de la capacidad de un adyuvante a la hora de ayudar al sistema inmunitario del huésped a inducir una respuesta inmunitaria intensa y específica frente a un antígeno proteínico.

65 El compuesto se considera adyuvante si hace aumentar de forma significativa ( $p = 0,05$ ) el nivel de blastogénesis de linfocitos T o de producción de interferón gamma como respuesta por lo menos a una combinación de

liposoma/inmunógeno, en comparación con el nivel provocado por el inmunógeno solo. Preferentemente, hace ambas cosas. Preferentemente, el aumento es como mínimo del 10%, más preferentemente como mínimo del 50%, aún más preferentemente como mínimo del 100%.

- 5 En la técnica se conocen un gran número de adyuvantes, entre los cuales se encuentran el adyuvante completo de Freund, la saponina, DETOX (Ribi Immunochemicals), Montanide ISA-51, ISA-50 e ISA-70, QS-21, monofosforil lípido A y análogos de los mismos. Un adyuvante lipídico se puede presentar en el contexto de un liposoma.

10 Las presentes vacunas liposómicas se pueden formular ventajosamente con un adyuvante. El monofosforil lípido A (MPLA), por ejemplo, es un adyuvante eficaz que provoca un aumento de la presentación de antígeno liposómico a linfocitos T específicos. Alving, C.R., Immunobiol., 187:430-446 (1993). El experto en la materia sabrá reconocer que los adyuvantes a base de lípidos, como el lípido A y sus derivados, también resultan adecuados. También se ha puesto de manifiesto que un dipéptido de muramilo (MDP), cuando se incorpora a los liposomas, hace aumentar el carácter adyuvante (Gupta RK *et al.*, "Adjuvants-A balance between toxicity and adjuvancity", Vaccine, 11, 293-306 (1993)).

15 La utilización de un adyuvante no es necesaria.

#### 20 Estrategia de síntesis

Los péptidos y glucopéptidos complejos de grado farmacéutico deben adaptar procesos innovadores que aseguren la calidad y los controles de proceso de principio a fin. No todos los aminoácidos se acoplan entre sí con la misma facilidad. Los puntos de acoplamiento entre algunos aminoácidos están estéricamente más impedidos que otros. Los aminoácidos glucosilados protegidos (figura 4) para la síntesis de glucopéptidos son más voluminosos que los aminoácidos normales con grupos protectores. La estrategia actual consiste en examinar el péptido que se pretende sintetizar e identificar los enlaces que se pueden formar con una eficiencia relativamente mayor cuando se pretenden unir dos bloques de péptidos. Dichos enlaces se mantienen hasta las últimas etapas de la síntesis a fin de mejorar la eficiencia del acoplamiento de bloques.

#### 30 *Ventajas:*

La síntesis de péptidos o glucopéptidos con cierta longitud y complejidad no se ha revelado demasiado factible a través de los procedimientos convencionales en fase sólida. La síntesis de pequeños bloques adecuadamente protegidos en fase de solución y su purificación en cada etapa es muy factible. Aunque este procedimiento resulta trabajos y largo al principio, probablemente la producción a gran escala de péptidos de grado farmacéutico se gestiona mejor a través de esta estrategia. A escala industrial también resulta rentable, ya que se prescinde de resinas caras a la vez que se facilita enormemente el cumplimiento de la normativa y los controles de calidad y procesamiento se instalan donde resulte necesario. Dichos controles son casi imposibles con los procedimientos en fase sólida.

#### 40 *Análisis retrosintético:*

Dado que se conocen la secuencia y la estructura del producto final, en teoría se puede llevar a cabo la descomposición del producto en un número mínimo de bloques adecuados de péptidos más pequeños para que su síntesis y encaje hasta alcanzar el producto final sean a la vez adecuados y eficientes (figura 5). A la hora de dividir el producto en bloques más pequeños se tienen en cuenta los siguientes criterios a fin de alcanzar una buena eficiencia de acoplamiento y una buena rentabilidad.

50 Los enlaces peptídicos que se pueden formar con relativa facilidad en la secuencia se identifican de manera que los bloques más pequeños puedan hacer uso de dichos enlaces de eficiencia elevada en las reacciones de acoplamiento de bloques. Los bloques comunes que se repiten en dos o más lugares de la secuencia reducen la carga de la síntesis.

55 El acoplamiento de aminoácidos glucosilados costosos se retrasa a las últimas etapas de la síntesis, en la medida de lo posible, con el fin de minimizar la pérdida de los mismos por acoplamiento en múltiples fases. Los grupos aminoterminal y carboxiterninal protectores se seleccionan cuidadosamente teniendo en cuenta su eliminación selectiva e independiente a voluntad. Los bloques se purifican y se analiza su integridad mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear. El desbloqueo del producto final en medio ácido se mantiene siempre que sea posible, especialmente en el caso de los hidratos de carbono. La purificación final del material desbloqueado se lleva a cabo mediante cromatografía de columna de fase inversa.

#### 60 *Caracterización de la respuesta inmunitaria*

La respuesta inmunitaria mediada por células se puede analizar *in vitro* o *in vivo*. El ensayo *in vitro* convencional consiste en un ensayo de proliferación de linfocitos T. Se toma una muestra de sangre de un individuo afectado por la enfermedad de interés, asociado con la enfermedad, o de un individuo vacunado. Por lo tanto, los linfocitos T de

dicho individuo deben estar preparados para responder con su proliferación a una nueva exposición al antígeno. Dicha proliferación requiere timidina por su papel en la replicación del ADN.

En términos generales, la proliferación de los linfocitos T es mucho más amplia que la de los linfocitos B, y se puede detectar una respuesta de linfocitos T intensa incluso en una población de células sin separar. Sin embargo, la purificación de los linfocitos T resulta deseable para facilitar la detección de una respuesta por linfocitos T. Se puede utilizar cualquier procedimiento de purificación de los linfocitos T que no altere sustancialmente su proliferación específica de antígeno. En nuestro procedimiento preferente, en primer lugar se obtienen poblaciones enteras de linfocitos mediante recolección (de la sangre, el bazo o los ganglios linfáticos) en pendientes isopícnicos con una densidad específica de 1,07, es decir, por separación de gradiente de Ficoll-Hypaque o de Percoll. A continuación, esta población mixta de células se puede purificar a fin de obtener una población de linfocitos T a través de diversos medios. La forma más sencilla de separación se basa en la unión de los linfocitos B y las poblaciones de monocitos/macrófagos a una columna de lana de nylon. La población de linfocitos T pasa a través de la lana de nylon y en un solo pase se puede obtener una población de linfocitos T con una pureza > 90%. Otros procedimientos comprenden la utilización de anticuerpos específicos para los linfocitos B y/o antígenos de monocitos en presencia de proteínas del complemento para provocar la lisis de las poblaciones de células que no sean linfocitos T (selección negativa). Otro procedimiento es una técnica de selección positiva en la que se une un anticuerpo anti-linfocitos T (CD3) a una matriz en fase sólida (por ejemplo, partículas magnéticas), con lo que los linfocitos T quedan fijados y se pueden separar (por ejemplo, magnéticamente) de las poblaciones de células que no son linfocitos T. A continuación, los linfocitos T se pueden recuperar de la matriz por disociación mecánica o química.

Una vez obtenida una población purificada de linfocitos T, la misma se cultiva en presencia de células presentadoras de antígeno irradiadas (los macrófagos del bazo, los linfocitos B, las células dendríticas son todas células presentadoras). (Dichas células se irradian para evitar que respondan e incorporen timidina tritiada). A continuación, se incuban los linfocitos T viables (100.000-400.000 por pocillo en 100 µl de medio complementado con IL-2 en 20 unidades) con péptidos de ensayo u otros antígenos durante un período de 3 a 7 días con antígenos de ensayo en concentraciones comprendidas entre 1 y 100 µg/ml.

Tras el período de estimulación antigénica, la respuesta se puede medir de diversas maneras. Primero, los sobrenadantes sin presencia de células se pueden recolectar y analizar la presencia en los mismos de citocinas específicas. La presencia de interferón α, IL-2 o IL-12 es indicativa de una respuesta de población de linfocitos T auxiliares de tipo 1. La presencia de IL-4, IL-6 e IL-10 es conjuntamente indicativa de una respuesta inmunitaria de linfocitos T auxiliares de tipo 2. Así, este procedimiento permite la identificación de la subpoblación de linfocitos T auxiliares.

Un segundo procedimiento llamado blastogénesis comprende la adición de timidina tritiada al cultivo (por ejemplo, 1 µcurie por pocillo) al finalizar el período de estimulación antigénica y permitir que las células incorporen el metabolito radiomarcado durante 4-16 horas antes de la recolección en un filtro para llevar a cabo el recuento de centelleo. El nivel de timidina radiactiva incorporada es una medida de la actividad replicadora de los linfocitos T. Se utilizan pocillos de control negativos a antígeno o sin antígeno para calcular la respuesta blastogénica en forma de índice de estimulación. Dicho índice corresponde al cociente CPM de ensayo/CPM de control. Preferentemente, el índice de estimulación alcanzado es como mínimo 2, más preferentemente como mínimo 3, aún más preferentemente como mínimo 5 y de la forma más preferente como mínimo 10.

La CMI también se puede analizar *in vivo* en un animal experimental estándar, por ejemplo un ratón. Dicho ratón se inmuniza con un antígeno de sensibilización. Tras esperar a que los linfocitos T respondan, los ratones se provocan mediante la inyección a través de almohadilla plantar del antígeno de ensayo. La respuesta DTH (hinchazón de los ratones) se compara con la de los ratones de control inyectados, por ejemplo, con solución salina.

Preferentemente, la respuesta es como mínimo de 0,10, más preferentemente como mínimo de 0,15, aún más preferentemente como mínimo de 0,20 y de la forma más preferente como mínimo de 0,30.

La respuesta inmunitaria humoral *in vivo* se mide mediante la extracción de sangre de los ratones inmunizados y llevando a cabo un ensayo para detectar la presencia de anticuerpos que se unen a un antígeno de interés. Por ejemplo, los antígenos de ensayo se pueden inmovilizar e incubar con las muestras, con lo que capturan los anticuerpos afines, y a continuación se miden los anticuerpos capturados mediante la incubación de la fase sólida con anticuerpos antiisotípicos marcados.

Preferentemente, la respuesta inmunitaria humoral, si se desea, es por lo menos tan intensa como la representada por un título de anticuerpos de como mínimo 1/100, más preferentemente por lo menos 1/1.000, aún más preferentemente por lo menos 1/10.000.

#### Receptores

El receptor de las vacunas según la presente invención puede ser cualquier animal vertebrado que pueda adquirir inmunidad específica a través de una respuesta inmunitaria humoral o celular.



Entre los mamíferos, los receptores preferentes son los mamíferos de los órdenes *Primata* (incluidos humanos, simios y monos), *Artiodactyla* (incluidos caballos, cabras, vacas, ovejas, cerdos), *Rodenta* (incluidos ratones, ratas, conejos y hámsteres) y *Carnivora* (incluidos gatos y perros). Entre las aves, los receptores preferentes son pavos, pollos y otros miembros del mismo orden. Los receptores más preferentes son los seres humanos.

El receptor animal preferente según la presente invención es un mamífero primate. El término "mamífero" se refiere a un individuo perteneciente a la clase *Mammalia*, que, por supuesto, incluye a los humanos. La invención resulta particularmente útil en el tratamiento de individuos humanos, aunque también se dirige a aplicaciones veterinarias. El término "primate no humano" se refiere a cualquier miembro del suborden *Anthropoidea*, a excepción de la familia *Hominidae*. Entre dichos primates no humanos se incluyen la superfamilia *Ceboidea*, la familia *Cebidae* (monos del Nuevo Mundo, incluidos monos capuchinos, monos aulladores, monos araña y monos ardilla) y la familia *Callithricidae* (incluidos los titís); la superfamilia *Cercopithecoidea*, la familia *Cercopithecidae* (incluidos macacos, mandriles, babuinos, monos narigudos, cercopitecos mona y monos Hanuman sagrados de la India); y la superfamilia *Hominoidae*, la familia *Pongidae* (incluidos gibones, orangutanes, gorilas y chimpancés). El mono rhesus es un miembro de los macacos.

#### *Composiciones farmacéuticas*

Las preparaciones farmacéuticas según la presente invención comprenden como mínimo un inmunógeno en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria protectora. Dicha respuesta puede ser humoral, celular o una combinación de las mismas. La composición puede comprender más de un inmunógeno.

Por lo menos un inmunógeno es un glucolipopéptido que es inmunógeno por sí mismo o un glucolipopéptido que es inmunógeno a consecuencia de su incorporación a un liposoma.

Preferentemente, la composición comprende además un liposoma. Entre los liposomas preferentes se incluyen los indicados en Jiang *et al.*, PCT/US00/31281, presentada el 15 de noviembre de 2000 (nuestro expediente JIANG3A-PCT), y Longenecker *et al.*, 08/229.606, presentada el 12 de abril de 1994 (nuestro expediente LONGENECKER5-USA) y PCT/US95/04540, presentada el 12 de abril de 1995 (nuestro expediente LONGENECKER5- PCT).

La composición puede comprender células presentadoras de antígeno y, en este caso, el inmunógeno se puede cargar en las células antes de la administración para alcanzar una presentación más eficaz.

La composición puede contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Berkow *et al.*, eds., Manual Merck, 15ª edición, Merck and Co., Rahway, NJ, 1987; Goodman *et al.*, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, NY. (1990); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª edición, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Katzung, ed., Basic and Clinical Pharmacology, 5ª edición, Appleton and Lange, Norwalk, Conn. (1992), cuyas referencias junto con las referencias citadas en los mismos se incorporan en su totalidad al presente documento como referencia.

La composición puede comprender además un adyuvante con el fin de potenciar de forma no específica la respuesta inmunitaria. Algunos adyuvantes potencian tanto la respuesta inmunitaria humoral como la respuesta celular, mientras que otros son específicos de una u otra respuesta. Algunos potencian un tipo de respuesta e inhiben el otro. Por consiguiente, la elección del adyuvante depende de la respuesta inmunitaria deseada.

La composición puede comprender inmunomoduladores, tales como citocinas que favorecen o inhiben una respuesta inmunitaria celular o humoral, o anticuerpos inhibidores contra dichas citocinas.

Una composición farmacéutica según la presente invención también puede comprender por lo menos un compuesto quimioterapéutico contra el cáncer, tal como un compuesto seleccionado entre el grupo formado por un antimetabolito, un antibiótico peptídico de bleomicina, un alcaloide de podofilina, un alcaloide de vinca, un agente de alquilación, un antibiótico, cisplatina o una nitrosourea. Una composición farmacéutica según la presente invención puede comprender por otra parte o adicionalmente por lo menos un compuesto quimioterapéutico vírico seleccionado entre gammaglobulina, amantadina, guanidina, hidroxibenzimidazola, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , interferón  $\gamma$ , tiosemicarbazonas, metisazona, rifampicina, ribavirina, un análogo de pirimidina, un análogo de purina, foscarnet, ácido fosfonoacético, aciclovir, didesoxinucleósidos o ganciclovir. Véase, por ejemplo, Katzung, *supra*, y las referencias citadas en las páginas 798-800 y 680-681, respectivamente, que se incorporan en su totalidad al presente documento como referencia.

Entre los agentes antiparasitarios se incluyen agentes adecuados para su utilización contra artrópodos, helmintos (incluidos ascárides, oxiuros, lombrices, anquilostomas, tenias, tricocéfalos y esquistosomas) y protozoos (incluidos las amebas y los organismos del paludismo, toxoplasma y tricomonas). Entre los ejemplos se incluyen tiabendazol, diversas piretrinas, praziquantel, niclosamida, mebendazol, cloroquina HCl, metronidazol, yodoquinol, pirimetamina, mefloquina HCl y hidroxicloquina HCl.

*Fines farmacéuticos*

5 Un objetivo de la presente invención consiste en proteger a los sujetos frente a una enfermedad. El término "protección", como en "protección frente a una infección o enfermedad", tal como se utiliza en el presente documento, comprende las nociones de "prevención", "supresión" o "tratamiento". El término "prevención" comprende la administración de una composición farmacéutica antes de la inducción de la enfermedad. El término "supresión" comprende la administración de la composición antes de la aparición clínica de la enfermedad. El término "tratamiento" comprende la administración de la composición protectora después de la aparición de la enfermedad. El tratamiento puede ser paliativo o curativo.

15 Cabe entender que, en la medicina humana y veterinaria, no siempre es posible distinguir entre "prevención" y "supresión", ya que el acontecimiento o acontecimientos inductores pueden ser desconocidos, latentes, o el paciente no se examina hasta mucho después de que tenga lugar dicho acontecimiento o acontecimientos. Por consiguiente, resulta habitual utilizar el término "profilaxis" por oposición a "tratamiento" para referirse tanto a la "prevención" como a la "supresión" como se definen en el presente documento. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "protección" incluye la "profilaxis". Véase, por ejemplo, Berker, *supra*, Goodman, *supra*, Avery, *supra* y Katzung, *supra*, que se incorporan en su totalidad al presente documento como referencia, incluidas todas las referencias citadas en los mismos.

20 La "protección" proporcionada no tiene por qué ser absoluta, es decir, la enfermedad no tiene por qué prevenirse o erradicarse completamente, siempre que se produzca una mejoría estadísticamente significativa ( $p = 0,05$ ) en relación con una población de control. La protección puede limitarse a la mitigación de la gravedad o la rapidez de aparición de los síntomas de la enfermedad. Un agente que ofrece una protección menor que los agentes competidores puede resultar igualmente útil si los demás agentes son ineficaces en un determinado individuo, si se puede utilizar combinado con otros agentes para mejorar el nivel de protección o si es más seguro que los competidores.

25 La eficacia de un tratamiento se puede determinar comparando la duración, la gravedad, etc., del postratamiento de la enfermedad con las de un grupo de control sin tratar, preferentemente coincidente en cuanto al estadio de la enfermedad.

30 Normalmente, la eficacia de la profilaxis se determina comparando la incidencia de la enfermedad en el grupo de tratamiento con la incidencia de la enfermedad en un grupo de control, siempre que los grupos de tratamiento y de control se consideren de riesgo igual o se lleve a cabo una corrección para corregir las diferencias previstas en el grado de riesgo.

35 En general, la profilaxis se proporciona a aquellos que se considera que presentan un riesgo más elevado para la enfermedad en virtud de sus antecedentes familiares, de sus antecedentes personales o de una elevada exposición al agente causante.

*Administración farmacéutica*

40 Al menos un agente protector según la presente invención se puede administrar por cualquier medio que alcance el objetivo pretendido utilizando una composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente.

45 La administración puede ser oral o parenteral, y, si es parenteral, puede ser local o sistémica. Por ejemplo, la administración de la composición se puede llevar a cabo por diversas vías parenterales tales como las vías subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica o bucal. La administración parenteral se puede llevar a cabo por inyección intravenosa rápida o por perfusión gradual en el tiempo. Un modo preferente de utilización de una composición farmacéutica según la presente invención es por aplicación subcutánea, intramuscular o intravenosa. Véase, por ejemplo, Berker, *supra*, Goodman, *supra*, Avery, *supra* y Katzung, *supra*, que se incorporan en su totalidad al presente documento como referencia, incluidas todas las referencias citadas en los mismos.

50 Una pauta típica para la prevención, supresión o tratamiento de una enfermedad o trastorno que se puede aliviar mediante una respuesta inmunitaria por inmunoterapia activa específica, comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, tal como se ha descrito anteriormente, administrada como tratamiento único o repetido, por ejemplo mediante dosis potenciadoras o de recuerdo, a lo largo de un periodo comprendido entre una semana y aproximadamente 24 meses.

