

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 076**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/70** (2006.01)  
**A61K 31/7028** (2006.01)  
**A61K 31/164** (2006.01)  
**A61K 31/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05851383 .9**  
96 Fecha de presentación: **02.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1812015**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

54 Título: **Métodos para la inhibición de células NKT**

30 Prioridad:  
**02.11.2004 US 624562 P**  
**08.08.2005 US 706548 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.04.2012**

73 Titular/es:  
**THE BOARD OF TRUSTEES OF LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY  
1705 EL CAMINO REAL  
PALO ALTO, CALIFORNIA 94306-1106, US**

72 Inventor/es:  
**STROBER, Samuel;  
MEYER, Everett Hurteau y  
UMETSU, Dale T.**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 378 076 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

Métodos para la inhibición de células NKT

5 Esta invención se llevó a cabo con el respaldo del gobierno con la subvención NIH-AI-40093 adjudicada por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre esta invención.

10 Los linfocitos NKT constituyen una subpoblación única de linfocitos T, que están altamente conservados tanto en la especie humana como murina. Los linfocitos NKT expresan algunos marcadores de superficie específicos de los linfocitos NK (citolíticos naturales), como la lectina tipo C NKRP-1A, compartiendo de ese modo algunas propiedades con los linfocitos NK clásicos. Los linfocitos NKT también expresan un receptor de linfocitos T semi-invariante, que consta de un reordenamiento V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q invariante apareado preferentemente con una cadena V $\beta$ 11 variable. En el ratón, los linfocitos NKT expresan un reordenamiento V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281 invariante apareado con V $\beta$ 8, V $\beta$ 7 o V $\beta$ 2 variables. En términos de expresión del co-receptor, los linfocitos NKT invariantes pertenecen al subconjunto de linfocitos CD4+ simple positivo o CD4-CD8-TCR $\alpha$ / $\beta$ + doble negativo.

20 Aunque los ligandos naturales de los linfocitos NKT aún no han sido identificados, esas células se activan cuando su TCR reconoce glucosilceramidas derivadas de esponjas marinas, presentadas por CD1d. Aunque esta clase de ceramidas  $\alpha$ -glucosiladas no son detectables en mamíferos, pueden compartir características estructurales fundamentales con los ligandos naturales de CD1d, lo que sugiere que los linfocitos NKT reconocen antígenos que contienen una porción hidrófoba (lípidos) y una porción hidrófila.

25 El rol biológico de los linfocitos NKT no está bien definido. En respuesta a la activación a través de su receptor de los linfocitos T, los linfocitos NKT han demostrado segregar grandes cantidades tanto de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) como de interleucina-4 (IL-4) (véase, por ejemplo, Hong *et al.* (1999) *Immunol. Rev.* L 169:131; y Singh *et al.* (1999) *J Immunol* 163:2373). Después de la activación repetida, los linfocitos NKT se tornan células polarizadas que producen predominantemente IL-4.

30 También se ha sugerido que los linfocitos NKT tiene una función inmunoreguladora en el control de la propensión a ciertas enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, en algunos modelos de enfermedad, la transferencia de linfocitos NKT a receptores propensos a la enfermedad evita la aparición de una enfermedad autoinmunitaria, y se ha sugerido que la activación de los linfocitos NKT podría representar una intervención terapéutica para la inmunoregulación de la enfermedad autoinmunitaria (Sharif *et al.* (2002) *J Mol. Med.* 80:290-300) mediante la polarización de los linfocitos T convencionales hacia la producción de IL-4. También se ha informado que los linfocitos NKT y la IL-13 (producida posiblemente por linfocitos NKT) pueden disminuir reguladamente la vigilancia inmunológica de un tumor mediada por los linfocitos T citotóxicos (Terabe *et al.* (2000) *Nat Immunol.* 1(6):515-20).

40 Sin embargo, también se ha informado que la activación de los linfocitos NKT aumenta las respuestas inmunitarias tipo Th1 y la secreción de un autoanticuerpo que contribuye a la aparición de lupus en ratones NZB/W adultos (Zeng *et al.* (2003) *J Clin Invest* 112:1211).

45 El rol de los linfocitos NKT en las afecciones clínicas humanas es de gran interés. Existe un alto nivel de conservación entre especies para el sistema de linfocitos NKT. La  $\alpha$ -galactosilceramida puede estimular tanto los linfocitos NKT humanos como murinos, y tanto las moléculas CD1d humanas como de ratón pueden presentar  $\alpha$ -GalCer a los linfocitos NKT de cualquier especie, lo que indica la pertinencia de los estudios en animales para los ensayos clínicos humanos. La presente invención proporciona métodos de manipulación de las respuestas de los linfocitos NKT.

50 Resumen de la invención

Se proporcionan composiciones para inhibir ("anergizar") la función de los linfocitos NKT inhibiendo de ese modo la activación de los linfocitos NKT por los agonistas naturales o sintéticos. Las moléculas que interactúan con el receptor del antígeno de los linfocitos NKT y su molécula presentadora, p. ej. CD1, de modo de inhibir la función inmunitaria de los linfocitos NKT, se administran a un paciente y actúan inhibiendo la activación de los linfocitos NKT. La afección de particular interés es asma. En algunas realizaciones de la invención, el agente inhibidor es un glucolípido anergizante que regula por disminución los receptores del antígeno de los linfocitos NKT. Dichos glucolípidos pueden comprender una unión  $\beta$  entre las porciones azúcar y lípido, por ejemplo  $\beta$ -galactosilceramida. Se proporcionan formulaciones farmacéuticas de dichos glucolípidos y encuentran uso en el tratamiento de enfermedades que implican la activación indeseable de linfocitos NKT.