55 Cabe entender que la dosis eficaz depende de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, del tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, de la frecuencia de tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis eficaces indicados a continuación no pretenden limitar la presente invención y representan únicamente intervalos preferentes de dosificación. Sin embargo, la dosis más preferente se adaptará para cada individuo, tal como el experto en la materia comprenderá y será capaz de determinar sin ninguna experimentación

innecesaria. Normalmente, esto implica un ajuste de la dosis estándar, por ejemplo, la reducción de dicha dosis si el paciente tiene un peso corporal bajo. Véase, por ejemplo, Berkow *et al.*, eds., Manual Merck, 15ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1987; Goodman *et al.*, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª edición, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, (1985); Chabner *et al.*, *supra*; De Vita *et al.*, *supra*; Salmon, *supra*; Schroeder *et al.*, *supra*; Sartorelli *et al.*, *supra*; y Katsung, *supra*, cuyas referencias junto con las referencias citadas en los mismos se incorporan en su totalidad al presente documento como referencia.

Antes de su utilización en humanos, un fármaco debe ser sometido a una evaluación de su inocuidad y eficacia en animales de laboratorio. En los estudios clínicos en humanos, se empieza con una dosis que se prevé inocua en humanos sobre la base de los datos preclínicos del fármaco en cuestión y en las dosis habituales de los fármacos análogos (si los hay). Si dicha dosis resulta eficaz, la misma se puede disminuir a fin de determinar, si se desea, la dosis mínima eficaz. Si la dosis no es eficaz, se incrementa con precaución controlando cualquier indicio de efecto secundario en los pacientes. Véase, por ejemplo, Berkow *et al.*, eds., Manual Merck, 15ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1987; Goodman *et al.*, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª edición, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, (1985), cuyas referencias junto con las referencias citadas en los mismos se incorporan en su totalidad al presente documento como referencia.

La dosis total necesaria para cada tratamiento se puede administrar en diversas dosis (que pueden ser iguales o diferentes) o en una sola dosis, según una pauta de inmunización predeterminada o específica. Dicha pauta se selecciona de modo que sea inmunológicamente eficaz, es decir, que sea suficiente para provocar una respuesta inmunitaria eficaz al antígeno y de este modo, posiblemente junto con otros agentes, proporcione protección. Las dosis adecuadas para lograr este objetivo se definen como "dosis terapéuticamente eficaces". (Cabe notar que una pauta puede ser inmunológicamente eficaz a pesar de que una dosis individual administrada individualmente no lo sea, y que el significado de la expresión "dosis terapéuticamente eficaz" se interpreta mejor en el contexto de la pauta de inmunización.) Las cantidades eficaces para esta aplicación dependen, por ejemplo, de la composición peptídica, de la forma de administración, del estadio y la gravedad de la enfermedad a tratar, del peso y el estado general de salud del paciente y del juicio del médico responsable del tratamiento.

Habitualmente, la dosis diaria de ingrediente activo de un producto farmacéutico para un ser humano adulto con un peso de 70 kg está comprendida entre 10 nanogramos y 10 gramos. En los inmunógenos, la dosis diaria más habitual para un paciente de este tipo está comprendida entre 10 nanogramos y 10 miligramos, más probablemente entre 1 microgramo a 10 miligramos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos intervalos de dosificación.

Debe tenerse en cuenta que las composiciones según la presente invención se pueden utilizar en general en estados patológicos graves, es decir, en situaciones que conllevan riesgo vital de forma efectiva o potencial. En estos casos, teniendo en cuenta la minimización de las sustancias extrañas y el carácter relativamente no tóxico de los péptidos, es posible y puede ser considerado adecuado por parte del médico responsable administrar excesos sustanciales de estas composiciones peptídicas.

Las dosis se pueden administrar según cualquier intervalo que resulte eficaz. Si el intervalo es demasiado corto, puede producirse inmunoparálisis u otros efectos adversos. Si es demasiado largo, puede verse afectada la inmunidad. El intervalo de tiempo óptimo puede ser más largo si las dosis individuales son mayores. Los intervalos habituales son de 1 semana, 2 semanas, 4 semanas (un mes), 6 semanas, 8 semanas (dos meses) y un año. La conveniencia de administrar dosis adicionales y de aumentar o disminuir el intervalo de tiempo se puede revisar de forma continuada en función de la inmunocompetencia del paciente (por ejemplo, el nivel de anticuerpos contra los antígenos correspondientes).

Se dispone de diversos procedimientos para la preparación de liposomas, tal como se describe, por ejemplo, en Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), y las patentes US nº 4.235.871, nº 4.501.728, nº 4.837.028 y nº 5.019.369, que se incorporan a la presente memoria como referencia.

La formulación adecuada depende de la enfermedad, el inmunógeno y el modo de administración; entre las diversas posibilidades se incluyen comprimidos, cápsulas, pastillas, pastas dentales, supositorios, inhalantes, soluciones, pomadas y medicamentos de liberación lenta parenterales. Véase, por ejemplo, Berker, *supra*, Goodman, *supra*, Avery, *supra* y Ebadi, *supra*, que se incorporan en su totalidad al presente documento como referencia, incluidas todas las referencias citadas en los mismos.

El antígeno se puede administrar de un modo que mejora, por ejemplo, la administración del material antigénico al compartimento intracelular, de tal modo que se produce la "ruta endógena" de presentación de antígenos. Por ejemplo, el antígeno puede estar encapsulado en un liposoma (que se fusiona con la célula) o incorporarse a la proteína de cubierta de un vector vírico (que infecta a la célula).

Otro procedimiento, que se puede aplicar cuando el antígeno es un péptido, consiste en inyectar en el huésped, por vía intramuscular, ADN desnudo que codifica el antígeno. El ADN se interioriza y se expresa.

- 5 También es posible preparar PBL autólogos con las composiciones según la presente invención, confirmar que los PBL han manifestado la respuesta deseada y a continuación administrar dichos PBL, o un subconjunto de los mismos, al individuo.

### Ejemplos

10 Se sintetizan dos glucolipopéptidos 1a y 1b por el procedimiento de acoplamiento de bloques en solución. El compuesto 1a (figura 6) contiene dos Tn-treoninas y una Tn-serina, mientras que el compuesto 1b (figura 6) contiene dos Tn-treoninas, una Tn-serina y una STn-serina (Tn: aGalNAc-O-; STn: SialylTn, Neu5Ac $\alpha$ (2-6) $\alpha$ GalNAc-O-). La estrategia para la síntesis de 1a y 1b se expone en el esquema retrosintético (figura 5). Los glucopéptidos finales se obtuvieron por el desbloqueo de los correspondientes precursores 2a y 2b, que se pudieron preparar por  
15 acoplamiento de los dos bloques, el oligopéptido de 20 miembros 3 y el oligopéptido de 23 miembros 4a o 4b. El oligopéptido de 20 miembros se dividió en el oligopéptido de 11 miembros 5 y el oligopéptido de 9 miembros 6. Análogamente, de los oligopéptidos de 23 miembros 4a y 4b también se obtuvieron el oligopéptido de 11 miembros 7 y el oligopéptido de 12 miembros 8. Los bloques 5 y 7 se dividieron en los bloques primarios 9, 10 y 9/11, 12. El  
20 bloque 8 se dividió en el bloque 14 y el bloque 13, que es parecido al 6. El bloque 14 es la tríada serina-serina-leucina (S\*S\*L), en la que las serinas se unieron a cadenas lipídicas y que se diseñó de tal modo que actuara como vehículo lipídico en el glucolipopéptido final. Los bloques primarios 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 (figura 7) se sintetizan a partir de los aminoácidos glucosilados y no glucosilados individuales protegidos.

#### 25 Síntesis de los bloques principales:

La tríada de lipoaminoácidos 14 (figura 8) se sintetizó a partir de la liposerina protegida con Boc, que a su vez se sintetizó a partir de serina protegida con Boc y bromotetradecano con un 55% de rendimiento mediante tratamiento con NaH en DMF. La liposerina se acopló al éster metílico de la leucina por el procedimiento DCC/HOBt. El grupo Boc se desprotegió con HCl del éster metílico de Boc-liposerina-leucina obtenido y se acopló a otra Boc-liposerina, obteniéndose 14 con un rendimiento del 84%.

Los bloques 6 y 13 (figura 9) se sintetizaron a partir de un bloque común APPAHGV que se sintetizó a partir de los aminoácidos protegidos individuales. Se acopló Fmoc-histidina protegida por tritilo a éster bencílico de glicina por el procedimiento DCC/HOBt con un rendimiento del 89%, obteniéndose un bloque HG protegido del que se escindió el éster bencílico mediante tratamiento con formiato de amonio en presencia de paladio sobre carbón en una mezcla de THF-metanol a 6°C. El ácido libre se acopló a la amina libre de éster bencílico de valina por el procedimiento DCC/HOBt. El grupo Fmoc se desbloqueó por tratamiento con morfolina a temperatura ambiente y se acopló a Fmoc-PA-OH y posteriormente a Fmoc-AP-OH a fin de obtener el bloque común de éster bencílico de Fmoc APPAH(Trt)GV. Dicho bloque se trató en primer lugar con morfolina a fin de eliminar la protección del grupo Fmoc y a continuación se acopló a S(tBu)T(tBu)-OH protegido por Fmoc mediante el procedimiento DCC/HOBt, obteniéndose el bloque 13 con un rendimiento del 91%. La amina libre del éster bencílico de APPAH(Trt)GV se acopló sucesivamente a aminoácidos glucosilados, Tn-treonina y Tn-serina por el mismo procedimiento, obteniéndose el bloque 6 con un rendimiento global del 60%.

El bloque 9 se sintetizó (figura 10) empezando por el acoplamiento de treonina y serina protegidas por tBu por el procedimiento DCC/NHS, obteniéndose el bloque TS, que se trató con morfolina, y la amina libre resultante se trató de nuevo con AP-OH protegido por Fmoc por el mismo procedimiento. El tetrapéptido resultante se acopló a ácido aspártico protegido por tBu, obteniéndose el bloque 9 con un rendimiento del 75%. El bloque 11 parecido, que contiene aminoácido glucosilado, STn-serina, se sintetizó (figura 11) mediante el acoplamiento secuencial de AP-OH protegido por Fmoc a éster bencílico de ácido aspártico protegido por tBu y a continuación a STn-serina y tBu-treonina por el procedimiento DCC/HOBt. Por último, el desbloqueo de la protección por Fmoc con morfolina dio lugar a 11 con un rendimiento global de aproximadamente el 80%.

Los bloques 10 y 12 se sintetizaron (figura 12) a partir del bloque común de éster bencílico de Fmoc RPAPG, que a su vez se sintetizó a partir de prolina protegida por Boc acoplada con éster bencílico de glicina, que se acopló al bloque Fmoc PA-OH tras el desbloqueo del grupo Boc por el procedimiento DCC/HOBt. El bloque PAPG resultante se acopló a arginina protegida por Pmc a fin de obtener éster bencílico de Fmoc RPAPG. Tras la desprotección del grupo Fmoc, cuando este compuesto se acopló a treonina protegida por tBu dio lugar al bloque 10, mientras que, cuando se acopló a Tn-treonina, dio lugar al bloque 12 con un rendimiento del 82 y el 83%, respectivamente.

#### Síntesis de los glucolipopéptidos (1a/1b) mediante acoplamiento de bloques:

Las etapas finales de síntesis de los glucolipopéptidos 1a y 1b se llevaron a cabo utilizando bloques adecuados en distintas etapas de acuerdo con la estrategia prevista (figura 13). La síntesis de los siete bloques primarios empezando por los aminoácidos individuales adecuadamente protegidos se ha descrito anteriormente. Todos estos

bloques primarios se acoplaron adecuadamente a fin de obtener los correspondientes bloques intermedios secundarios que conducen a los compuestos 2a y 2b totalmente bloqueados, precursores de los compuestos finales 1a y 1b, respectivamente. El bloque 9 se trató con DCC y NHS a fin de obtener la succinimida correspondiente y se acopló a la amina libre de 10 (tratada con morfolina a fin de desbloquear el grupo Fmoc) en presencia de una base en DMF, obteniéndose el bloque 5 con un rendimiento del 45%. Análogamente, el bloque 9 se acopló a la amina libre de 12, obteniéndose el bloque 7a con un rendimiento del 67%. El ácido libre de 11 (tratado con formiato de amonio y paladio sobre carbón en THF-MeOH a 6°C a fin de desbloquear el éster bencílico) se acopló a la amina libre de 12 por el procedimiento DCC/HOBt, obteniéndose el bloque 7b con un rendimiento del 90%. Análogamente, el ácido libre de 13 se acopló a 14 desprotegido de Boc por el procedimiento DCC/HOBt, obteniéndose el bloque 8 con un rendimiento del 92%. Los demás acoplamientos del resto de los bloques se llevaron a cabo por el procedimiento DCC/HOBt. El acoplamiento de la amina libre de 8 al ácido libre de 7a dio lugar a 4a con un rendimiento del 90%, mientras que el acoplamiento al ácido libre de 7b dio lugar a un rendimiento del 63% de 4b. 6 se trató con morfolina a fin de liberar la amina libre y a continuación se acopló al ácido libre de 5, obteniéndose 3 con un rendimiento del 95%.

El acoplamiento del ácido libre de 3 a la amina libre de 4a condujo al precursor 2a, mientras que el acoplamiento a la amina libre de 4b condujo al otro precursor 2b. Tras el desbloqueo en tres etapas de todos los grupos protectores, tanto 2a como 2b dieron lugar a los compuestos finales 1a y 1b, respectivamente, con un rendimiento promedio del 60%. Tras el tratamiento final, los productos finales se desalaron y purificaron por RP-HPLC en una columna C4 utilizando el sistema acetonitrilo-agua.

De este modo, en la síntesis peptídica se utilizaron muy pocos grupos protectores, Fmoc y Boc para las funcionalidades amina y éster bencílico y éster metílico para las funcionalidades de ácido. Todos los demás aminoácidos se protegieron adecuadamente con los grupos tBu (para treonina, serina y ácido aspártico) o Pmc (para arginina) o Trt (para histidina). Las serinas y treoninas glucosiladas (Tn y STn) con grupos protectores apropiados se sintetizaron y utilizaron en los bloques donde resultaba apropiado. Análogamente, se utilizó liposerina presintetizada en la síntesis de los bloques apropiados. De este modo, la síntesis se completó con una diversidad mínima de reacciones químicas. Únicamente se utilizaron en toda la síntesis dos procedimientos de acoplamiento, el procedimiento DCC/NHS y el procedimiento DCC/HOBt, y procedimientos estándar de desbloqueo para los grupos Fmoc y Boc. Así, se ofrece una breve descripción de los procedimientos generales de acoplamiento y desacoplamiento.

#### I. Procedimientos de acoplamiento:

En la síntesis de los bloques peptídicos o en el acoplamiento de bloques se utilizaron dos procedimientos, el procedimiento DCC/NHS y el procedimiento DCC/HOBt. Ambos procedimientos dieron excelentes rendimientos.

#### Procedimiento DCC/NHS:

Se añadió THF anhidro al matraz que contenía aminoácido protegido por Fmoc o bloque peptídico A (14,33 mmol), N-hidroxi-succinimida (17,14 mmol) y DCC (17,15 mmol) en atmósfera de nitrógeno y se agitó durante una noche. La urea formada en forma de sólido blanco se filtró y se lavó con THF. El disolvente se eliminó del filtrado combinado y las aguas de lavado a baja presión. La succinimida se utilizó como producto crudo o tras su purificación por cromatografía en columna o cristalización. El derivado de succinimida se acopló al siguiente aminoácido mediante dos procedimientos.

Procedimiento A: El derivado de succinimida se disolvió en DMF (120 ml) y se añadieron el aminoácido adecuadamente protegido o bloque peptídico B con las funcionalidades amino y carboxílica libres (14,29 mmol) y DIEA (2,5 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante una noche, volviéndose una solución nítida. Se eliminó el DMF y el residuo se volvió a disolver en DCM, se lavó con agua (75 ml) y solución saturada de cloruro sódico (75 ml) y se secó sobre sulfato sódico anhidro. La capa de DCM se concentró y se obtuvo el bloque de aminoácidos crudo AB, que se purificó por cromatografía en columna utilizando (3-5%) metanol en DCM con un 0,5% de ácido acético. El bloque puro AB se obtuvo en forma de sólido blanco tras la eliminación del disolvente con un rendimiento de aproximadamente el 75%.

Procedimiento B: El aminoácido B (5,42 mmol) se disolvió en agua y se añadió bicarbonato de sodio (4,5 mmol). La mezcla se agitó durante 30 minutos y se añadió el derivado de succinimida del bloque A (3,0 mmol) disuelto en 1,2-dimetoxietano (250 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó en un rotavapor, obteniéndose una suspensión blanca que se enfrió a 0°C y se acidificó con HCl al 10% hasta un pH de 4-5. Se añadió DCM a esta mezcla, se agitó durante unos minutos y el contenido se transfirió a un embudo de separación. La capa de DCM se separó y la capa acuosa se extrajo con DCM (X 2). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad. El residuo se recristalizó con acetato de etilo caliente y hexano, obteniéndose el bloque peptídico puro AB con un rendimiento de aproximadamente el 80%.

Acoplamiento DCC/HOBt:

Se disolvieron el aminoácido o bloque A con un grupo ácido carboxílico libre (4,09 mmol), el HOBt (4,46 mmol) y el bloque B con amina libre (3,72 mmol) en aproximadamente 50 ml de DCM seco. Se disolvió DCC (7,44 mmol) en 10 ml de DCM seco y se añadió gota a gota y lentamente a la mezcla anterior a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadieron aproximadamente 0,4 ml de agua a la mezcla de reacción y se agitó durante 30 min a fin de convertir todo el DCC sin reaccionar en urea. La urea formada se eliminó por filtración sobre lecho de sulfato de sodio anhidro, el DCM se eliminó por completo y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando metanol al 4-5% en DCM. El producto puro del bloque peptídico AB se obtuvo tras la eliminación del disolvente con un rendimiento de aproximadamente el 85-97%.

II. Procedimientos de desbloqueo:

Desprotección de Fmoc: Se agitó aminoácido protegido por Fmoc (1,0 mmol) con morfolina (10 ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cuando la TLC indicó la finalización de la reacción, se eliminó la morfolina a baja presión y se sometió a codestilación con tolueno. El residuo se secó en alto vacío y se utilizó como crudo en la siguiente etapa, o se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando metanol al 5-10% en DCM. El rendimiento de amina libre obtenida fue de aproximadamente el 92-95%.

Desprotección de Boc: A la solución en acetato de etilo de compuesto protegido por Boc (19,0 mmol) se añadieron 10 ml de HCl concentrado y se agitó durante 30 min. Cuando la TLC indicó la finalización de la reacción, se eliminaron los disolventes a baja presión. El residuo se disolvió en 200 ml de DCM y se lavó con bicarbonato de sodio acuoso. La capa acuosa se volvió a extraer con DCM varias veces. Las capas orgánicas combinadas se concentraron y secaron a alto vacío. La amina cruda se obtuvo con rendimientos cuantitativos y se pudo incorporar tal cual a la siguiente etapa.