60 Breve descripción de las figuras

Figuras 1A -1 D. El tratamiento con  $\beta$ -Galcer reduce los efectos de activación de los linfocitos NKT *in vivo*, que incluyen la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 y la síntesis de IgE. La síntesis de IgG2c no es afectada.

Figura 2A-B. El tratamiento con C12- $\beta$ -GalCer bloquea la AHR inducida  $\alpha$ -GalCer.

Figura 3A-C. El tratamiento con C12- $\beta$ -GalCer reduce la AHR inducida por OVA/alum.

Figura 4A-B. El tratamiento con el anticuerpo anti-CD1d (HB323) bloquea la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) inducida por OVA/alum.

Figura 5. Administración oral de  $\beta$ -galactosilceramida.

Descripción detallada de la invención

Se proporcionan composiciones para inhibir la función inmunitaria de los linfocitos NKT. Las moléculas que interactúan específicamente con el receptor del antígeno de los linfocitos NKT y su molécula presentadora, p. ej. CD1, y que inhiben la función inmunitaria de los linfocitos NKT se administran a un paciente y actúan inhibiendo la respuesta de activación de los linfocitos NKT a los agonistas. En algunas realizaciones de la invención, el agente bloqueante es un glucolípido anergizante que regula por disminución los receptores del antígeno de los linfocitos NKT. Dichos glucolípidos pueden comprender una unión  $\beta$  entre las porciones azúcar y lípido, por ejemplo  $\beta$ -galactosilceramida.

El término "tratamiento" o "tratar" significa cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, incluida el asma, en modelos humanos y animales. El tratamiento incluye prevenir la enfermedad, es decir, evitar que los síntomas clínicos de la enfermedad se presenten mediante la administración de una composición protectora antes de la inducción de la enfermedad; suprimir la enfermedad, es decir, evitar que los síntomas clínicos de la enfermedad se presenten mediante administración de una composición protectora después de un suceso inductor pero antes de la aparición o reaparición clínica de la enfermedad; inhibir la enfermedad, es decir, detener la evolución de los síntomas clínicos mediante administración de una composición protectora después de su aparición inicial; y/o aliviar la enfermedad, es decir, lograr la regresión de los síntomas clínicos mediante administración de una composición protectora después de su aparición inicial.

Se comprenderá que en medicina humana, no siempre es posible distinguir entre "prevenir" y "suprimir" puesto que el último o los últimos sucesos inductores pueden ser desconocidos, estar latentes, o el paciente no ser verificado hasta bastante después de la aparición del suceso o los sucesos. Por consiguiente, es común utilizar el término "profilaxis" a diferencia de "tratamiento" para abarcar tanto "prevenir" como "suprimir" según se definieron en este documento. El término "tratamiento", según se usa en este documento, pretende incluir "profilaxis".

La expresión "cantidad eficaz" significa una dosis suficiente para proporcionar tratamiento para la enfermedad que se está tratando. Ésta variará dependiendo del paciente, la enfermedad y el tratamiento que se está efectuando. Los agentes inhibidores de los linfocitos NKT se usan para el tratamiento de una enfermedad; y se pueden usar en co-formulaciones, p. ej., con un agente que permita disminuir la dosis de corticoesteroides para facilitar el uso de una dosis menor de prednisona o hidrocortisona.

La actividad *in vivo* para el tratamiento de la enfermedad se puede demostrar probando un inhibidor en un modelo animal, por ejemplo un modelo de asma inducida en animales; o una de varias cepas de ratones endogámicos con una enfermedad tipo lupus heredada, observando la aparición de producción de ANA, anticuerpos anti-ADNbc patógenos, complejo inmune de la glomerulonefritis, linfadenopatía, y funcionamiento anormal de los linfocitos B y T que imita la situación humana, en los grupos de control y tratados. La eficacia clínica en humanos se demuestra en ensayos clínicos, empleando metodología conocida por los expertos en el área.

Definiciones

Según se usa en este documento las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un constructo" incluye varios de dichos constructos y la referencia a "la célula" incluye la referencia a una o más células y sus equivalentes conocidos por los expertos, y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado comprendido comúnmente por un experto en el área a la cual pertenece esta invención a menos que se indique claramente lo contrario.

La alergia es una tendencia aumentada a la sensibilidad a la IgE que causa la producción de anticuerpos IgE específicos para un antígeno incluidos, por ejemplo, veneno de insecto, ácaros del polvo, polen, mohos, caspa de animales, antígenos alimentarios o látex. Las respuestas alérgicas son específicas para el antígeno y se caracterizan por la producción de citocinas tipo Th2 como, por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, etc. La sensibilización a un alérgeno particular se produce en personas genéticamente predispuestas luego de la exposición al antígeno; el humo de cigarrillo y las infecciones virales pueden colaborar con el proceso de sensibilización.