Desprotección de éster bencílico: Se disolvió éster bencílico (0,3 mol) en 10 ml de mezcla THF:MeOH (1:1) y se añadieron 100 mg de Pd sobre carbón. La mezcla se enfrió a 6°C, se añadió formiato de amonio (4,0 mmol) y se agitó a 6°C durante 40 min. Si la TLC indicó una reacción incompleta, se añadieron mayores cantidades de Pd/C y formiato de amonio y se prosiguió la reacción hasta que la TLC mostró la ausencia de materiales de partida. Cuando la TLC indicó la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se filtró sobre un pequeño lecho de celite para eliminar el Pd/C y se lavó el catalizador sucesivamente con metanol y DCM. Los filtrados combinados se concentraron y el residuo se disolvió en una cantidad mínima de DCM. Precipitó un sólido blanco que se descartó. El filtrado se concentró para obtener ácido libre de crudo y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando metanol al 7-10% en DCM con un 1% de ácido acético. El compuesto puro se obtuvo en forma de sólido blanco que se volvió a disolver en metanol y se sometió a codestilación con tolueno a fin de eliminar las trazas de ácido acético. Si todavía quedaba alguna traza de ácido acético en el compuesto, el mismo se disolvió en un exceso de cloroformo y se lavó con pequeñas cantidades de solución saturada de cloruro sódico (x 4). La capa de cloroformo se secó y se concentró, obteniéndose aminoácido libre con un rendimiento de aproximadamente el 85-90%.

III. Desbloqueo final del glucolipopéptido:

Desbloqueo de los grupos sensibles a ácido (con el reactivo B): El glucolipopéptido 2a o 2b totalmente bloqueado (0,08 mmol) se agitó con 60 ml del cóctel reactivo B (TFA:fenol:triisopropilsilano:agua, 8,8:0,5:0,2:0,5) a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a baja presión hasta el 90% y se añadió éter frío (200 ml). Se formó un precipitado blanco que se filtró a través de un embudo fino sinterizado y a continuación se lavó con gran cantidad de éter frío a fin de eliminar el fenol. Finalmente, el compuesto se disolvió en metanol, se concentró y se secó a alto vacío. La TLC indicó que la reacción se había completado y normalmente el rendimiento fue de aproximadamente el 95-98%.

Desbloqueo de los grupos sensibles a base (con metóxido de sodio): El producto de la etapa anterior (0,055 mmol) se disolvió en 20 ml de metanol seco y se añadieron lentamente 1,5 ml de solución de NaOMe (0,3 M) en metanol comprobando el pH de la mezcla de reacción. El pH debe ser de aproximadamente 9-10 y la concentración total de base debe ser de aproximadamente 0,02 M. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se acidificó con ácido acético al 5% en metanol hasta que el pH de la mezcla de reacción viró a aproximadamente 6. Se eliminaron los disolventes a baja presión y el residuo se disolvió en agua (20 ml) y se extrajo con éter (15 ml x 1). Se separó y liofilizó la capa acuosa, obteniéndose como producto un sólido blanco esponjoso que también contenía cierta cantidad de sal (acetato de sodio).

Desbloqueo del éster metílico o ésteres metílicos: El producto de la etapa anterior (0,06 mmol) se disolvió en 20 ml de DMF:agua (7:1) y la mezcla se enfrió a 0°C. Se añadieron 5 ml de solución 0,1 N de NaOH gota a gota a la mezcla de reacción para que la concentración total de base fuera de 0,02 M. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 2 horas y se acidificó con ácido acético al 5% en metanol hasta que el pH viró a aproximadamente 6. Los disolventes se eliminaron a baja presión y se secó el residuo a alto vacío, obteniéndose el producto crudo 1a o 1b.

## IV. Procedimiento de desalación:

El producto crudo se desaló antes de la purificación por RP-HPLC. Se empaquetó una columna con material C4 en aproximadamente 100 ml de metanol y se eluyó durante una hora con el mismo disolvente. El disolvente se cambió progresivamente de metanol al 100% a agua al 100% (aumentando lentamente el contenido de agua a fin de evitar la liberación de calor debida a un cambio repentino de disolvente). La columna se eluyó durante otra hora con agua. El producto se disolvió en agua y se purificó eluyendo en primer lugar con aproximadamente 500 ml de agua para luego cambiar a acetonitrilo en agua al 60%. Las sales se eluyeron primeramente con agua, seguidas por las impurezas en acetonitrilo en agua al 60%. A continuación, el disolvente se cambió a metanol en agua al 90%. El producto empezó a eluirse lentamente junto con sus impurezas polares y se había eluido completamente cuando el disolvente se cambió a metanol al 100%. Se combinaron todas las fracciones que contenían el producto y se eliminó el disolvente a baja presión. El producto crudo desalado se purificó adicionalmente mediante RP-HPLC (figuras 14 y 15) utilizando agua y acetonitrilo con un 0,1% de TFA en una columna C4.

## V. Datos espectroscópicos y analíticos de bloques seleccionados:

## Bloque 6:

MS m/z (%): 2203,9 [M+Na]<sup>+</sup> (100), 2181 (35), 113,6(10).  
<sup>1</sup>HRMN: 300MHz (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD) d 0,82 (d, J = 5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Val)), 0,85 (d, J = 5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Val)), 1,2-1,25 (m, 6H), 1,3 (d, J= 7Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,6-1,9 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, (Pro)), 1,75 (s, 3H, COC H<sub>3</sub>), 1,85 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,2 (m, 2H), 2,95 (d, J = 6Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (His)), 3,35-3,6 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub> (Pro)), 3,8 (m, 5H), 3,9-4,6 (m, 20H), 4,73-4,85 (m, 2H), 5,0 (m, 1H), 5,05 (dd, J = 12, 10 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,2-5,3 (m, 3H), 5,45 (s, 1H, CHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,5 (s, 1H, CHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6,7 (s, 1H, CH (His)), 7,1 (m, 6H, 5ArH, CH (His)), 7,2-7,8 (m, 43H, 8 ArH (Fmoc), 35ArH), 8,0 (m, 4H, NH).  
 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +27,5 © 0,1, CHCl<sub>3</sub>.

## Bloque 9:

MS m/z (%): 902,5 [M+Na]<sup>+</sup> (100), 880 (10), 846,4 (25).  
<sup>1</sup>HRMN: 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD) d 1,09 (d, J = 11,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,19 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,32 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,39 (d, J = 12 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Ala) ), 1,45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,9-2,1 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> (Pro)), 2,76 (dd, J = 17, 5 Hz, 1H, CHH (Asp)), 2,86 (dd, J = 17, 5 Hz, 1H, CHH (Asp)), 3,48 (dd, J = 9, 5 Hz, 1H, CHH (Ser)), 3,64-3,74 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub> (Pro)), 3,85 (dd, J = 9, 4 Hz, CHH (Ser)), 4,12 (m, 1H, CH (Thr)), 4,25 (m, 2H, 2CH (Pro, Ala)), 4,40-4,50 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Fmoc), CH (Ser), CH (Thr)), 4,7 (t, J = 5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> (Fmoc)), 4,77 (m, 1H, CH (Asp)), 7,1-7,8 (m, 8H, ArH (Fmoc)).  
 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -5,5 © 0,2, CHCl<sub>3</sub>

## Bloque 10:

MS m/z (%): 1254,6 [M+Na]<sup>+</sup> (100)  
<sup>1</sup>HRMN: 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>) d 1,05 (d, J = 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,25 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,29 (d, J = 3,5 Hz, 6H, C(C H<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Pmc)), 1,35 (d, J = 7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Ala)), 1,8 (t, J = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Pmc)), 1,90-2,0 (m, 10H), 2,1 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Arg)), 2,5 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub> (pmc)), 2,6 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub> (Pmc)), 2,62 (t, J = 7 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub> (Pmc)), 3,05-3,30 (2m, 2H, CH<sub>2</sub> (Arg)), 3,55-3,75 (m, 5H, N-CH<sub>2</sub> (Pro)), 3,95 (m, 2H), 4,10-4,30 (m, 4H), 4,40 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Fmoc)), 4,53 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Arg)), 4,65 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 5,14 (d, J = 1,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,87 (d, J = 6 Hz, 1H, N H), 6,17 (bs, 2H, N H<sub>2</sub>), 6,4 (bs, 1H, N H), 6,80 (d, J = 6 Hz, 1H, N H), 7,20-7,80 (m, 14H, Ar H (Fmoc, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 1NH), 8,20 (d, J = 6 Hz, 1H, N H).  
 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -14,5 © 0,1, CHCl<sub>3</sub>

## Bloque 11:

MS m/z (%): 1758,7 [M+Na]<sup>+</sup> (100), 1736 (7), 1398,7 (8), 891,6 (10).  
<sup>1</sup>HRMN: 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>) d 1,08 (d, J = 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,32 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,42 (d, J = 7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Ala)), 1,85-2,20 (m, 25H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> (4Pro), 7COCH<sub>3</sub> (STn)), 2,52 (dd, 1H, J = 12,5, 4,5 Hz, 1H, STn), 2,57 (dd, J = 17, 5 Hz, 1H, CHH (Asp)), 2,70 (dd, J = 17, 5 Hz, 1H, CHH (Asp)), 3,28 (dd, J = 9,5, 6,5 Hz, 1H, STn), 3,55 (m, 1H), 3,6-3,9 (m, 6H), 3,95- 4,40 (m, 8H), 4,55-4,65 (m, 3H), 4,70-4,85 (m, 3H), 5,02 (q, J = 45, 12 Hz, 2H), 5,1 (d, J = 4 Hz, 2H), 5,15-5,40 (m, 2H), 5,55 (d, J = 3 Hz, 1H, NH), 6,00 (d, J = 5,5 Hz, 1H, NH), 6,95 (d, J = 8 Hz, 1H, NH), 7,12 (dd, J = 15, 7 Hz, 1H, NH), 7,25-8,00(m, 19H, Ar H (Fmoc, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), NH).  
 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +4,0 © 0,1, CHCl<sub>3</sub>

## Bloque 12:

MS m/z (%): 1593,7 [M+Na]<sup>+</sup> (100), 1571,7 (80).  
<sup>1</sup>HRMN: 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) d 1,1-1,4 (m, 12H, CH<sub>3</sub> (Ala, Thr, Pmc)), 1,7-2,5 (m, 18H, CH<sub>2</sub> (Arg, Pro, Pmc), NHCOC H<sub>3</sub>, ArCH<sub>3</sub>), 2,50-2,70 (m, 8H, ArCH<sub>3</sub> (Pmc)), 2,90-3,30 (2m, 2H, CH<sub>2</sub> (Arg)), 3,50-3,70 (m, 4H), 3,70- 3,90 (m, 3H),

## ES 2 375 992 T3

4,05-4,50 (m, 9H), 4,50-5,10 (m, 8H), 5,30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,50 (s, 1H, CHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,80- 6,00(bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,50 (bs, 1H, NH), 7,10-7,60 (m, 19H, ArH (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, Fmoc)), 7,7 (m, 2H, ArH (Fmoc)), 8,10 (m, 3H, Ar H\_(Fmoc), 1NH).  
 $[\alpha]_D^{20} = +19,0 \text{ @ } 0,1, \text{ CHCl}_3$

### 5 Bloque 13:

MS m/z (%): 1524 [M+Na]<sup>+</sup> (70), 1503,8 (100).

<sup>1</sup>HRMN: 500 MHz (CD<sub>3</sub>OD) d 0,9 (d, J = 7 Hz, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Val)), 1,15 (d, J = 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,20 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,24 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,30 (m, 6H, CH<sub>3</sub> (2 Ala)), 1,85-2,2 (m, 9H), 3,0 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (His)), 3,50-4,0 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> (Pro)), 4,10-4,80 (m, 13 H), 5,10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6,8 (s, 1H, CH (His)), 7,0-8,0 (m, 29H, Ar H (Fmoc, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), CH (His)).  
 $[\alpha]_D^{20} = -19,75 \text{ @ } 0,2, \text{ CHCl}_3$

### 15 Bloque 14:

MS m/z (%): 834 [M+Na]<sup>+</sup> (100), 778.6 (7), 712.6 (7), 539.5 (5).

<sup>1</sup>HRMN: 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>) d 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H, CH<sub>3</sub> (lip)), 0.90 (2bs, 6H, CH<sub>3</sub> (Leu)), 1.24 (s, 44H, CH<sub>2</sub> (lip)), 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.50-1.55 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (lip)), 1.60-1.65 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Leu)), 3.40-3.50 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>- (lip), CHH (Ser)), 3.55 (m, 1H, CHH (Ser)), 3.66 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.750-3.78 (m, 1H, CHH (Ser)), 3.85-3.88 (m, 1H, CHH (Ser)), 4.24 (bs, 1H, CH (Leu)), 4.45-4.48 (m, 1H, CH (Ser)), 4.58-4.62 (m, 1H, CH (Ser)), 5.36 (bs, 1H, NH), 7.04 (d, J = 8 Hz, 1H, NH), 7.15 (d = 7.5 Hz, 1H, NH).  
 $[\alpha]_D^{20} = +8.75 \text{ @ } 0.2, \text{ CHCl}_3$

### 25 Bloque 5:

MS m/z (%): 1895 [M+Na]<sup>+</sup> (100), 1873 (90), 931 (20).

<sup>1</sup>HRMN: 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>), d 1,03 (d, J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,07 (d, J = 6,5, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,17 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,24 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,26 (m, 3H, CH<sub>2</sub> (Pmc)), 1,29 (d, J = 5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Ala)), 1,32 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,36 (t, J = 6,5 Hz, 6,0 Hz, 3H), 1,39 (d, J = 5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Ala)), 1,40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,55 (bs, 1H), 1,62 (bs, 1H), 1,7 (bs, 1H), 1,8 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 1,83-2,15 (m, 17H), 2,28 (m, 1H), 2,53-2,65 (m, 9H), 2,83 (dd, J = 11,5, 5,0 Hz, 1H, CHH (Asp)), 3,10-3,30 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Arg)), 3,42 (m, 1H), 3,50-3,70 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> (Pro)), 3,88-4,05 (m, 3H), 4,10-4,18 (m, 2H), 4,20-4,30 (m, 3H), 4,35-4,42 (d, J = 7 Hz, 2H), 4,5 (m, 4H), 4,60-4,65 (p, J = 6,5 Hz, 1H), 4,7 (m, 2H), 4,78 (p, J = 7 Hz, 1H), 5,13 (d, J = 2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,95 (d, J = 6,5 Hz, 1H, NH), 6,3 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,95 (bs, 1H, NH), 7,2-7,8 (m, 18H, ArH (Fmoc), NH).  
 $[\alpha]_D^{20} = +0,5 \text{ @ } 0,1, \text{ CHCl}_3$

### 40 Bloque 7a:

MS m/z (%): 2233,5 [M+Na]<sup>+</sup> (100), 2211,5 (25), 1128,3 (35), 1105,5 (33).

<sup>1</sup>HRMN: 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD), d 1,0-1,35 (m, 45H, CH<sub>3</sub> (Thr), C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub> (Ala), CH<sub>3</sub> (Pmc)), 1,50-2,15 (m, 22H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> (Pro), CH<sub>2</sub>, ArCH<sub>3</sub> (Pmc), CH<sub>2</sub> (Arg), NHCOCH<sub>3</sub>), 2,35-2,85 (m, 10H), 3,1 (bs, 2H), 3,30-3,70 (m, 7H), 3,76-4,10 (m, 10H), 4,15-4,80 (m, 13H), 5,0-5,10 (m, 3H), 5,25 (m, 2H, (CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)), 5,45 (s, 1H, CH (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)), 7,18-8,0 (m, 24H, ArH (Fmoc, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), NH).  
 $[\alpha]_D^{20} = -15,0 \text{ @ } 0,1, \text{ CHCl}_3$

### 45 Bloque 7b:

MS m/z (%): 3001 [M+Na]<sup>+</sup> (25), 2979 (100).

<sup>1</sup>HRMN: 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>) d 1,08 (d, J = 3Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,14 (d, J = 3Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,20-1,48 (m, 30H, CH<sub>3</sub> (Ala), C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Pmc)), 1,50-2,20 (m, 43H, CH<sub>2</sub> (Arg), ArCH<sub>3</sub>, ArCH<sub>2</sub> (Pmc), CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> (Pro), COCH<sub>3</sub>), 2,40-2,80 (m, 11H), 3,10-3,40 (m, 3H), 3,40-3,65 (m, 4H), 3,65-3,80 (m, 5H), 3,80-4,18 (m, 13H), 4,18-4,60 (m, 15H), 4,60-4,90 (m, 6H), 4,90-5,0 (m, 2H), 5,08-5,24 (m, 5H), 5,24-5,42 (m, 3H), 5,45-5,6 (m, 2H), 5,95 (m, 1H), 6,9 (bs, 3H), 7,25-8,05 (m, 33H).  
 $[\alpha]_D^{20} = +4,5 \text{ @ } 0,1, \text{ CHCl}_3$

### 55 Bloque 8:

MS m/z (%): 2129 [M+Na]<sup>+</sup> (35), 2107 (100).

<sup>1</sup>HRMN: 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD), d 0,88 (t, J = 7Hz, 6H, CH<sub>3</sub> (lip)), 0,90-0,98 (m, 12H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Val), CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Leu)), 1,10 (d, J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,20-1,40 (m, 68H, CH<sub>3</sub> (Ala), CH<sub>2</sub> (lip), C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,48-1,74 (m, 7H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (lip), CH-CH<sub>2</sub> (Leu)), 1,80-2,25 (m, 9H), 3,0 (d, J = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (His)), 3,40-3,85 (m, 19H), 7,25-7,40 (m, 12H), 7,60-7,85 (m, 6H).  
 $[\alpha]_D^{20} = -16,0 \text{ @ } 0,1, \text{ CHCl}_3$



## Bloque 3:

MS m/z (%): 3723,8 [M+H]<sup>+</sup> (55), 3481,2 (100), 1862,1 (75), 1762,7 (25).

<sup>1</sup>HRMN: 500 MHZ (CD<sub>3</sub>OD), d 0,90 (d, J = 7 Hz, 6H, CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> = (Val)), 1,05-1,45 (m, 63H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub> (Thr), CH<sub>3</sub> (Ala), C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Pmc)), 1,45-2,20 (m, 35H), 2,50-2,90 (m, 10H), 2,40-2,90 (m, 10H), 3,0-3,20 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Arg), CH<sub>2</sub> (His)), 3,50-4,25 (m, 30H), 4,3-4,95 (m, 24H), 5,05-5,17 (m, 3H), 5,30-5,40 (m, 3H), 5,55 (s, 1H, CHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,63 (s, 1H, CHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6,80 (s, 1H, CH (His)), 7,13 (m, 6H, CH (His), ArH), 7,25-7,48 (m, 32H), 7,58-8,20 (m, 11H).  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +25,0 © 0,1, CHCl<sub>3</sub>)

## 10 Bloque 4a:

MS m/z (%): 2018 [M+2Na]<sup>+2</sup> (25), 2007 (75), 1995 (100), 1928 (25), 1885 (25).

<sup>1</sup>HRMN: 500 MHZ (CD<sub>3</sub>OD), d 0,9 (m, 18H), 1,05-1,30 (m, 107H), 1,4 (s, 9H), 1,50-1,70 (m, 10H), 1,75-2,30 (m, 28H), 2,50 (d, J = 4,5 Hz, 6H), 2,60-2,90 (m, 4H), 3,0-3,40 (m, 4H), 3,40-4,0 (m, 27H), 4,0-4,80 (m, 36H), 5,10 (m, 1H), 5,35 (dd, 1H, J = 11, 3Hz, 1H), 5,55 (s, 1H, CHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6,80 (s, 1H, CH (His)), 7,11 (m, 6H), 7,20-8,0 (m, 28H).  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -6,5 © 0,1, CHCl<sub>3</sub>)

## Bloque 4b:

20 MS m/z (%): 2387,5 [M+2Na]<sup>+2</sup> (70), 2377,5 (100).

<sup>1</sup>HRMN: 500 MHZ (CD<sub>3</sub>OD), d 0,8-0,9 (m, 18H), 1,10-1,15 (m, 9H, CH<sub>3</sub> (Thr)), 1,15-1,45 (m, 98H), 1,45-2,40 (m, 59H), 2,40-2,80 (m, 11H), 2,90-3,10 (m, 2H), 3,10-3,25 (m, 3H), 3,35-4,0 (m, 35H), 4,0-4,20 (m, 15H), 4,25-4,50 (m, 18H), 4,60-4,90 (m, 10H), 5,0-5,15 (m, 3H), 5,25-5,40 (m, 5H), 5,55-5,62 (m, 3H), 6,80 (s, 1H, CH (His)), 7,1-7,45 (m, 30H), 7,50-8,15 (m, 12H).  
25 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +4,0 © 0,1, CHCl<sub>3</sub>)

## Bloque 2a:

30 MS m/z (%): MALDI, 7403 [M+Na]<sup>+</sup> (95), 7161,8 (100).

ES+, 3713 (30), 3592,2 (10), 2483,1 (100), 1868,3 (35).  
<sup>1</sup>HRMN: 600 MHZ (CD<sub>3</sub>OD), d 0,85-0,95 (m, 24H), 1,05-1,34 (m, 161H), 1,40 (s, 9H), 1,41 (s, 9H), 1,48-1,70 (m, 12H), 1,75-2,0 (m, 49H), 2,06 (s, 3H), 2,08-2,20 (m, 10H), 2,50-2,56 (m, 13H), 2,59-2,64 (m, 3H), 2,66-2,75 (m, 2H), 2,76-2,90 (m, 2H), 2,94-3,06 (m, 4H), 3,08-3,25 (m, 4H), 3,32-4,0 (m, 52H), 4,0-4,24 (m, 20H), 4,24-4,90 (m, 42H), 5,10 (dd, J = 19, 5Hz, 2H), 5,28-5,39 (m, 4H), 5,53 (s, 1H, CHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,57 (s, 1H, CHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,59 (s, 1H, CHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6,72 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,95-7,15 (m, 13H), 7,25-7,30 (m, 12H), 7,33-7,45 (m, 40H), 7,55-8,01 (m, 14H).  
35 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -0,5 © 0,1, CHCl<sub>3</sub>)

## Bloque 2b:

40 MS m/z (%): MALDI, 8147,6 [M]<sup>+</sup> (100).

ES+, 4096 (65), 2738,7 (100), 2059,6 (17).  
<sup>1</sup>HRMN: 600 MHZ (CD<sub>3</sub>OD), d 0,85-1,0 (m, 24H), 1,05-1,45 (m, 161H), 1,45-2,40 (m, 94H), 2,45-2,90 (m, 21H), 2,90-3,30 (m, 9H), 3,40-4,30 (m, 80H), 4,30-5,0 (m, 52H), 5,02-5,15 (m, 4H), 5,25-5,40 (m, 8H), 5,50-5,65 (m, 4H), 6,75 (s, 2H), 7,10-7,20 (m, 13H), 7,20-7,65 (m, 54H), 7,70-8,10 (m, 8H).  
45 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 0,0 © 0,1, CHCl<sub>3</sub>)

## Compuesto 1a:

50 MS m/z (%): MALDI, 5046,89 [M+H]<sup>+</sup> (100), 4824,66 (25).

ES+, 2524,2 [M+2H]<sup>+2</sup> (30), 1682,9 (90), 1262,6 (100).  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -100,0 © 0,1, H<sub>2</sub>O)

## Compuesto 1b:

55 MS m/z (%): MALDI, 5541,34 [M+H]<sup>+</sup> (100), 5249,55 (50), 5028,21 (55).

ES+, 2771 [M+2H]<sup>+2</sup> (25), 1848 (55), 1751 (40), 1683 (20), 1386 (100), 1313 (70), 1263 (85), 1212 (55).  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -29,5,0 © 0,1, H<sub>2</sub>O).

Investigaciones inmunológicas:

60 Se han investigado a fondo las respuestas inmunitarias a los dos ejemplos de glucolipopéptidos (GLP) sintéticos 1a y 1b. Los resultados indican que las características estructurales incorporadas a dichas moléculas se reflejan en el amplio espectro de respuestas inmunitarias, tanto humorales como celulares. El lípido A sintético se ha utilizado como adyuvante para las dos formulaciones de GLP en liposomas.

65

En la figura 16 se presenta un resumen de datos inmunológicos de ratones tras la inmunización con las formulaciones de vacuna para los dos glucolipopéptidos 1a y 1b, designadas 1a y 1b, respectivamente. Los grupos de ratones C57B1/6 inmunizados con alguna de las dos formulaciones de glucolipopéptidos en liposomas con lípido A sintético (figura 16) produjeron una respuesta proliferativa muy potente y específica de linfocitos T y niveles elevados de IFN-g (figuras 17 y 18). Se analizaron los sueros de los mismos ratones tras dos inmunizaciones frente a diversas fases sólidas para detectar títulos de anticuerpos IgG e IgM específicos. Los glucolipopéptidos 1a y 1b se utilizaron como fuente de fases sólidas sintéticas, y la mucina submaxilar ovina (OSM) tratada con neuraminidasa y la mucina MUC1 humana purificada a partir de líquido ascítico obtenido de pacientes de cáncer se utilizaron como fuente de fases sólidas naturales. Tal como se indica en la tabla 3, 1a y 1b desencadenaron fuertes respuestas de anticuerpos IgG contra las fases sólidas sintéticas, con títulos de 1/218, 700. En la fase sólida de mucina MUC1, los títulos están comprendidos entre 1/300 y 1/900.

Las respuestas de IgM se indican en la tabla 4. Los dos glucolipopéptidos desencadenaron títulos de IgM contra la fase sólida sintética con títulos de 1/2700 de promedio. Se observan títulos parecidos con OSM tratada con neuraminidasa como fase sólida, lo que sugiere la acción de anticuerpos específicos de hidratos de carbono al antígeno Tn de hidratos de carbono. Se ha puesto de manifiesto que algunos títulos de IgM se unen a la fase sólida de mucina MUC1 humana. También se ha demostrado que los anticuerpos del suero inmunitario se unen a células tumorales transfectadas con MUC1 humana.

Los datos indicados demuestran claramente que los glucolipopéptidos sintéticos, cuando se formulan en un sistema de administración liposómica, son inductores muy potentes de respuestas inmunitarias celulares (T1) y humorales (T2) contra las fuentes tanto naturales como sintéticas de antígeno de MUC1. Estas potentes respuestas pueden ser consecuencia del reconocimiento por parte de los ratones C57B1/6 normales de estos glucolipopéptidos sintéticos, que son mimetizadores de la mucina MUC1 humana, como antígenos extraños. Para comprobar si estos antígenos son tolerados en ratones transfectados con el gen de la MUC1 humana, se inmunizan los ratones transgénicos que expresan mucina MUC1. Tal como se muestra en la figura 18, los ratones transgénicos de MUC1 humana mantienen una potente respuesta proliferativa específica de linfocitos T y una producción de IFN-g comparable con las respuestas inmunitarias observadas en los ratones C57B1/6 normales. Las inmunizaciones de ratones transfectados con MUC1 humana reprodujeron títulos tan elevados de anticuerpos IgG e IgM (tablas 5 y 6) como los observados en los C57B1/6 normales. Las potentes respuestas inmunitarias, tanto de tipo T1 como de tipo T2, se mantienen mediante 10 inmunizaciones bisemanales. Estas observaciones indican que las vacunas sintéticas liposómicas de glucopéptidos son capaces de superar la tolerancia a los antígenos propios en modelos de ratón. Dicho estudio demuestra la utilidad de los antígenos propios sintéticos en forma de glucolipopéptidos, tal como en vacunas contra el cáncer.

#### Breve descripción de las tablas

Nota: tabla 1 eliminada.

Tabla 2: Lista de abreviaturas utilizadas para los reactivos, los grupos protectores y los productos intermedios.

Tabla 3: títulos de anticuerpos IgG en ratones C57B1/6 tras dos inmunizaciones.

Tabla 4: títulos de anticuerpos IgM en ratones C57B1/6 tras dos inmunizaciones.

Tabla 5: títulos de anticuerpos IgG en ratones C57B1/6 tras 10 inmunizaciones.

Tabla 6: títulos de anticuerpos IgM en ratones C57B1/6 tras 10 inmunizaciones.

Tabla 2

#### Abreviaturas de reactivos y términos utilizados en el texto

Boc	: t-butiloxicarbonilo
DCC	: 1,3-diciclohexilcarbodiimida
DCM	: Diclorometano
DIEA	: Diisopropiletilamina
DMF	: Dimetilformamida
Fmoc	: 9 fluorenilmetiloxicarbonilo
Gal	: Galactosa
GalNAc	: N-acetil-galactosamina
HOBt	: 1-hidroxibenzotriazol hidrato
HPTLC	: Cromatografía en capa fina de alto rendimiento

Lip	: Cadena lipídica (-C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> )
MeOH	: Metanol
MUC1	: Mucina 1
NaOMe	: Metóxido de sodio
Neu5Ac	: ácido N-acetilneuramínico
NHS	: N-hidroxisuccinimida
Pd/C	: Paladio sobre carbón
Pmc	: 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo
Rf	: Factor de retención
RP-HPLC	: Cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento
RT	: Temperatura ambiente
tBu	: butilo terciario
TFA	: Ácido trifluoroacético
THF	: Tetrahidrofurano
TLC	: Cromatografía en capa fina
Tn	: α-N-acetilgalactosamina
Trt	: Tritilo

Tabla 3. Respuesta de anticuerpos IgG en ratones C57B1/6 tras dos inmunizaciones con vacunas sintéticas liposómicas de glucolipopéptidos\*

Material inyectado	Títulos de anticuerpos		IgG
	fase sólida 1a	fase sólida 1b	Fase sólida de mucina MUC1 humana
1a	1/218,700	1/218,700	1/300
1b	1/218,700	1/218,700	1/900
Salina	<1/100	<1/100	<1/100

5

Tabla 4. Respuesta de anticuerpos IgM en ratones C57B1/6 tras dos inmunizaciones con vacunas sintéticas liposómicas de glucolipopéptidos\*

Material inyectado	Títulos de anticuerpos		IgM
	fase sólida 1b	Osm tratada con neuraminidasa	Fase sólida de mucina MUC1 humana
1a	1/2700	1/2700	1/300
1b	1/2700	1/2700	1/900
Salina	<1/100	<1/100	<1/100

Se analizaron los sueros de los ratones inmunizados para determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM utilizando fases sólidas tanto sintéticas como naturales. Los glucolipopéptidos sintéticos 1a y 1b se utilizaron como fase sólida sintética. Las fases sólidas naturales fueron las siguientes: mucina MUC1 humana purificada a partir del líquido ascítico de paciente de cáncer de ovario y OSM (mucina submaxilar ovina), que es una fuente natural de antígeno de hidratos de carbono STn. El tratamiento de la OSM con neuraminidasa conduce a la exposición de antígenos Tn de hidratos de carbono.

10

Tabla 5. Respuesta de anticuerpos IgG en ratones C57B1/6 transgénicos de MUC1 humana tras diez inmunizaciones con vacunas sintéticas liposómicas de glucolipopéptidos\*

Material inyectado	Títulos de anticuerpos		IgG
	fase sólida 1a	fase sólida 1b	Fase sólida de mucina MUC1 humana
1a	1/72,900	1/72,900	<1/100
1b	1/72,900	1/24,300	<1/100
Salina	<1/100	<1/100	<1/100

Tabla 6. Respuesta de anticuerpos IgM en ratones C57B1/6 transgénicos de MUC1 humana tras diez inmunizaciones con vacunas sintéticas liposómicas de glucolipopéptidos\*

Material inyectado	Títulos de anticuerpos		IgM
	fase sólida 1b	Osm tratada con neuraminidasa	Fase sólida de mucina MUC1 humana
1a	1/24,300	1/300	1/2700
1b	1/24,300	1/100	1/300
Salina	<1/100	<1/100	<1/100

\*Se analizaron los sueros de los ratones inmunizados para determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM utilizando fases sólidas tanto sintéticas como naturales. Los glucolipopéptidos sintéticos 1a y 1b se utilizaron como fase sólida sintética. Las fases sólidas naturales fueron las siguientes: mucina MUC1 humana purificada a partir del líquido ascítico de paciente de cáncer de ovario y OSM (mucina submaxilar ovina), que es una fuente natural de antígeno de hidratos de carbono STn. El tratamiento de la OSM con neuraminidasa conduce a la exposición de antígenos Tn de hidratos de carbono.

5 La citación de documentos en la presente memoria no debe interpretarse como una asunción de que cualquiera de dichos documentos citados constituye técnica anterior pertinente, o como una asunción de que dichos documentos se consideran material para la patentabilidad de cualquiera de las reivindicaciones de la presente solicitud. Todas las afirmaciones en cuanto a la fecha o representación en cuanto al contenido de estos documentos se basan en la información disponible para el solicitante y no constituyen ninguna asunción en cuanto a la corrección de las fechas o el contenido de los mismos.

Las reivindicaciones adjuntas deben considerarse una descripción no limitativa de formas de realización preferentes.

15 Además de las citadas en otros puntos del documento, las siguientes referencias en sus ediciones más recientes a la fecha de presentación de la presente solicitud pueden resultar relevantes para la comprensión de la presente invención: Kay, Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual; la serie Current Protocols de John Wiley and Sons, incluidos: Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology; Coligan, Current Protocols in Protein Science; Coligan, Current Protocols in Immunology; Current Protocols in Human Genetics; Current Protocols in Cytometry; Current Protocols in Pharmacology; Current Protocols in Neuroscience; Current Protocols in Cell Biology; Current Protocols in Toxicology; Current Protocols in Field Analytical Chemistry; Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry; and Current Protocols in Human Genetics; and the following Cold Spring Harbor Laboratory publications: Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual; Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Drosophila Protocols; Imaging Neurons: A Laboratory Manual; Early Development of Xenopus laevis: A Laboratory Manual; Using Antibodies: A Laboratory Manual; At the Bench: A Laboratory Navigator; Cells: A Laboratory Manual; Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual; Discovering Neurons: The Experimental Basis of Neuroscience; Genome Analysis: A Laboratory Manual Series ; Laboratory DNA Science; Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual; Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria: A Laboratory Manual; I PCR Primer: A Laboratory Manual; Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual ; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual; Molecular Probes of the Nervous System; Experiments with Fission Yeast: A Laboratory Course Manual; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria; DNA Science: A First Course in Recombinant DNA Technology; Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual; Molecular Biology of Plants: A Laboratory Course Manual.

35 La referencia a etapas metodológicas conocidas, etapas metodológicas convencionales, procedimientos conocidos o procedimientos convencionales no es en ningún sentido una asunción de que cualquier aspecto, descripción o forma de realización de la presente invención se da a conocer, se describe o se sugiere en la técnica pertinente.

40 La anterior descripción de las formas de realización específicas revelan la naturaleza general de la presente invención de tal modo que, mediante la aplicación de conocimientos incluidos en la técnica (incluido el contenido de las referencias citadas en el presente documento), otras personas podrán modificar y/o adaptar fácilmente dichas formas de realización específicas a diversas aplicaciones sin llevar a cabo ninguna experimentación innecesaria y sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, dichas adaptaciones y modificaciones están incluidas dentro del sentido y el alcance de los equivalentes de las formas de realización dadas a conocer sobre la base de las enseñanzas e indicaciones presentadas en el presente documento. Cabe entender que la fraseología o terminología utilizada en el presente documento sirve al propósito de describir, y no de limitar, de tal modo que el experto en la materia debe interpretar la terminología o fraseología de la presente memoria a la luz de las enseñanzas e indicaciones presentadas en el presente documento junto con los conocimientos del experto en la materia.

Toda descripción de una clase o intervalo como útil o preferente en la aplicación de la presente invención debe ser considerada como una descripción de cualquier subclase (por ejemplo, una clase dada a conocer con uno o más miembros dados a conocer omitidos) o subintervalo contenidos en los mismos, así como una descripción independiente de cada miembro o valor individuales de dicha clase o intervalo.

5 La descripción de las formas de realización preferentes individuales debe considerarse una descripción de cualquier combinación posible de dichas formas de realización preferentes, excepción hecha de las combinaciones imposibles (por ejemplo, opciones mutuamente excluyentes para un elemento de la invención) o explícitamente excluidas en la presente memoria.

10 Si una forma de realización de la presente invención ya se ha dado a conocer en la técnica anterior, debe considerarse que la descripción de la presente invención incluye la invención tal como se da a conocer en el presente documento excluyendo dicha forma de realización.

15 Según lo previsto por el solicitante o solicitantes, la presente invención incluye pero no se limita al objeto establecido en las reivindicaciones adjuntas y a las combinaciones del mismo no reivindicadas en el presente documento. También incluye dicho objeto limitado aún más, si no como tal, al que supera una o más deficiencias dadas a conocer en la técnica anterior. En la medida en que las reivindicaciones invaden objetos dados a conocer o propuestos por la técnica anterior, el solicitante o solicitantes consideran la invención o invenciones correspondientes a dichas reivindicaciones con el objeto invasor eliminado.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Glucolipopéptido de procedencia no natural, comprendiendo dicho glucolipopéptido por lo menos un aminoácido que es un aminoácido glucosilado y por lo menos un aminoácido que es un aminoácido lipidado, en el que por lo menos un aminoácido lipidado es un aminoácido interior, en el que dicho glucolipopéptido comprende por lo menos dos epítomos MUC1 con la secuencia de aminoácidos P(D/E)(T/S)RP, y en el que
- 5
- i) como mínimo un epítomo MUC1 con la secuencia de aminoácidos P(D/E)(T/S)RP comprende por lo menos un aminoácido glucosilado, y
- 10
- ii) como mínimo un epítomo MUC1 con la secuencia de aminoácidos P(D/E)(T/S)RP no comprende ningún aminoácido glucosilado, y
- 15
- en el que la secuencia de aminoácidos de dichos epítomos MUC1 puede ser idéntica o diferente.
2. Glucolipopéptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos PDTRP (AA 6-10 de SEC ID n°: 10).
3. Glucolipopéptido según la reivindicación 1 o 2, en el que cada epítomo (i) y (ii) comprende la secuencia de aminoácidos PDTRP.
- 20
4. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende por lo menos un epítomo de linfocito T.
5. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la secuencia de aminoácidos SAPDTRP (AA 4-10 de SEC ID n°: 10).
- 25
6. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia de aminoácidos PDTRPAPGS.
- 30
7. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia de aminoácidos RPAPGS.
8. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia de aminoácidos PPAHGVT.
- 35
9. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia de aminoácidos STAPPAHGV.
- 40
10. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende por lo menos una copia de
- (a) la repetición en tándem de la secuencia consenso de MUC1 GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH (SEC ID n°: 10),
- (b) una permutación cíclica de la misma, o
- 45
- (c) una secuencia sustancialmente idéntica a las anteriores (a) o (b).
11. Glucolipopéptido según la reivindicación 10, que comprende por lo menos dos copias de (a), (b) o (c).
- 50
12. Glucolipopéptido según la reivindicación 10, que comprende por lo menos una copia de (a) o (b).
13. Glucolipopéptido según la reivindicación 10, que comprende por lo menos dos copias de (a) o (b).
14. Glucolipopéptido según la reivindicación 10, que comprende únicamente dos copias de (a) o (b).
- 55
15. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, con la secuencia de aminoácidos: TSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVSSL
16. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que por lo menos un aminoácido glucosilado está glucosilado en O.
- 60
17. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que por lo menos un aminoácido glucosilado está glucosilado en N.
18. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que por lo menos un aminoácido glucosilado está glucosilado en S.
- 65