5 Se incluyen en este grupo las alergias asociadas al asma, que provocan una enfermedad clínica que puede variar desde una rinitis trivial hasta asma potencialmente mortal. Después de la sensibilización, la exposición continua a los alérgenos conduce a un aumento significativo en la prevalencia del asma. Una vez que se ha producido la sensibilización, una nueva exposición al alérgeno es un factor de riesgo de exacerbación del asma. El manejo eficaz del asma alérgica ha requerido habitualmente tratamiento farmacológico y evitar los alérgenos. Los efectos fisiológicos específicos del asma asociada a alergias incluyen inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia y producción de mucus, y producción de IL-4 e IgE específica para el antígeno.

10 Los mastocitos, derivados de las células hematopoyéticas precursoras que pasan sus etapas terminales de diferenciación/maduración en los tejidos periféricos en los que residen, expresan receptores de superficie celular (FcRI) que les permiten unirse a la porción Fc de IgE con gran afinidad. Dichos mastocitos sensibilizados a IgE, después de encontrarse con el antígeno específico que es reconocido por su IgE unida a FcRI, segregan un amplio grupo de mediadores inactivos, que incluyen: mediadores preformados que se almacenan en los gránulos  
15 citoplasmáticos de las células, p. ej., histamina, heparina y proteasa neutras, productos lipídicos recién sintetizados, p. ej., prostaglandina D2 y leucotrieno C4 y diversas citocinas. Muchos de esos posibles mediadores derivados de mastocitos pueden promover obstrucción reversible de las vías respiratorias, hiperreactividad bronquial y/o inflamación de las vías respiratorias.

20 Sin embargo, otros tipos de células, incluidos eosinófilos y linfocitos Th2, ambos bien representados en los infiltrados inflamatorios crónicos en las vías respiratorias de los pacientes con asma, también pueden producir citocinas u otros mediadores que pueden contribuir a muchas de las características de la enfermedad. El FcRI, que en algún momento se pensó que estaba restringido a los mastocitos y basófilos tisulares, también se expresa en la superficie de los monocitos, las células dendríticas circulantes, las células de Langerhans y los eosinófilos, implicando así a  
25 esas células como otras posibles fuentes de mediadores en diversas respuestas inflamatorias dependientes de IgE. (Por una reseña, véase Galli (1997) J. E. M. 186:343-347).

Los alérgenos son compuestos inmunógenos que causan las respuestas de los linfocitos T tipo Th2 y las respuestas de los linfocitos B productores de IgE en individuos predispuestos. El alérgeno específico puede ser cualquier tipo de  
30 compuesto químico como, por ejemplo, un polisacárido, una porción ácido graso, una proteína, etc. Los alérgenos incluyen antígenos que se encuentran en alimentos como frutas ( p. ej., melones, fresas, piña y otras frutas tropicales), cacahuates, aceite de cacahuate, otras frutas secas, proteínas lácteas, clara de huevo, mariscos, tomates, etc.; antígenos transportados por el aire como polen de hierba, caspa de animales, excrementos de ácaros domiciliarios, etc.; antígenos farmacológicos como penicilinas y antibióticos relacionados, sulfas, barbitúricos, anticonvulsivantes, preparaciones de insulina (particularmente de fuentes de insulina de origen animal), anestésicos locales ( p. ej., Novocaína) y yodo (que se encuentra en muchos medios de contraste de rayos X), venenos de insectos y agentes responsables de la dermatitis alérgica causada por artrópodos hematófagos como dípteros, incluidos mosquitos (*Anopheles* sp., *Aedes* sp., *Culiseta* sp., *Culex* sp.), moscas (*Phlebotomus* sp., *Culicoides* sp.) particularmente moscas negras, moscas del venado y mosquitos picadores, garrapatas (*Dermmacenter* sp., *Ornithodoros* sp., *Otobius* sp.), pulgas (p. ej., el orden Siphonaptera, que incluye los géneros *Xenopsylla*, *Pulex* y *Ctenocephalides felis felis*); y látex.

Los alérgenos anafilácticos son los antígenos que presentan el peligro de reacción anafiláctica en individuos  
45 hipersensibles. La anafilaxia es una reacción alérgica sistémica, aguda, que se produce después que un individuo se ha sensibilizado a un antígeno. La anafilaxia se asocia a la producción de altos niveles de anticuerpos IgE y a la liberación de histaminas, que causan contracciones musculares, constricción de las vías respiratorias y dilatación de los vasos sanguíneos. Los síntomas de reacciones anafilácticas incluyen urticaria, prurito generalizado, congestión nasal, silbido, dificultad para respirar, tos, cianosis, aturdimiento, mareo, confusión, trastornos del habla, pulso rápido, palpitaciones, náuseas y vómitos, dolor abdominal o calambres, enrojecimiento o inflamación de la piel, aleteo de las fosas nasales, retracciones intercostales, etcétera.