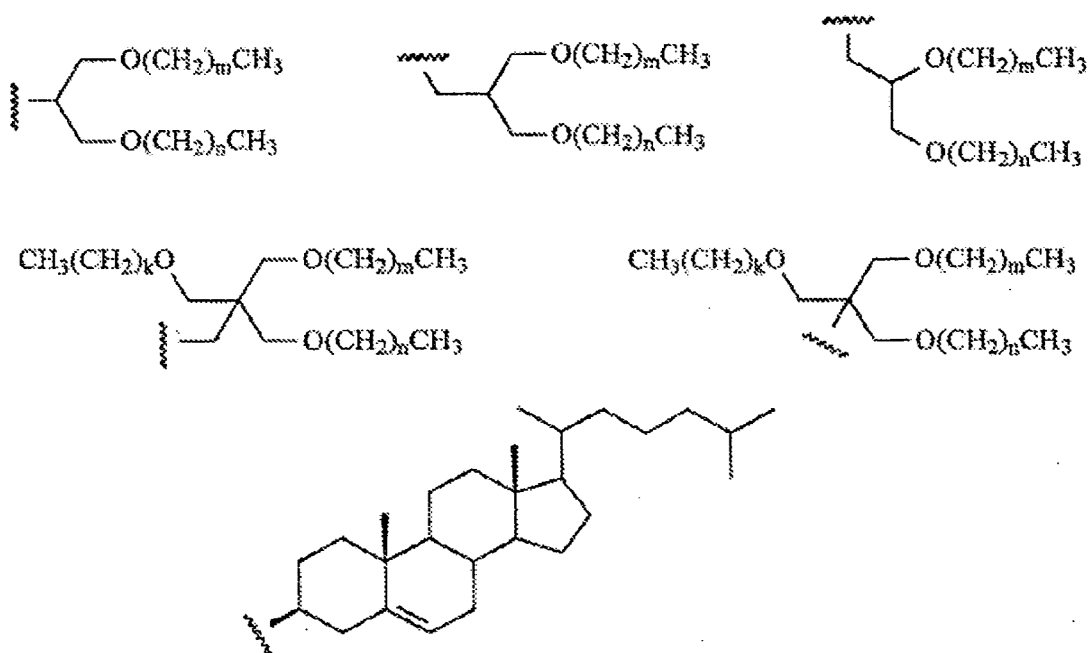
19. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende un epítipo de hidratos de carbono asociado a un tumor.
- 5 20. Glucolipopéptido según la reivindicación 19, en el que el epítipo de hidratos de carbono es GalNAc (Tn).
21. Glucolipopéptido según la reivindicación 19, en el que el epítipo de hidratos de carbono es sialil-Tn.
22. Glucolipopéptido según la reivindicación 19, en el que el epítipo de hidratos de carbono es Gal-GalNAc (TF).
- 10 23. Glucolipopéptido según la reivindicación 2, en el que la treonina de PDTRP está glucosilada.
24. Glucolipopéptido según la reivindicación 23, en el que la treonina de PDTRP está enlazada a través de O a Tn.
- 15 25. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que por lo menos dos aminoácidos están glucosilados.
26. Glucopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en el que por lo menos dos aminoácidos están lipidados.
- 20 27. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que por lo menos dos aminoácidos interiores están lipidados.
28. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en el que todos los aminoácidos lipidados son aminoácidos interiores.
- 25 29. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, caracterizado porque presenta una secuencia carboxiterminal SSL, en la que todas las serinas están lipidadas.
- 30 30. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en el que no hay más de 200 aminoácidos.
31. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en el que no hay más de 75 aminoácidos.
32. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en el que no hay más de 50 aminoácidos.
- 35 33. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, que comprende dos repeticiones en tándem efectivas que no se superponen (para un total de 40 aminoácidos).
34. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en el que por lo menos un aminoácido lipidado comprende un grupo fuertemente lipófilo que comprende por lo menos 13 átomos distintos de hidrógeno.
- 40 35. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, en el que por lo menos un aminoácido lipidado comprende un grupo fuertemente lipófilo que comprende por lo menos 21 átomos distintos de hidrógeno.
- 45 36. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en el que dicho grupo está formado por no más de 100 átomos distintos de hidrógeno.
37. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en el que dicho grupo está formado por no más de 40 átomos distintos de hidrógeno.
- 50 38. Glucopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, en el que por lo menos un grupo fuertemente lipófilo de por lo menos un aminoácido lipidado tiene un valor de logP según la predicción del algoritmo de Meylan por lo menos de 2,7.
- 55 39. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en el que el aminoácido aminoterminal comprende un grupo fuertemente lipófilo.
40. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, en el que el aminoácido carboxiterminal comprende un grupo fuertemente lipófilo.
- 60 41. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, en el que se selecciona por lo menos un aminoácido lipidado de entre el grupo constituido por Ser, Thr, Asp, Glu, Cys, Tyr, Lys, Arg, Asn o Gln lipidados.
- 65 42. Glucolipopéptido según la reivindicación 41, en el que el aminoácido lipidado es Ser o Thr lipidadas.

43. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42, en el que por lo menos un aminoácido lipidado comprende una cadena lateral de fórmula



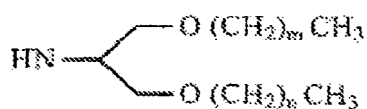
- 5  
i) en la que A es opcional pero, si existe, es un grupo orgánico de no más de 12 átomos distintos de hidrógeno;
- ii) Y es un espaciador de no más de 12 átomos distintos del hidrógeno, que comprende nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo, y Z es un grupo fuertemente lipófilo.
- 10  
44. Glucolipopéptido según la reivindicación 43, en el que A, si existe, es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.
- 15  
45. Glucolipopéptido según la reivindicación 44, en el que A existe y es  $-CH_2-$  o  $-CH(CH_3)-$ .
46. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45, en el que Y comprende un grupo seleccionado entre el grupo constituido por  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-NH-$ ,  $-NR-$ ,  $-PO_4-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-C(=NH)-$  y  $-C(=NR)-$ , siendo R un alquilo 1-4.
- 20  
47. Glucolipopéptido según la reivindicación 43, en el que Y es  $-NHCO-$ ,  $-OCO-$  o  $-SCO-$ .
48. Glucolipopéptido según la reivindicación 43, en el que Y es  $-CONH-$  o  $-CH_2NH-$ .
49. Glucolipopéptido según la reivindicación 43, en el que Y es  $-O-$ ,  $-S-$  o  $-NH-$ .
- 25  
50. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 43 a 49, en el que el propio grupo  $-Y-Z$  es un grupo fuertemente lipófilo.
51. Glucolipopéptido según la reivindicación 50, en el que A está presente y el propio grupo  $-A-Y-Z$  es un grupo fuertemente lipófilo.
- 30  
52. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 43 a 51, en el que Z es como mínimo parcialmente aromático.
- 35  
53. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 43 a 52, en el que Z es alifático.
54. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 43 a 53, en el que Z comprende por lo menos un resto que presenta la forma  $-A'-Y'-Z'$ , en el que A', Y' y Z' se definen de forma análoga a A, Y y Z, respectivamente.
- 40  
55. Glucolipopéptido según la reivindicación 54, en el que Y' es  $-O-$  y Z' es un grupo alquilo.
56. Glucolipopéptido según la reivindicación 55, en el que A es  $-(CH_2)_i-$ , en el que i es 0 o 1, o Z' es  $-(CH_2)_jCH_3$ , en el que j está comprendido entre 6 y 26.
- 45  
57. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 54 a 56, en el que Z comprende  $-B(-Y'-Z')_n$ , en el que B es un grupo orgánico ramificado de no más de 12 átomos diferentes de hidrógeno, cada Y' es un espaciador seleccionado independientemente de no más de 12 átomos distintos de hidrógeno y que comprende nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo, y cada Z' es un grupo fuertemente lipófilo seleccionado independientemente, y n es por lo menos dos.
- 50  
58. Glucolipopéptido según la reivindicación 57, en el que n es 2 o 3.
59. Glucolipopéptido según las reivindicaciones 57 o 58, en el que cada Y' es  $-O-$  y cada Z' es independientemente  $-(CH_2)_jCH_3$ , siendo j = 6 a 26.
- 55  
60. Glucolipopéptido según la reivindicación 59, en el que n = 2 y B es  $-CH(CH_2)_2$ .
61. Glucolipopéptido según la reivindicación 60, en el que n = 2 y B es  $-C(CH_2)_3$ .
- 60  
62. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 61, en el que el grupo fuertemente lipófilo de por lo menos un aminoácido lipidado, comprende por lo menos una de las siguientes estructuras:





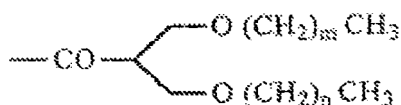
en las que m, n y k son enteros independientes con valores comprendidos entre 3 y 30.

- 5 63. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 62, en el que por lo menos un aminoácido lipidado comprende la estructura



- 10 en la que m y n son enteros independientes con valores comprendidos entre 6 y 26.

64. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 63, en el que el grupo fuertemente lipófilo de por lo menos un aminoácido lipidado, comprende la estructura:



- 15 en la que m y n son enteros seleccionados independientemente entre 6 y 26.

- 20 65. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 64, que presenta la siguiente estructura:



en la que Tn es una N-acetilgalactosamina y "lípidos" se refiere a dos o más aminoácidos lipidados consecutivos.

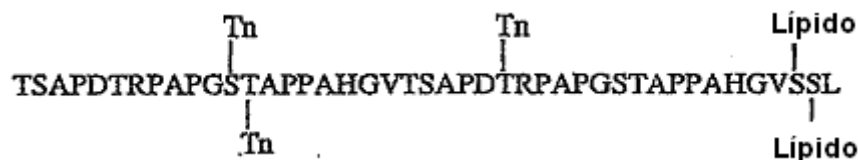
- 25 66. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 64, que presenta la siguiente estructura:



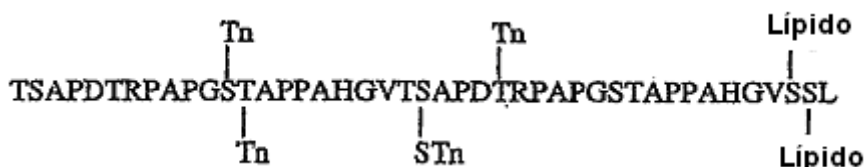
en la que Tn es una N-acetilgalactosamina y STn es un (2-6) sialil, una N-acetilgalactosamina y "lípidos" se refiere a dos o más aminoácidos lipidados consecutivos.

5 67. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 65 o 66, en el que los dos o más aminoácidos lipidados consecutivos son serinas lipidadas.

68. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 y 67, que presenta la siguiente estructura:



10 69. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 64, 66 y 67, que presenta la siguiente estructura:



15 70. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos un aminoácido glucosilado compuesto por dicho epítipo peptídico comprende un epítipo de hidratos de carbono asociado a un cáncer.

20 71. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores destinado a su utilización como medicamento.

72. Utilización del glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 70 para la preparación de un medicamento destinado a inducir una respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto.

25 73. Glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 70, para su utilización en un procedimiento destinado a inducir una respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto.

74. Utilización según la reivindicación 70, en la que dicho sujeto padece la enfermedad con la que está asociado dicho epítipo asociado al cáncer.

30 75. Glucolipopéptido según la reivindicación 72, en la que dicho sujeto padece la enfermedad con la que está asociado dicho epítipo asociado al cáncer.

76. Composición que comprende un glucolipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 70 y un liposoma.

35 77. Composición según la reivindicación 76, que comprende fosfatidilcolina.

78. Composición según la reivindicación 76, que comprende colesterol.

40 79. Composición según la reivindicación 76, que comprende fosfatidilglicerol.

80. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, destinada a su utilización como medicamento.

45 81. Utilización de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 76 a 80, para la preparación de un medicamento destinado a inducir una respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto.

82. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 76 a 80, destinada a su utilización en un procedimiento destinado a inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Figura 1