El asma, según se define en este documento, es un síndrome, típicamente caracterizado por las tres características  
55 cardinales de obstrucción de las vías respiratorias intermitente y reversible, hiperreactividad de las vías respiratorias e inflamación de las vías respiratorias, que puede generarse como resultado de interacciones entre múltiples factores genéticos y ambientales. El asma se caracteriza por la presencia de células como eosinófilos, mastocitos, basófilos y linfocitos T CD25+ en las paredes de las vías respiratorias. Existe una estrecha interacción entre esas células, debido a la actividad de las citocinas, las cuales tienen una diversidad de propiedades de comunicación y efectoras biológicas. Las quimiocinas atraen células al lugar de la inflamación y las citocinas las activan, produciendo inflamación y daño a la mucosa. Cuando el proceso se vuelve crónico, ocurren cambios secundarios,  
60 como engrosamiento de las membranas basales y fibrosis. La enfermedad se caracteriza por una mayor hiperreactividad de las vías respiratorias a diversos estímulos e inflamación de las vías respiratorias. Un paciente con diagnóstico de asmático presentará muchas indicaciones a lo largo del tiempo, que incluyen silbido, ataques de asma y una respuesta positiva a la provocación con metacolina es decir, una PC20 al ser provocado con metacolina de menos de aproximadamente 4 mg/mL. Las pautas para el diagnóstico se pueden encontrar, por ejemplo, en

National Asthma Education Program Expert Panel Guidelines for Diagnosis and Management of Asthma, National Institutes of Health, 1991, Pub. No. 91-3042.

5 Los linfocitos NKT constituyen una subpoblación de linfocitos que son abundantes en el timo, el bazo, el hígado y la médula ósea y también están presentes en el pulmón. Se desarrollan en el timo a partir de células progenitoras CD4+CD8+ y circulan en la sangre, tienen gránulos citoplasmáticos distintivos y se pueden identificar funcionalmente por su capacidad para lisar ciertas líneas celulares de tumores linfoides *in vitro* sin necesidad de inmunización o activación previas. El mecanismo citolítico de los linfocitos NKT es el mismo que utilizan los linfocitos T citotóxicos generados en una respuesta inmunitaria de adaptación; los gránulos citotóxicos se liberan sobre la superficie de la célula diana unida, y las proteínas efectoras que ellos contienen penetran en la membrana celular e inducen la muerte celular programada.

15 Los linfocitos NKT expresan marcadores de superficie que son característicos tanto de los linfocitos citolíticos naturales (como NK1.1 y CD161) como de los linfocitos T convencionales (como los TCR). Varios linfocitos NKT reconocen antígenos glucolípidos presentados por la proteína CD1d semejante al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y expresan una TCR invariante en ratones.

20 Receptor del antígeno de los linfocitos NKT. El receptor del antígeno de los linfocitos NKT es un receptor de linfocitos T  $\alpha:\beta$  compuesto de dos cadenas de proteína, el receptor de linfocitos T  $\alpha$  y el receptor de linfocitos T  $\beta$ . Al igual que con el receptor de los linfocitos T convencionales, se cree que el receptor de los linfocitos NKT no reconoce al antígeno en su estado natural. Los linfocitos T convencionales reconocen un ligando compuesto de un antígeno peptídico unido a una molécula MHC. Se cree que la molécula presentadora para el receptor del antígeno de los linfocitos NKT es CD1d, que a menudo está asociada a glucolípidos en vez de a fragmentos de péptidos. Se cree que, análogo a otras moléculas MHC clase I, el antígeno unido queda formando un sándwich entre los dos segmentos  $\alpha$ -helicoidales de CD1d. El receptor de los linfocitos T interactúa con este ligando compuesto, haciendo contacto tanto con CD1d como con el antígeno.

30 Las secuencias de aminoácidos del receptor de los linfocitos T muestra que ambas cadenas tienen una región variable (V) amino-terminal con homología a un dominio V de una inmunoglobulina, una región constante (C) con homología a un dominio C de una inmunoglobulina, y una región bisagra corta que contiene un residuo de cisteína que forma el enlace disulfuro entre las cadenas. Cada cadena se extiende a lo largo de la bicapa lipídica mediante un dominio hidrófobo transmembrana, y termina en una cola citoplasmática corta.

35 El locus TCR $\alpha$  contiene segmentos de los genes V y J ( $V\alpha$  y  $J\alpha$ ). El locus TCR $\beta$  contiene segmentos del gen D además de los elementos de los genes  $V\beta$  y  $J\beta$ . El tercer bucle hipervariable (CDR3) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de los linfocitos T, al cual contribuyen segmentos de los genes D y J, forma el centro del sitio de unión del antígeno de un receptor de linfocitos T, la periferia del sitio consta del equivalente de los bucles CDR1 y CDR2, que están codificados en los segmentos de los genes  $V\alpha$  y  $V\beta$  de la línea germinal.

40 El receptor de los linfocitos T de los linfocitos NKT consta en los humanos, de un reordenamiento  $V\alpha 24J\alpha Q$  invariante apareado preferentemente con una cadena  $V\beta 11$  variables. En el ratón, los linfocitos NKT expresan un reordenamiento  $V\alpha 14J\alpha 281$  invariante apareado con  $V\beta 8$ ,  $V\beta 7$  o  $V\beta 2$  variable.

45 CD1: CD1 es una molécula no polimórfica, que no es codificada por MHC, semejante a MHC clase I, que se puede encontrar asociada no covalentemente a microglobulina  $\beta 2$  ( $\beta 2m$ ). En los humanos, se han identificado cinco isoformas de CD1 (CD1a, b, c, d y e) y se sabe que los linfocitos B humanos expresan CD1c y CD1d. En los ratones, sólo se ha identificado la isoforma CD1d. Las moléculas CD1 han demostrado ser moléculas presentadoras de antígeno para glucolípidos y péptidos hidrófobos. En algunas realizaciones de la invención, la isoforma CD1 es CD1d, que interactúa con el receptor del antígeno de los linfocitos NKT.

50 Se clonaron las isoformas humana y de ratón de CD1 y se caracterizaron sus secuencias. La secuencia de CD1a humana se puede encontrar en Genbank, N° de registro M28825. La secuencia de CD1b se puede encontrar en la sección PIR1 de la base de datos de secuencias de proteínas, edición 64.00, 31 marzo de 2000, números de registro B39957; B45801 e I79470 (Martin *et al.* (1987) Proc Natl Acad Sci U.S.A 84(24):9189-93). La secuencia de CD1c se puede encontrar en PIR1, números de registro C45801; C 39957 e I79472 (Aruffo y Seed (1989) J. Immunol. 143:1723-1730). La CD1d humana se puede encontrar en Genbank, número de registro J04142 (Balk *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1), 252-256). La secuencia CD1e humana se puede encontrar en Genbank, número de registro X14975, X15110 (Calabi *et al.* (1989) Eur. J. Immunol. 19 (2), 285-292).

60 Para los fines de la presente invención, el agente anergizante se unirá a la proteína CD1 presente en las células presentadoras de antígeno del paciente que se está tratando. Es decir, para la terapia humana el agente anergizante se unirá a la CD1 humana; y análogas. Debido a que CD1 no es muy polimórfica un paciente expresará generalmente la proteína de tipo natural según se describió antes, aunque puede haber excepciones en que un paciente exprese una forma variante de la proteína.

Los agentes se pueden unir específicamente a una o más de las isoformas CD1 humanas, particularmente las isoformas expresadas en células presentadoras de antígeno, p. ej. CD1d. En una realización alternativa, un agente anergizante interreactivo que reconoce epítomos comunes en todas las isoformas CD1; o un cóctel de agentes específicos de la isoforma; se usa para unir en general todas las isoformas presentes en el paciente. Inhibidores de los linfocitos NKT: son moléculas que interfieren con la activación de los linfocitos NKT a través de su receptor del antígeno, por ejemplo mediante unión competitiva o no competitiva al dominio extracelular de CD1, o a los receptores del antígeno de los linfocitos T, o que bloquean la presentación de un antígeno activador. Usualmente la afinidad de unión del inhibidor será de al menos 100  $\mu\text{M}$ . Los inhibidores pueden ser péptidos, lípidos, p. ej. glucolípidos, fosfolípidos, etc., solos o en combinación con un péptido; moléculas orgánicas pequeñas, peptidomiméticos, receptores solubles de linfocitos T; o análogos. Los glucolípidos son un bloqueante preferido.

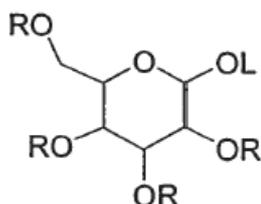
En una realización de la invención, el inhibidor de los linfocitos NKT es un glucolípido anergizante. Los glucolípidos de interés tienen la estructura general:



donde L es un lípido y G es un sacárido, que puede ser una hexosa o una pentosa, y puede ser un mono, di, tri, oligo o polisacárido, o uno de sus derivados. Los azúcares de interés incluyen alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, fructosa, maltosa, lactosa y sacarosa. La unión entre el azúcar y el lípido puede estar en cualquiera de los átomos de O, usualmente en la posición 1, 2, 3 o 4, más usualmente en la posición 1. La unión puede estar en configuración alfa o beta, en algunas realizaciones específicas la unión está en configuración beta.

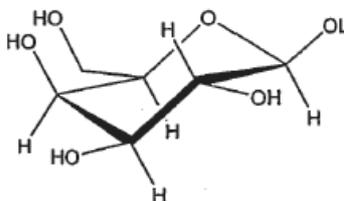
Los lípidos de interés incluyen ceramidas con una cadena acilo y una cadena esfingosina.

Por ejemplo, el inhibidor de los linfocitos NKT puede tener la estructura:



donde L es un lípido y R se selecciona del grupo que consiste en H, un azúcar pentosa, un azúcar hexosa, un oligo o polisacárido; o un grupo alquilo, arilo o alqueno, como un alquilo inferior C1 a C6, el cual está opcionalmente sustituido, cuyos sustituyentes pueden incluir, pero no exclusivamente, un grupo alquilo, arilo, alqueno, aralquilo, aralqueno, cicloalquilo, cicloalquilalquilo o cicloalquilalqueno; y pueden contener uno o más heteroátomos de N, S u O. Cada uno de los átomos de O puede estar en orientación  $\alpha$  o  $\beta$ , p. ej. glucosa, galactosa, manosa, etc.

En una realización de la invención, G tiene la estructura:



donde G es una galactosa, y donde la unión a L (como se muestra) está en la posición 1, en la configuración  $\alpha$  o  $\beta$ .