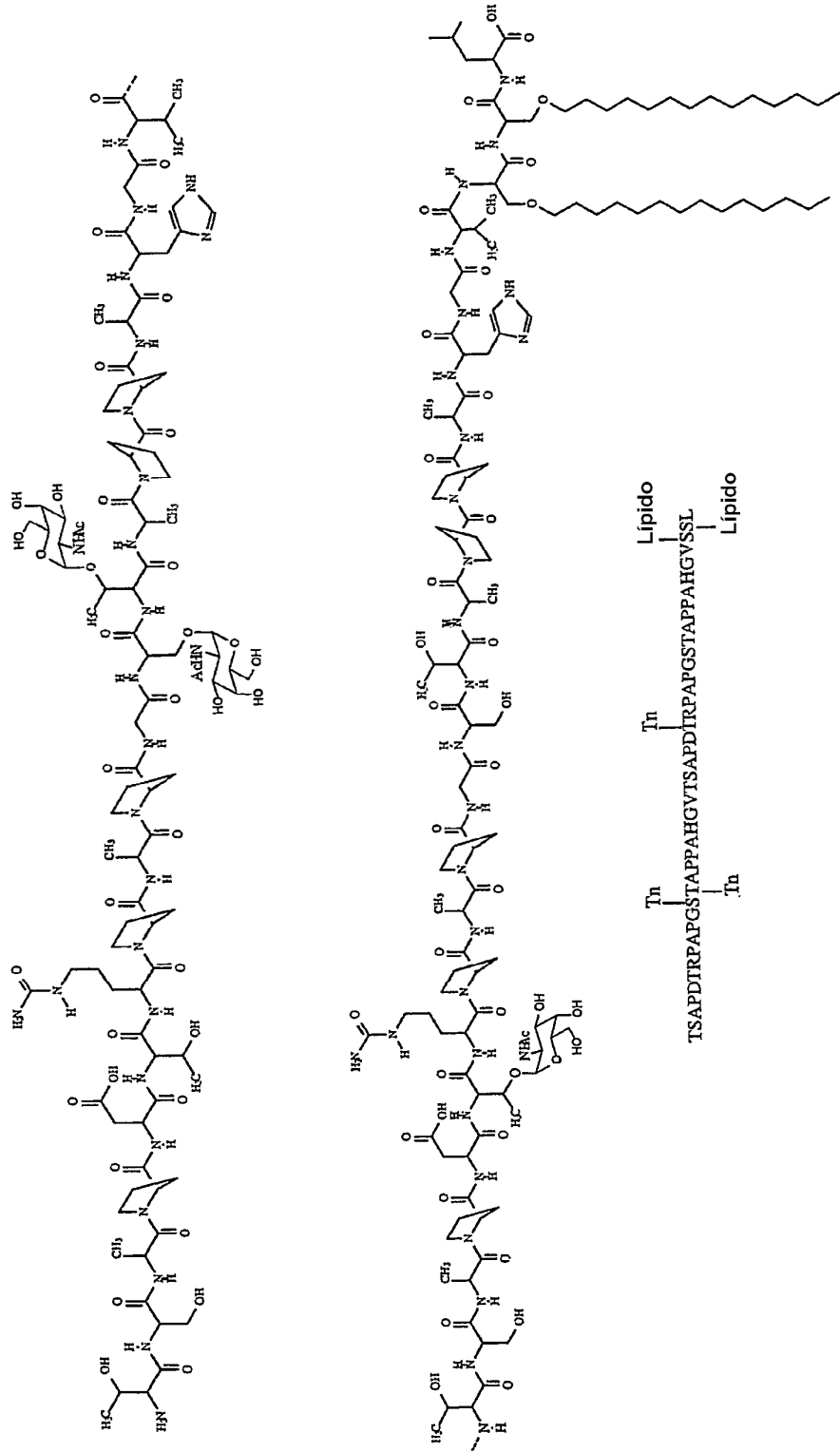


Figura 2

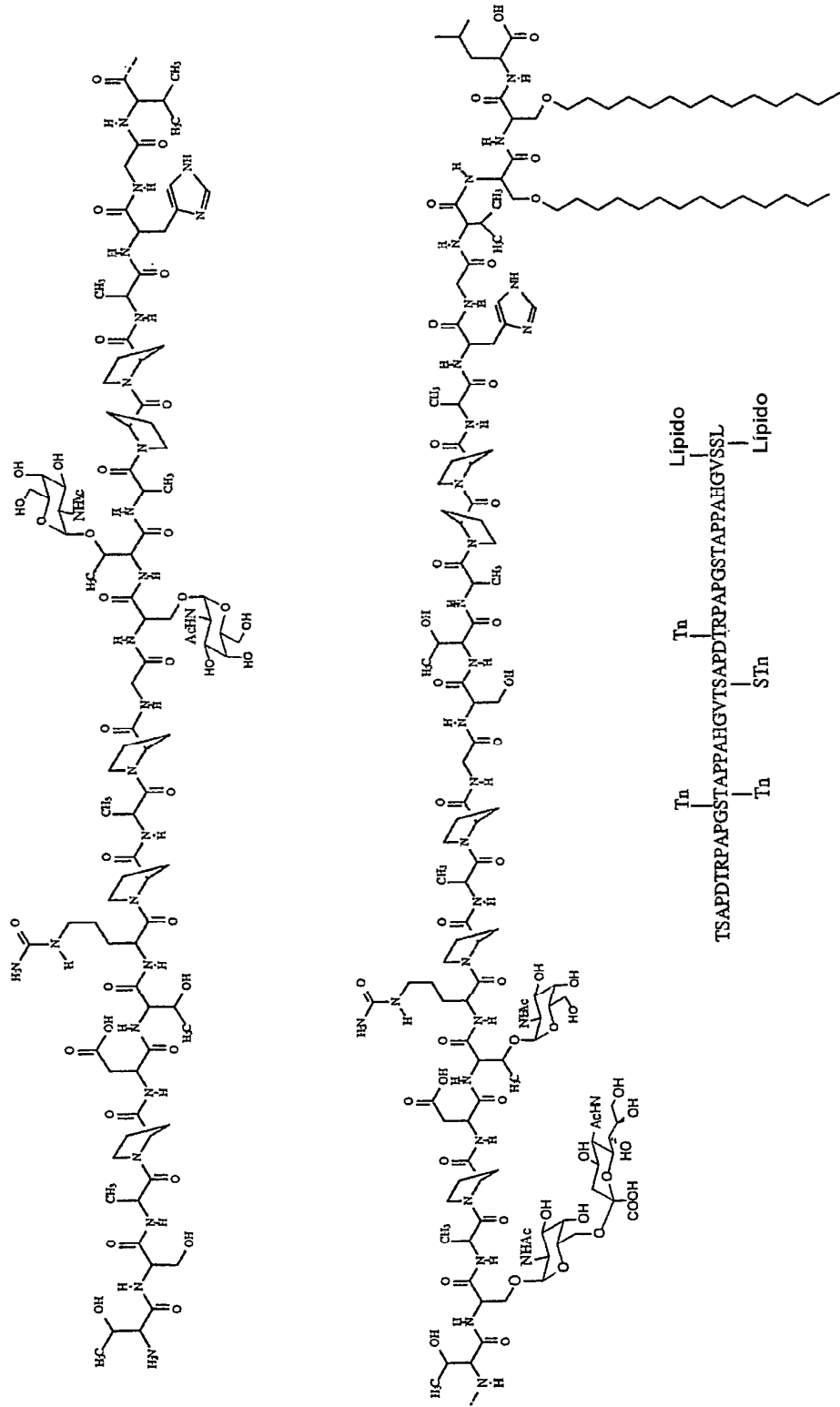


Figura 3

Epítomos de hidratos de carbono asociados a cáncer

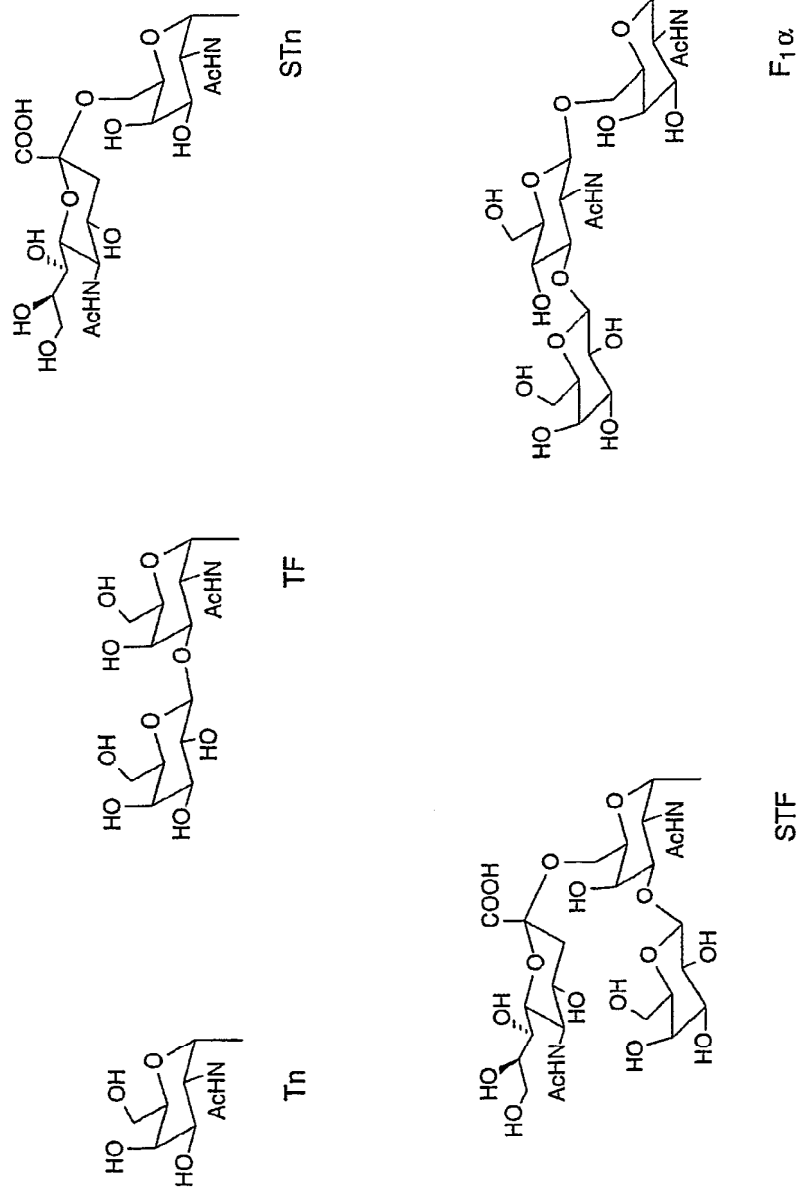


Figura 4: Aminoácidos glucosilados protegidos para la síntesis de glucopéptidos

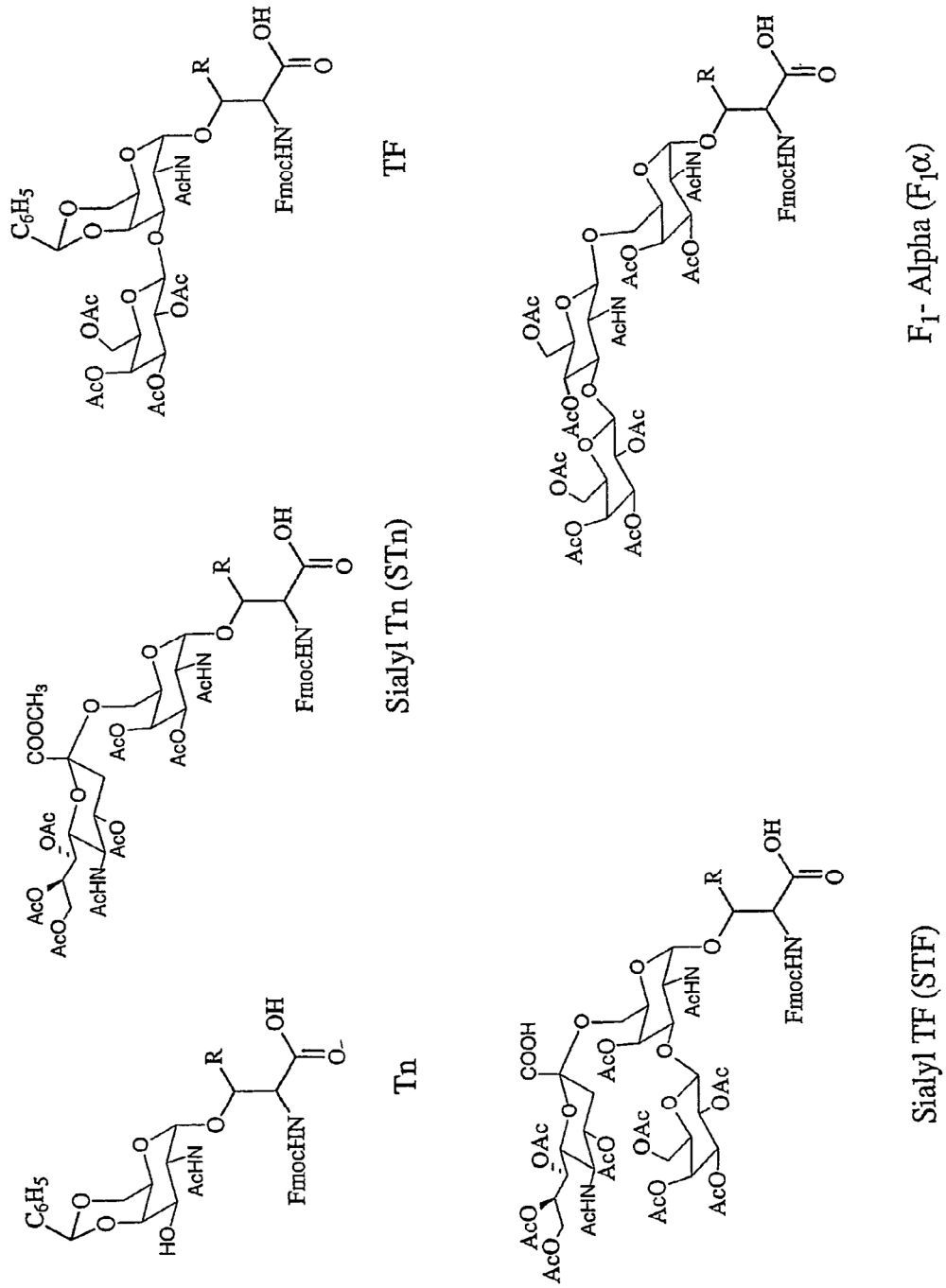


Figura 5  
Análisis retrosintético de los glucoilopéptidos 1a y 1b

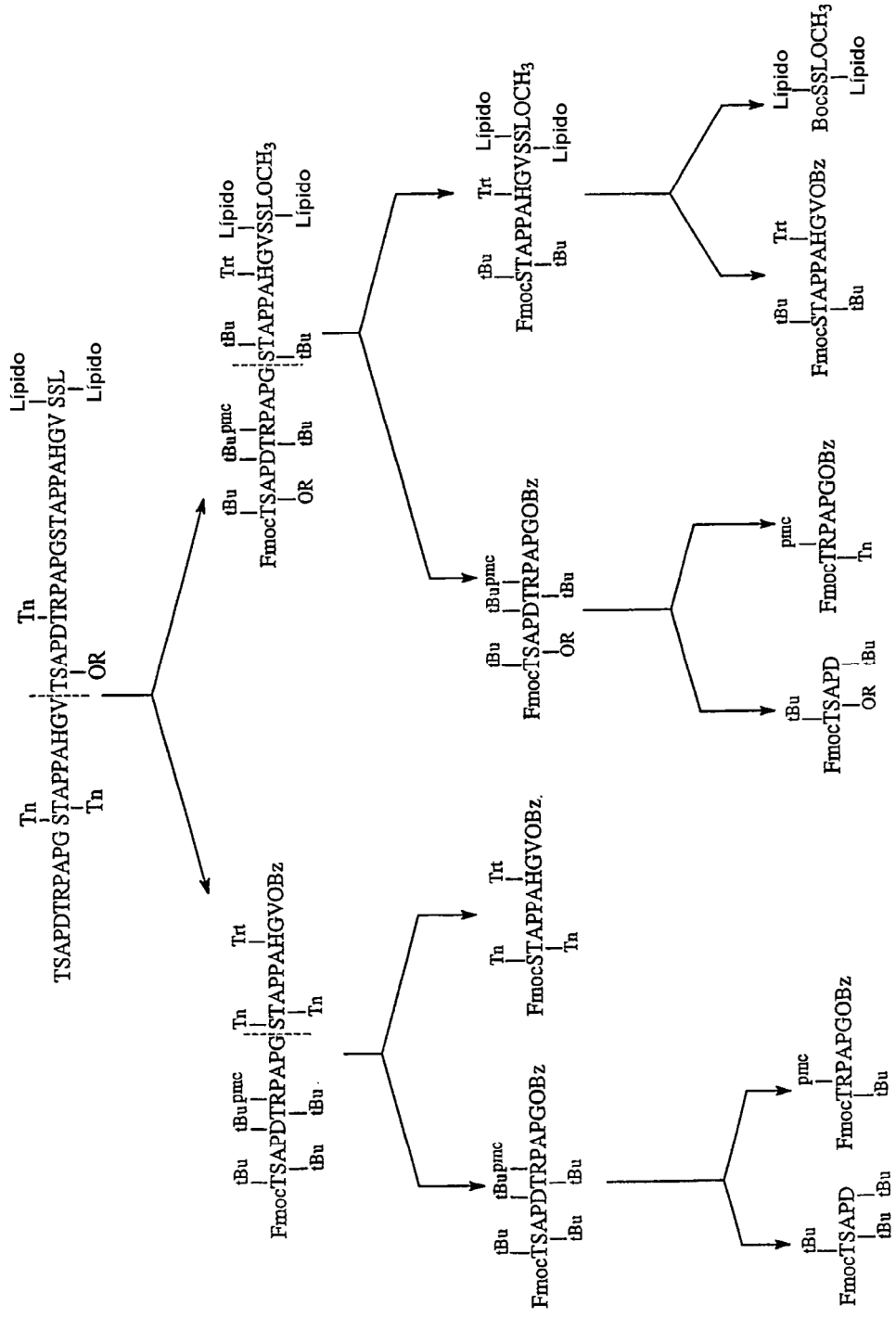
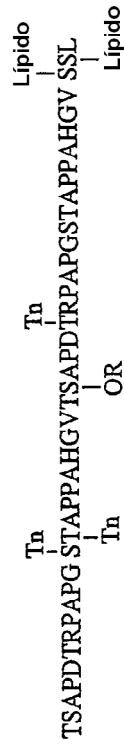


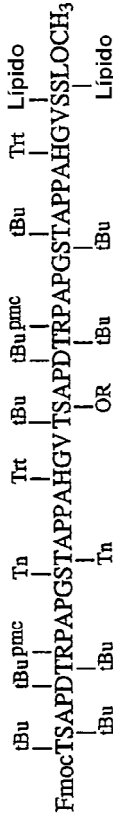
Figura 6

Productos finales y bloques avanzados



1a. R = H

1b. R = STn



2a. R = H

2b. R = STn



4a. R = H

4b. R = STn

3



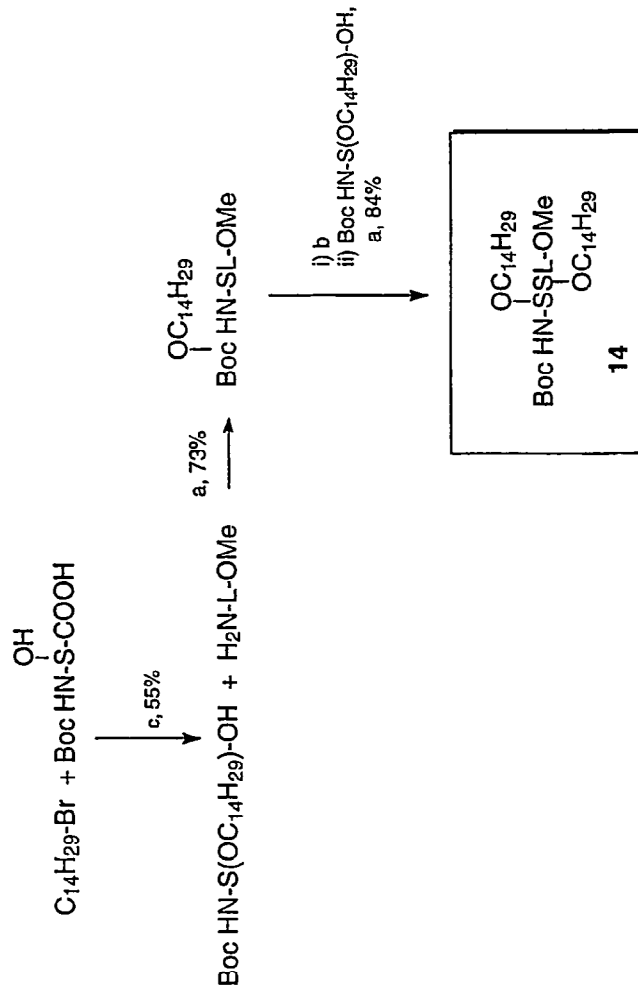
Figura 7

Bloques avanzados y de fase temprana



Figura 8

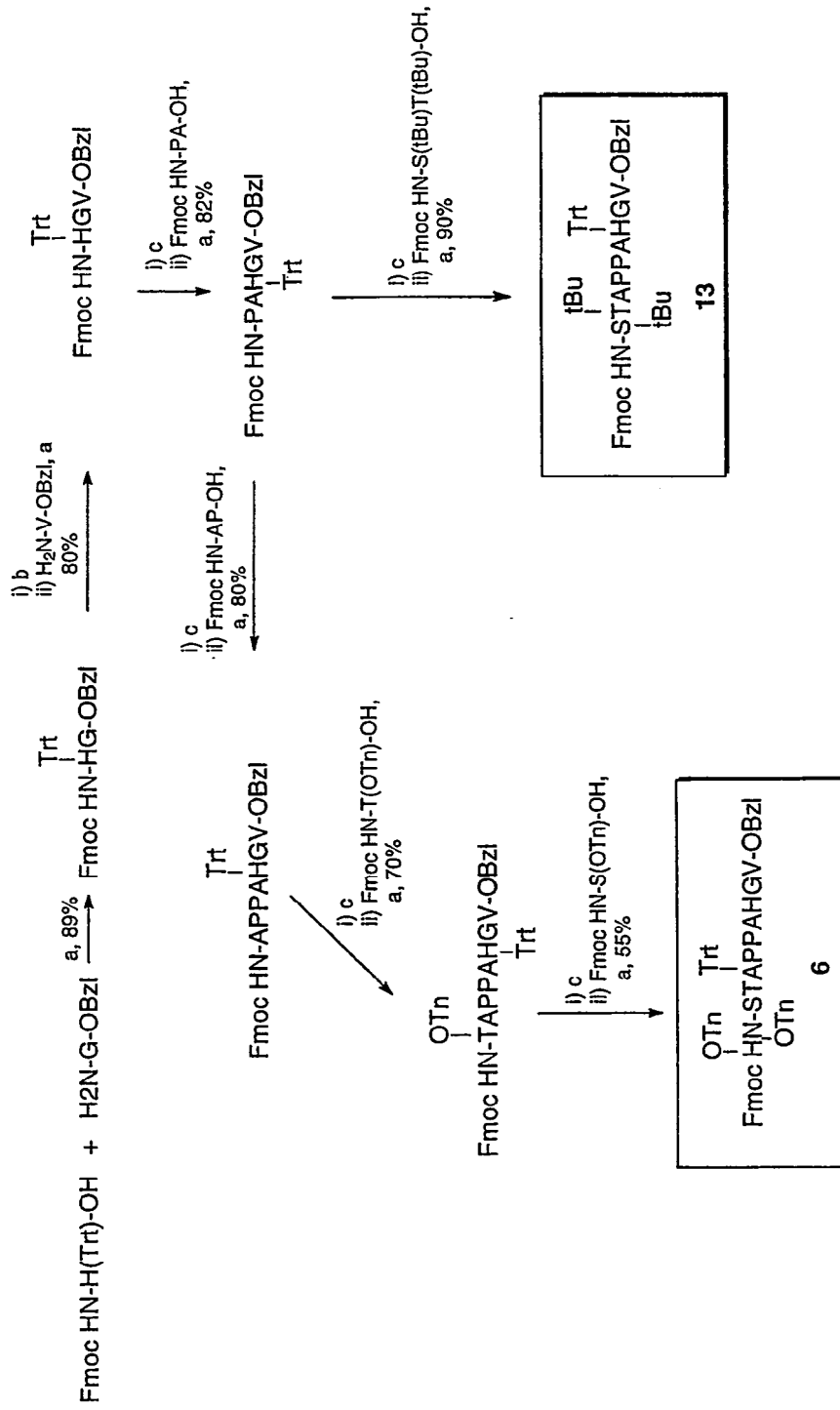
## Síntesis del bloque 14

**Reactivos y condiciones:**

a) DCC/HOBt/DCM/RT/18h; b) 3M HCl/EtOAc/30 min; c) NaH/DMF/0°C-RT/18h.

Figura 9

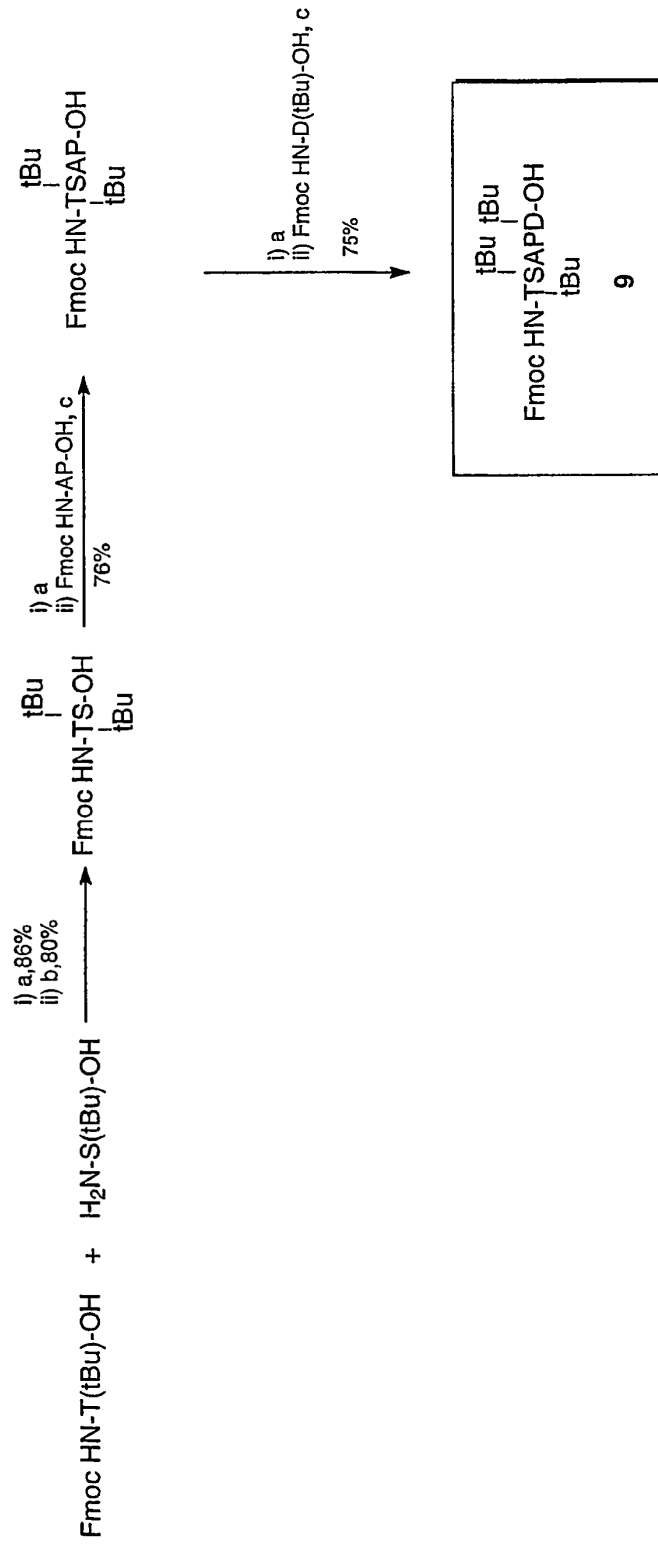
## Síntesis de los bloques 6 y 13

**Reactivos y condiciones:**

a) DCC/HOBt/DCM/RT/18h; b) Formiato de amonio/Pd-C/THF.MeOH/6°C/3h; c) Morfolina/RT/30min.