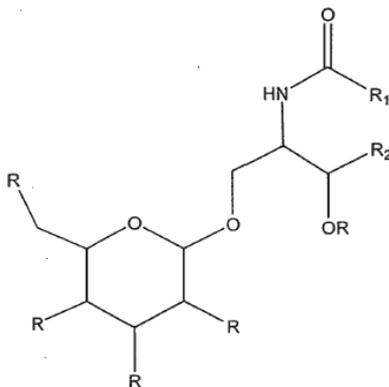
Una serie de lípidos se pueden usar como L, incluidos ácidos grasos C8 a C30, alcoholes secundarios de cadena larga, amino alcoholes de cadena larga, amidas de ácidos grasos con di o trihidroxil bases de cadena larga; y análogos. Por ejemplo, una porción glucosilo (una o varias unidades) se puede unir a un grupo hidroxilo de un alcohol graso o hidroxil alcohol graso, o a un grupo carbonilo de un ácido graso. Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen ceramidas, esfingomielina, cerebrósidos, y análogos, incluidos esfingosina, dihidroesfingosina, C20-dihidroesfingosina, fitoesfingosina, C20-fitoesfingosina, dehidrofitoesfingosina, esfingadienina, etc.

Las bases esfingoides de cadena ramificada han sido descritas en algunos invertebrados marinos. Por consiguiente, una base con una cadena C19 alquilo ramificada y tres dobles enlaces, 2-amino-9-metil-4,8,10-octadecatrieno-1,2-diol, ha demostrado estar presente en la glucosilceramida de la estrella de mar (Irie A *et al.*, J Biochem 1990, 107, 578) y en la esfingomielina del nervio de calamar (Ohashi *et al.*, J Lipid Res 2000, 41, 1118). Se encontró una base ramificada con dos dobles enlaces en cerebrósidos de una anémoma marina (Karlsson *et al.*, Biochim Biophys Acta

1979, 574, 79) y del micelio de un hongo (Kawai *et al.*, J Lipid Res 1985, 26, 338).

Las ceramidas son amidas de ácidos grasos con bases di o trihidroxi de cadena larga, siendo la más común en animales la esfingosina y en las plantas la fitoesfingosina. El grupo acilo de las ceramidas es generalmente un ácido graso saturado o monosaturado de cadena larga. Los ácidos grasos que se encuentran con mayor frecuencia en las ceramidas animales son 18:0, 24:0 y 24:1 (n-9), también se encuentran hidroxi ácidos grasos de cadena larga

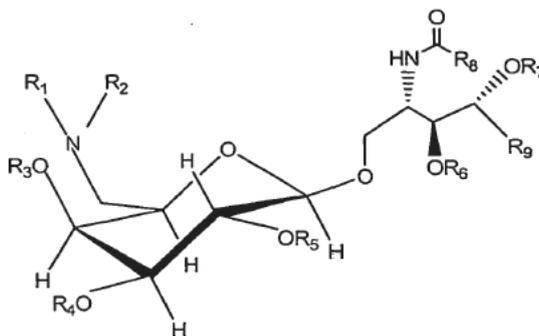
En una realización, el inhibidor de los linfocitos NKT tiene la estructura:



donde  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente entre un alquilo o alqueno de aproximadamente 8 a 30 átomos de carbono, que puede ser lineal o ramificado, generalmente lineal y usualmente no más de 0, 1, 2 o 3 enlaces insaturados, cuya cadena puede estar opcionalmente sustituida o fosforilada o sulfatada, o uno de sus derivados, incluidos ésteres y análogos; y

Cada R puede ser el mismo o diferente, y se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, OH, un éter de un grupo alquilo, arilo o alqueno inferior, donde el alquilo está opcionalmente sustituido, cuyos sustituyentes pueden incluir, pero no exclusivamente, un grupo alquilo, arilo, alqueno, aralquilo, aralqueno, cicloalquilo, cicloalquilalquilo o cicloalquilalqueno; y puede contener uno o más heteroátomos de N, S u O, un azúcar pentosa unida por O, un azúcar hexosa unida por O, un oligo o polisacárido unido por O, o un grupo alquilo, arilo o alqueno, como un alquilo inferior C1 a C6, donde el alquilo está opcionalmente sustituido, cuyos sustituyentes pueden incluir, pero no exclusivamente, un grupo alquilo, arilo, alqueno, aralquilo, aralqueno, cicloalquilo, cicloalquilalquilo o cicloalquilalqueno; y pueden contener uno o más heteroátomos de N, S u O. Cada uno de los átomos de R puede estar en orientación  $\alpha$  o  $\beta$ , p. ej. glucosa, galactosa, manosa, etc.

En una realización, el inhibidor de los linfocitos NKT tiene la estructura:



donde,  $R_1$  es: (i) hidrógeno; o (ii)  $-SO_2R_{10}$ , donde  $R_{10}$  es: halo; hidroxilo;  $OR_{11}$ ;  $OR_{12}$ ; amino;  $NHR_{11}$ ;  $N(R_{11})_2$ ;  $NHR_{12}$ ;  $N(R_{12})_2$ ; aralquilamino; o  $C_1-C_{12}$  alquilo opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, oxo, nitro,  $OR_{11}$ ,  $OR_{12}$ , aciloxi, amino,  $NHR_{11}$ ,  $N(R_{11})_2$ ,  $NHR_{12}$ ,  $N(R_{12})_2$ , aralquilamino, mercapto, tioalcoxi,  $S(O)R_{11}$ ,  $S(O)R_{12}$ ,  $SO_2R_{11}$ ,  $SO_2R_{12}$ ,  $NHSO_2R_{11}$ ,  $NHSO_2R_{12}$ , sulfato, fosfato, ciano, carboxilo,  $C(O)R_{11}$ ,  $C(O)R_{12}$ ,  $C(O)OR_{11}$ ,  $C(O)OR_{12}$ ,  $C(O)NH_2$ ,  $C(O)NHR_{11}$ ,  $C(O)N(R_{11})_2$ ,  $C_3-C_{10}$  cicloalquilo que contiene 0-3  $R_{13}$ ,  $C_3-C_{10}$  heterociclilo que contiene 0-3  $R_{13}$ ,  $C_2-C_6$  alqueno,  $C_2-C_6$  alquino,  $C_5-C_{10}$  cicloalqueno,  $C_5-C_{10}$  heterocicloalqueno,  $C_6-C_{20}$  arilo que contiene 0-3  $R_{14}$ , o heteroarilo que contiene 0-3  $R_{14}$ ; o

$C_3-C_{10}$  cicloalquilo,  $C_3-C_{10}$  heterociclilo,  $C_5-C_{10}$  cicloalqueno, o  $C_5-C_{10}$  heterocicloalqueno opcionalmente sustituido con uno o más halo, hidroxilo, oxo,  $OR_{11}$ ,  $OR_{12}$ , aciloxi, nitro, amino,  $NHR_{11}$ ,  $N(R_{11})_2$ ,  $NHR_{12}$ ,  $N(R_{12})_2$ , aralquilamino, mercapto, tioalcoxi,  $S(O)R_{11}$ ,  $S(O)R_{12}$ ,  $SO_2R_{11}$ ,  $SO_2R_{12}$ ,  $NHSO_2R_{11}$ ,  $NHSO_2R_{12}$ , sulfato, fosfato, ciano, carboxilo,  $C(O)R_{11}$ ,  $C(O)R_{12}$ ,  $C(O)OR_{11}$ ,  $C(O)OR_{12}$ ,  $C(O)NHR_{11}$ ,  $C(O)N(R_{11})_2$ , alquilo, haloalquilo,  $C_3-C_{10}$  cicloalquilo que contiene 0-3  $R_{13}$ ,  $C_3-C_{10}$  heterociclilo que contiene 0-3  $R_{13}$ ,  $C_2-C_6$  alqueno,  $C_2-C_6$  alquino,  $C_5-C_{10}$  cicloalqueno,  $C_5-$

C<sub>10</sub> heterocicloalqueno, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> arilheteroarilo que contiene 0-3 R<sub>14</sub>, o C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> heteroarilo que contiene 0-3 R<sub>14</sub>; o C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alqueno, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquino, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más halo, hidroxilo, OR<sub>11</sub>, OR<sub>12</sub>, aciloxi, nitro, amino, NHR<sub>11</sub>, N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, NHR<sub>12</sub>, N(R<sub>12</sub>)<sub>2</sub>, aralquilamino, mercapto, tioalcoxi, S(O)R<sub>11</sub>, S(O)R<sub>12</sub>, SO<sub>2</sub>R<sub>11</sub>, SO<sub>2</sub>R<sub>12</sub>, NHSO<sub>2</sub>R<sub>11</sub>, NHSO<sub>2</sub>R<sub>12</sub>, sulfato, fosfato, ciano, carboxilo, C(O)R<sub>11</sub>, C(O)R<sub>12</sub>, C(O)OR<sub>11</sub>, C(O)NH<sub>2</sub>, C(O)NHR<sub>11</sub>, C(O)N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, alquilo, haloalquilo, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalquilo que contiene 0-3 R<sub>13</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> heterociclilo que contiene 0-3 R<sub>13</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alqueno, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquino, C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> cicloalqueno, C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> heterocicloalqueno, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> arilo que contiene 0-3 R<sub>14</sub>, o C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> heteroarilo que contiene 0-3 R<sub>14</sub>; o (iii)-C(O)R<sub>10</sub>, donde R<sub>10</sub> es el definido antes; o (iv)-C(R<sub>10</sub>)<sub>2</sub>(R<sub>15</sub>), donde R<sub>10</sub> es el definido antes; R<sub>15</sub> es hidrógeno, R<sub>10</sub>, o R<sub>15</sub> y R<sub>2</sub> tomados juntos forman un doble enlace entre los átomos de carbono y nitrógeno a los cuales están unidos; o (v) R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> tomados juntos forman un heterociclilo de 3-10 átomos en el anillo, opcionalmente sustituido con R<sub>10</sub>; R<sub>2</sub> es hidrógeno, o R<sub>2</sub> y R<sub>15</sub> tomados juntos forman un doble enlace entre los átomos de carbono y nitrógeno a los cuales están unidos, o R<sub>2</sub> y R<sub>1</sub> tomados juntos forman un heterociclilo de 3-10 átomos en el anillo opcionalmente sustituido con R<sub>10</sub>;

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> aralquilo o C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> acilo; R<sub>8</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>9</sub> es un C<sub>3</sub>-C<sub>100</sub> alquilo lineal o ramificado; R<sub>11</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alquilo opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato o fosfato; R<sub>12</sub> es arilo opcionalmente sustituido con halo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato o fosfato; cada R<sub>13</sub> es independientemente halo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi, oxo, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato o fosfato; cada R<sub>14</sub> es independientemente halo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxi, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato o fosfato; y X es 1-100.