Figura 10

Esquema sintético para el bloque 9

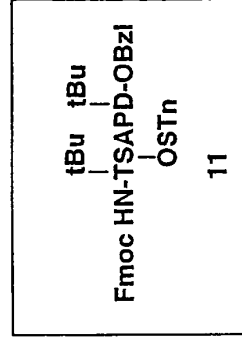
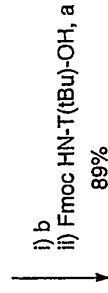
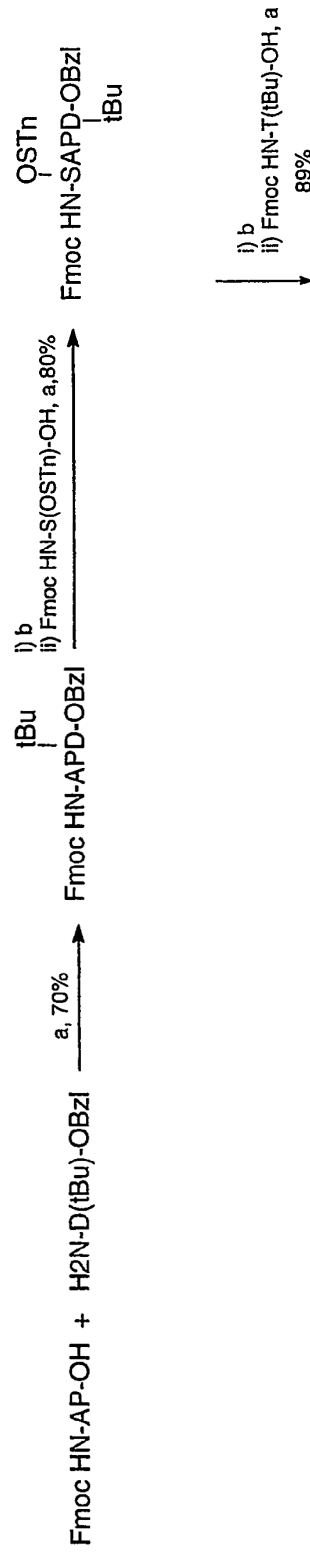


Reactivos y condiciones:

a) DCC/NHS/THF/RT/24h; b) 1,2-dimetoxietano/ NaHCO<sub>3</sub>/RT/4h; c) DIEA/DMF/RT/18h.

Figura 11

Esquema sintético para el bloque 11

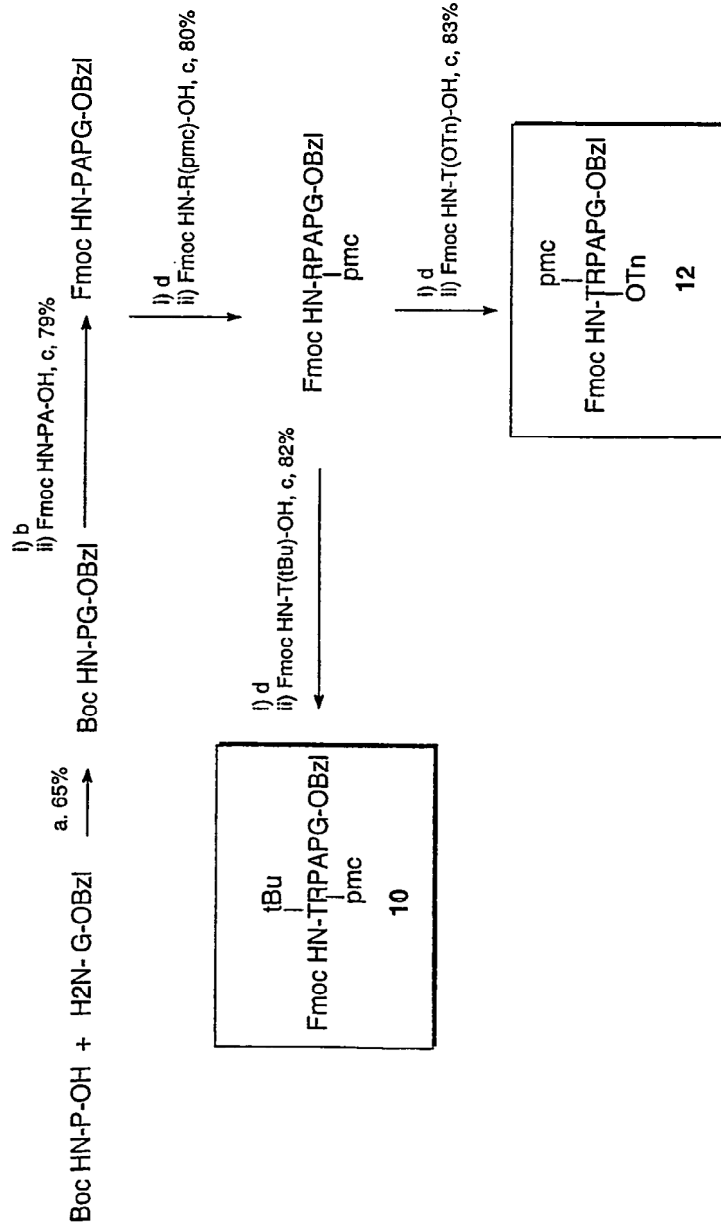


Reactivos y condiciones:

a) DCC/HOBt/DCM/RT/18h; b) Morfolina /RT/30 min.

Figura 12

Esquema sintético para los bloques 10 y 12

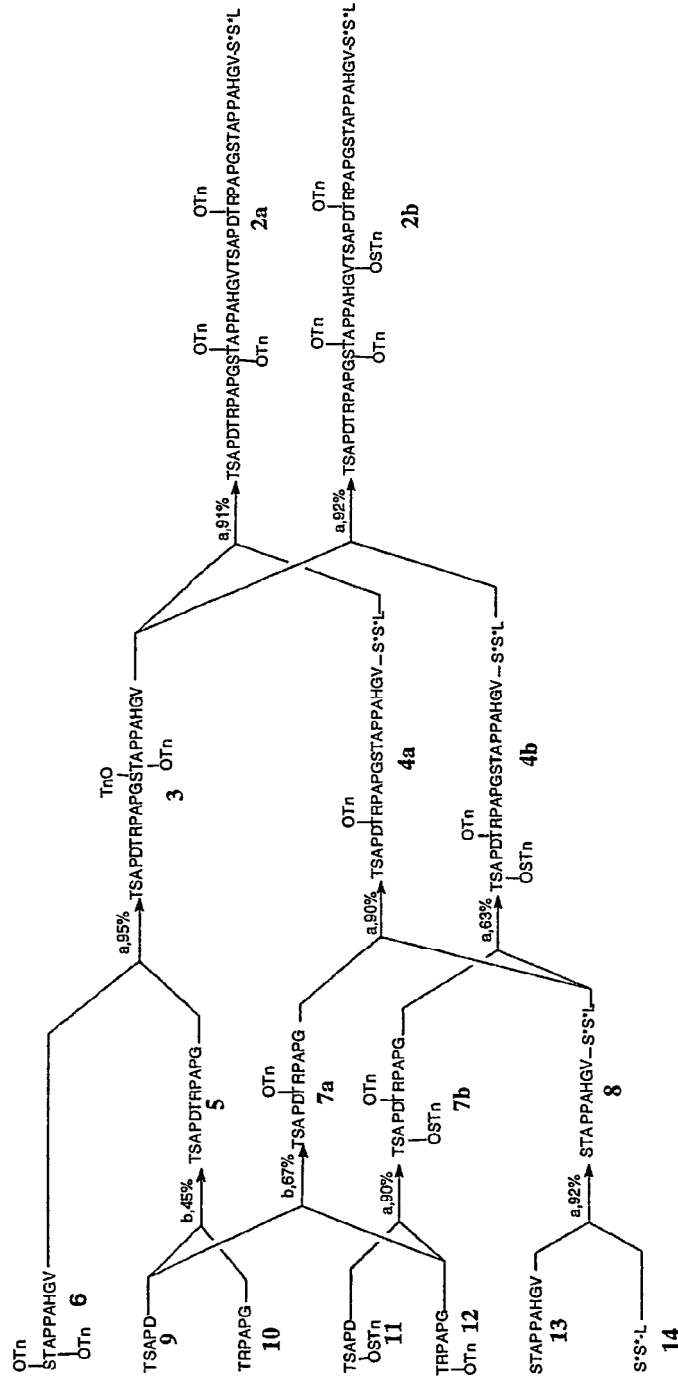


Reactivos y condiciones:

a) TEA/EEEDQ/CH<sub>3</sub>CN/0°C-RT/18h; b) TFA/DCM/RT/30min; c) DCC/HOBt/DCM/RT/18h;d) Morfolina/RT/30min.

Figura 13

Esquema para el montaje final de los bloques



Reactivos y condiciones:

- a) DCC/HOBV/DCM/RT/18h; b) i) DCC/NHSTHF/RT/18h, ii) DIEA/DMF/RT/18h.

Figura 14

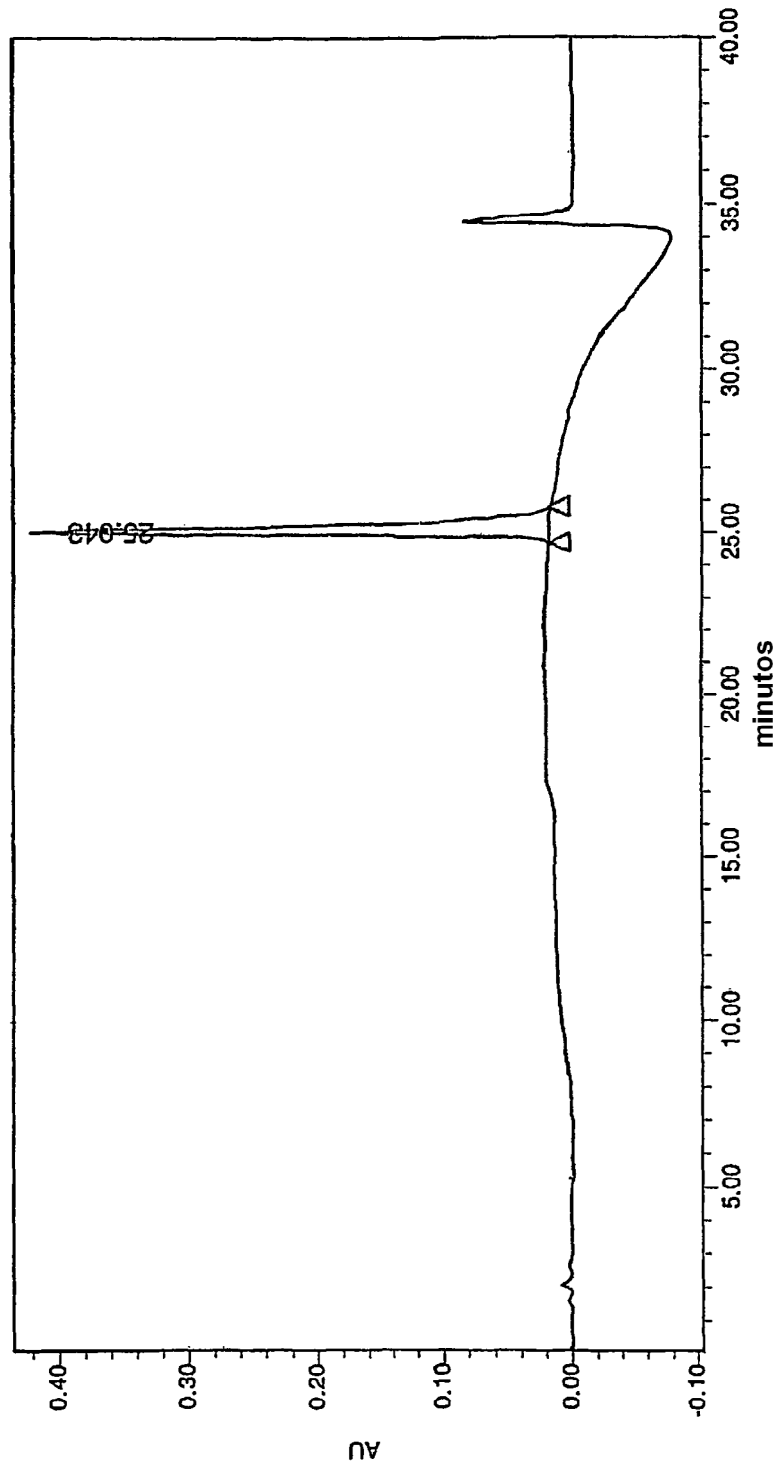




Figura 15

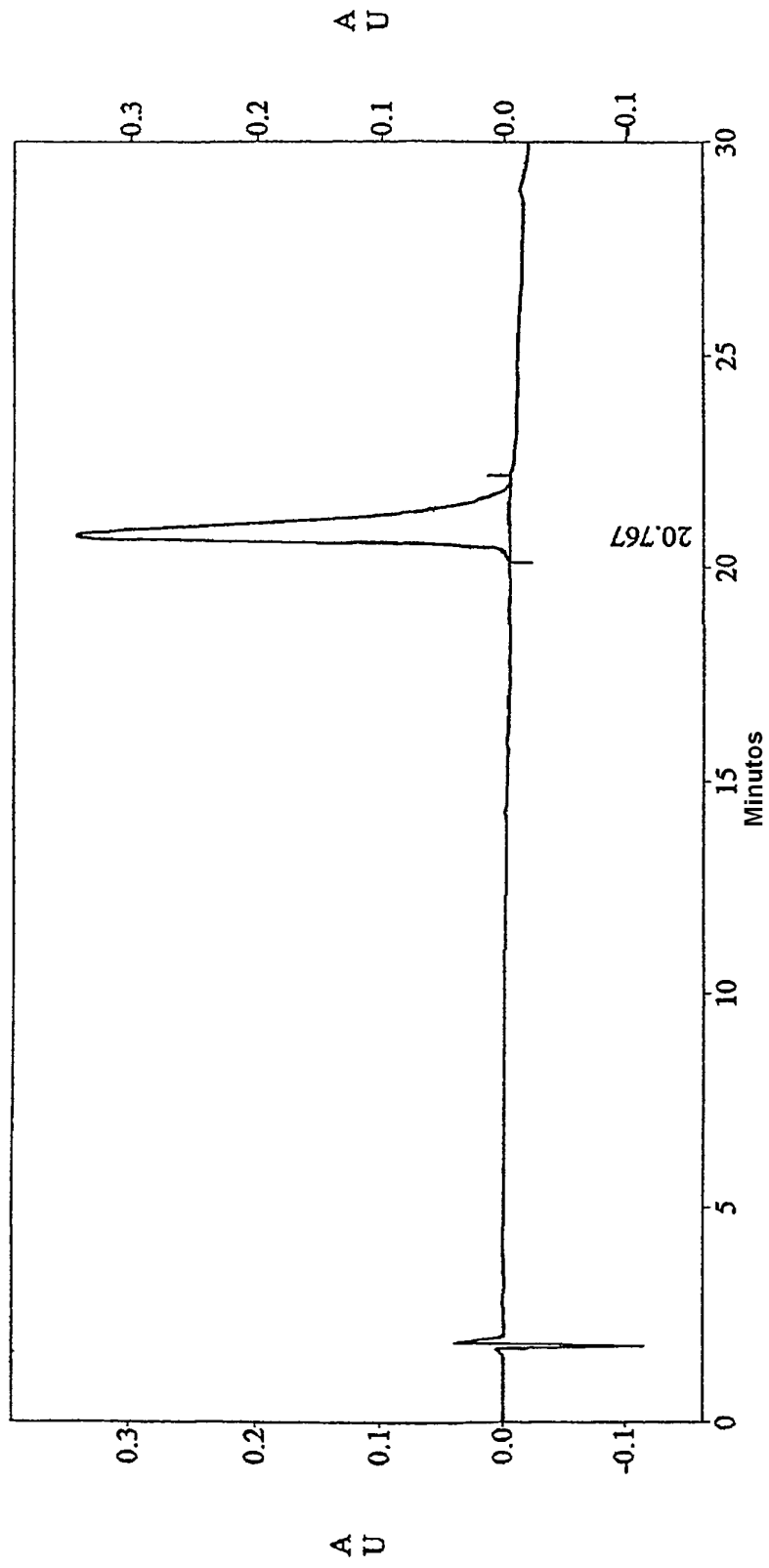


Figura 16

Lípido A sintético

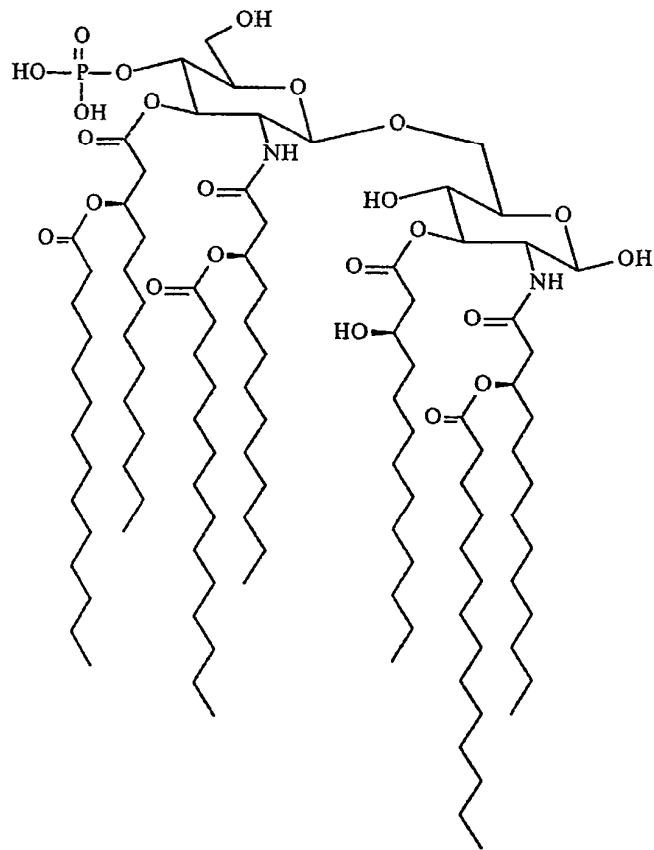
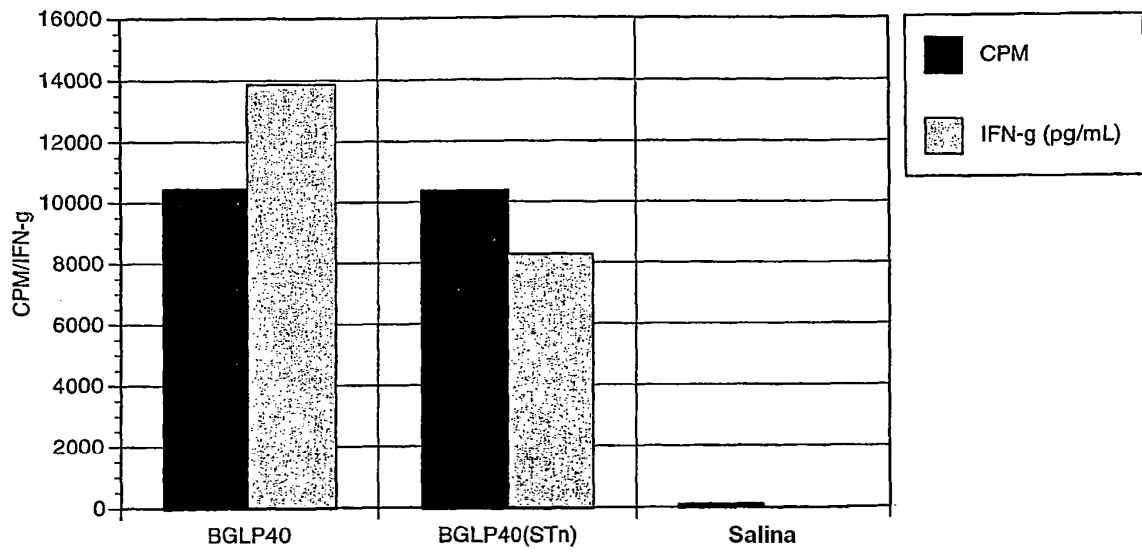
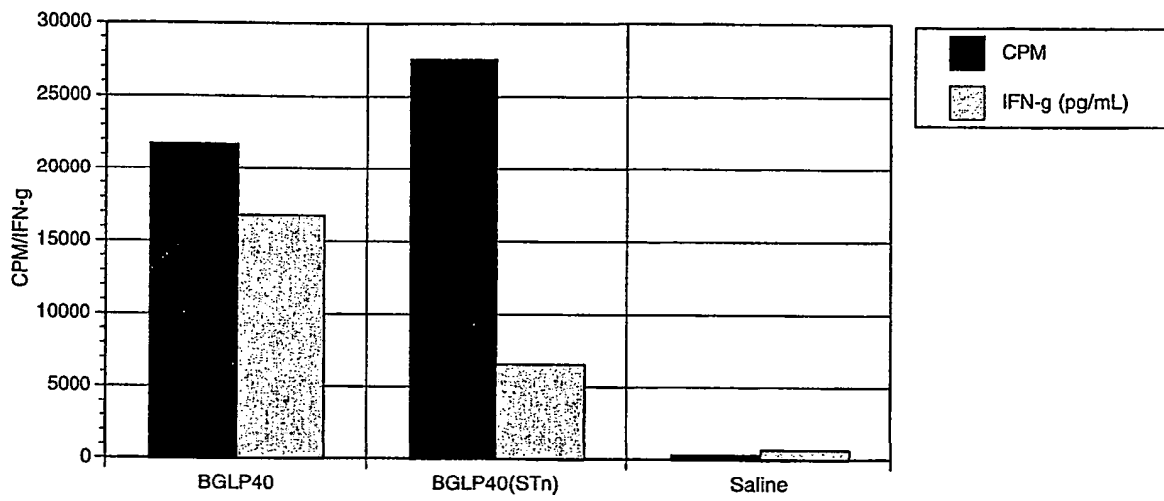


Figura 17



Respuestas de proliferación de linfocitos T e IFN-gamma en ratones C57B1/6 inmunizados dos veces con BGLP40 y BGLP40(STn) con lípido A sintético.

**Figura 18**



**Respuestas de proliferación de linfocitos T e IFN-gamma en ratones transgénicos que expresan MUC1 humana. Ratones inmunizados 10 veces intradérmicamente con vacuna de MUC1 basada en liposomas.**

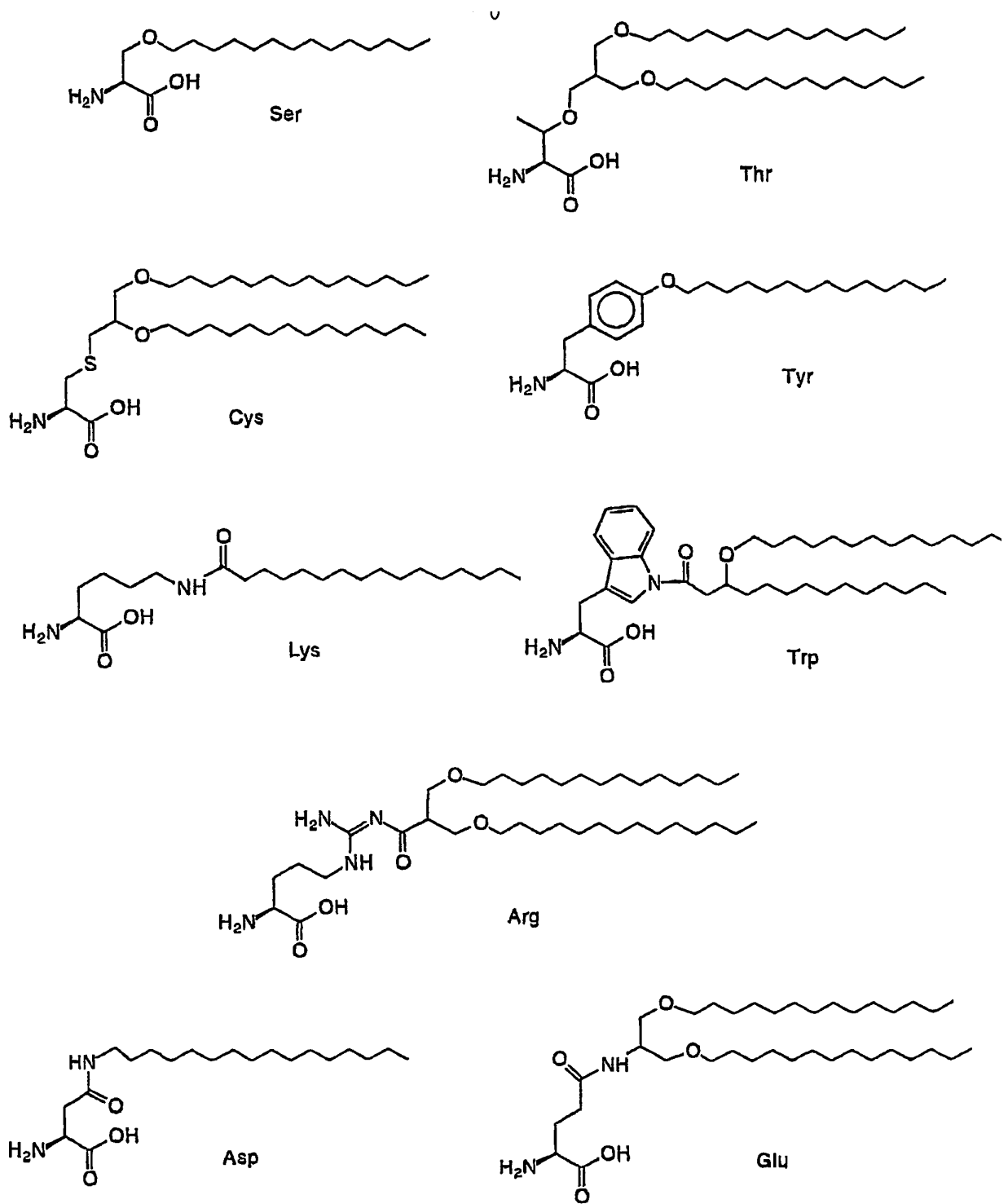
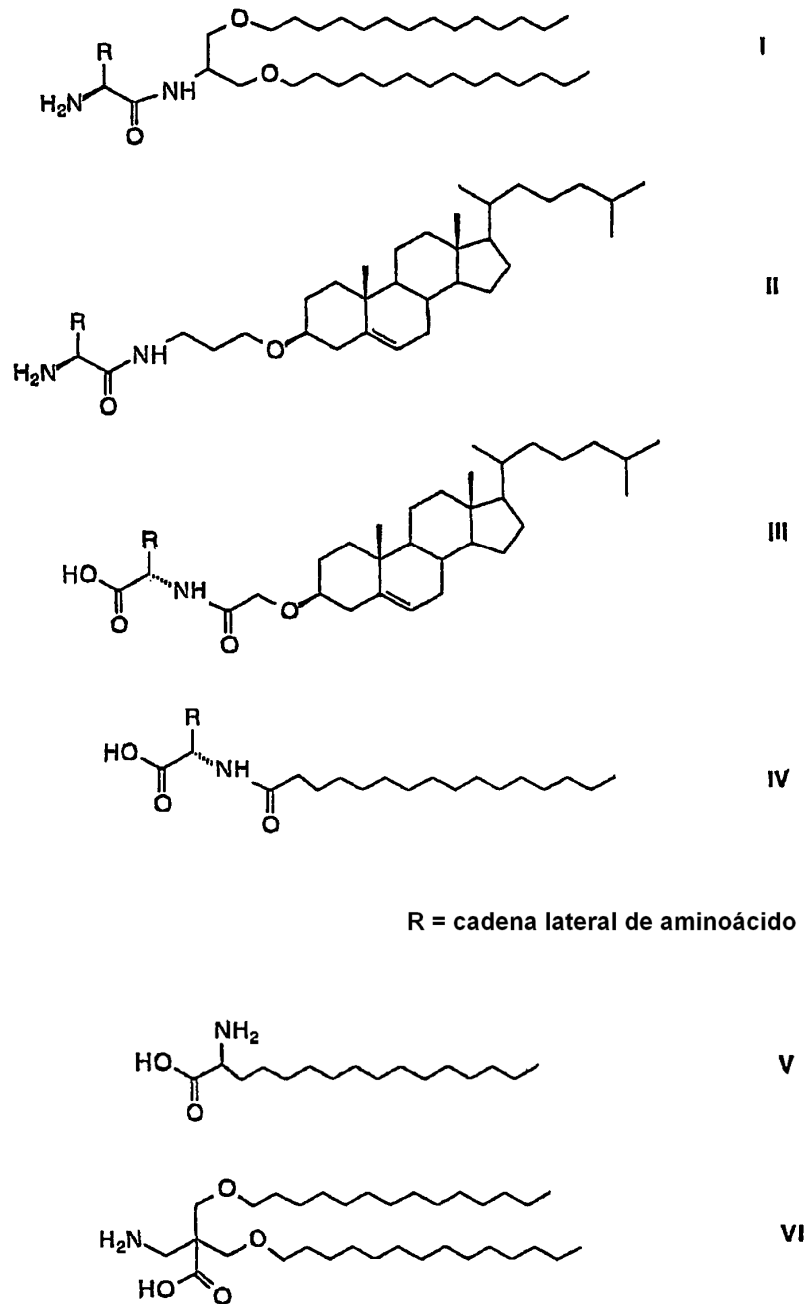


Figura 19: Ejemplos de aminoácidos lipidados en los que las cadenas lipídicas están unidas a las cadenas laterales de aminoácidos de procedencia natural



**Figura 20: Más ejemplos de aminoácidos lipidados. Las estructuras I y II representan aminoácidos lipidados con el grupo lipídico unido al ácido carboxílico y las estructuras III y IV con el grupo lipídico unido al grupo  $\alpha$ -amino de un aminoácido. Las estructuras V y VI son dos aminoácidos lipidados artificiales. Las estructuras I y II son adecuadas para colocarlas en el extremo carboxiterminal de una cadena peptídica, mientras que las estructuras III y IV son adecuadas para colocarlas en el extremo aminoterminal. Las estructuras V y VI se pueden disponer en cualquier posición del péptido.**

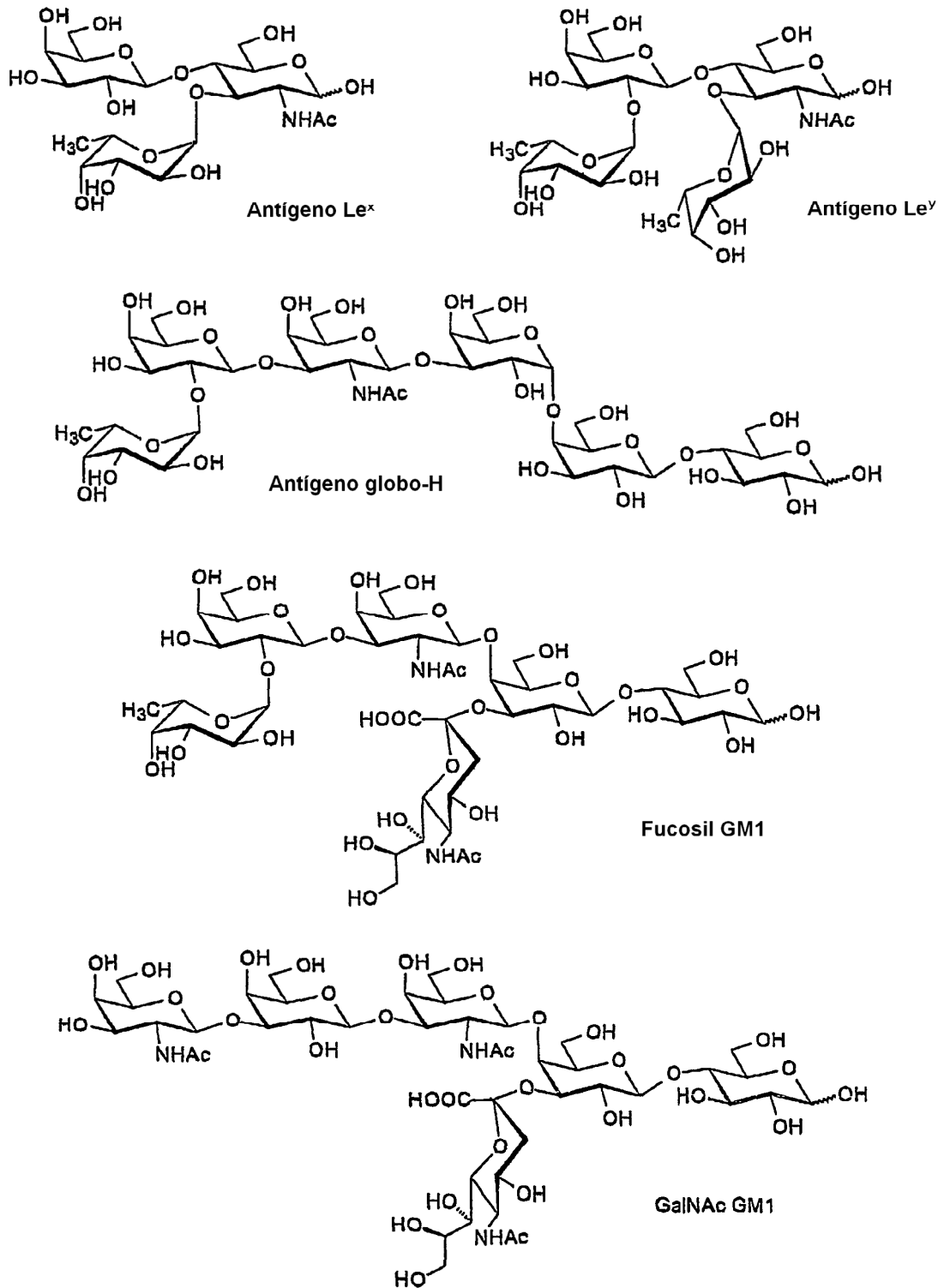


Figura 21: Ejemplos de antígenos de hidratos de carbono asociados a cáncer. Estas estructuras de hidratos de carbono o sus estructuras parciales se pueden preparar como glucolipopéptidos para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

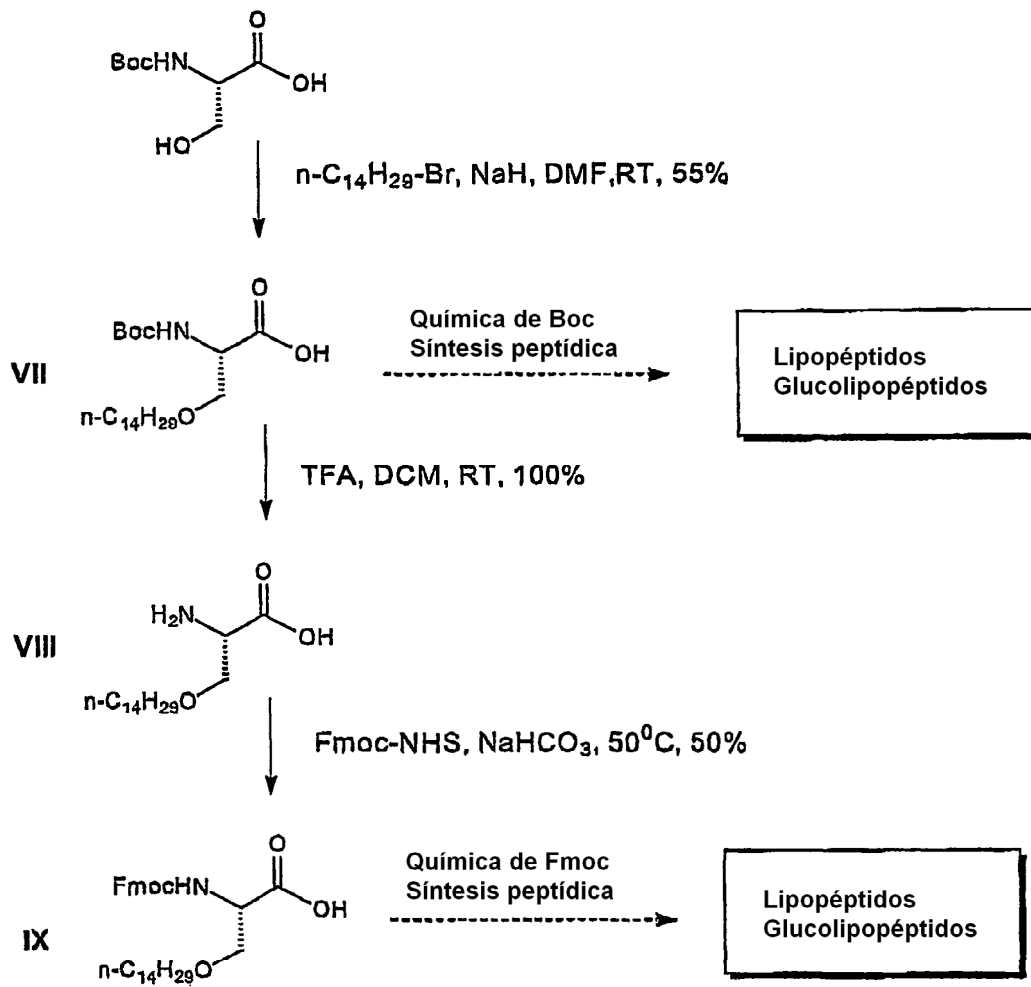


Figura 22: Síntesis de bloques constructivos de liposerina (VII, IX) y su aplicación para la preparación de péptidos y glucopéptidos lipidados mediante metodologías en solución o en fase sólida de síntesis peptídica.