Con referencia la fórmula anterior, un subconjunto de compuestos descritos antes son aquellos en los cuales X es 24 y R<sub>9</sub> es n-tetradecilo.

Otros sustituyentes adecuados se describen en PCT/US2003/008530. PCT/US2003/008530 apunta a la forma  $\alpha$  de los compuestos, sin embargo, en este documento se pretende que el mismo tipo de sustituciones se pueda hacer en la forma  $\beta$ .

Ensayos de detección sistemática: Los agentes con potencial terapéutico pueden ser sometidos a detección sistemática para determinar su capacidad para inhibir la activación de los linfocitos NKT. Los ensayos para determinar la afinidad y especificidad de la unión son conocidos en el área, e incluyen ensayos competitivos y no competitivos. Los ensayos de interés incluyen ELISA, RIA, citometría de flujo etc. Los ensayos de unión pueden unir CD1 a una matriz sólida y después agregar el ligando con potencial terapéutico (agente) al CD1 unido. La afinidad de unión se puede medir por espectroscopia de resonancia de plasmones (ensayo Biacore). Alternativamente, el bloqueante con potencial terapéutico se puede combinar con el CD1 unido en presencia de un competidor, p. ej. un glucolípido, etc.

También se pueden realizar ensayos de unión para evaluar si un agente con potencial terapéutico interfiere con la unión de las moléculas a CD1; o interfiere con la interacción entre el receptor de los linfocitos NKT y un complejo CD1/glucolípido. Un ensayo para determinar si un agente con potencial terapéutico se puede unir al receptor de los linfocitos NKT (NKTCR) puede utilizar un dímero o tetrámero de CD1 (véase Kronenberg *et al.* (2001) P.N.A.S. 98:2950-2952). Por ejemplo, se puede cargar un tetrámero de CD1 con un agente con potencial terapéutico; y el complejo resultante ponerse en contacto con NKTCR, usualmente linfocitos NKT, y cuantificarse el nivel de unión, por ejemplo mediante citometría de flujo. Como control positivo, se puede cuantificar la unión de un tetrámero de CD1/ $\alpha$ -galactosilceramida; o usar en un ensayo de unión competitiva. En algunas realizaciones, el agente de interés se unirá a NKTCR en esas condiciones.

En otras realizaciones, un agente de interés interferirá con un agonista que se une a CD1 y TCR. Dicho bloqueante se puede ensayar cargando primero el control positivo (agonista como  $\alpha$ -galcer) en dímeros o tetrámeros de CD1, donde dichos tetrámeros pueden estar marcados detectablemente. El reactivo resultante se usa para unir una población de linfocitos NKT, cuya unión se cuantifica, p. ej. mediante citometría de flujo. Para mostrar que un agente con potencial terapéutico interrumpe la unión, el tetrámero se preincuba con el antagonista del agente con potencial terapéutico, después se carga con el agonista; y el complejo resultante se compara con el complejo del agonista con respecto a su capacidad para unirse a los linfocitos NKT. En algunas realizaciones, el agente de interés interferirá con la interacción entre la unión de un agonista y CD1.

Generalmente se analizan en paralelo varias mezclas de ensayo con diferentes concentraciones del agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Típicamente, una de esas concentraciones sirve como control negativo, es decir la concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Los ensayos de interés se dirigen a agentes que inhiben la función inmunitaria de los linfocitos NKT. Los ensayos de interés se pueden dirigir a ensayos de unión para el receptor de los linfocitos NKT, y/o CD1; o se pueden utilizar ensayos funcionales dirigidos a una evaluación de la activación de los linfocitos NKT, y/o modelos animales para la activación de linfocitos NKT.

Un ensayo funcional *in vitro* que se puede usar para la detección sistemática de compuestos inhibidores se basa la capacidad de la  $\alpha$ -galactosilceramida para activar los linfocitos NKT en mezclas de células inmunitarias, o células esplénicas de ratón, que incluyen linfocitos NKT y células presentadoras de antígeno. Típicamente la  $\alpha$ -galactosilceramida se agrega al cultivo celular durante 24 horas, y se analizan la activación mediante proliferación celular y la secreción de IL-4 e IFN- $\gamma$  en el sobrenadante del cultivo.

La detección sistemática de compuestos inhibidores se puede realizar preincubando la mezcla de células con la molécula inhibidora con potencial terapéutico (antagonista), y después agregando la molécula activadora  $\alpha$ -galactosilceramida (agonista), y analizando la proliferación celular. Los sobrenadantes se analizan 24 horas más tarde para determinar la secreción de citocinas. La potencia inhibidora se determina mediante la reducción en la proliferación y la secreción de citocinas. Alternativamente los cultivos celulares podrían incluir linfocitos NKT purificados y células presentadoras de antígeno purificadas, en particular, células dendríticas.

Los agentes con potencial terapéutico se obtienen de una amplia gama de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos. Por ejemplo, se dispone de varios medios para la síntesis al azar o dirigida de una amplia gama de compuestos orgánicos y biomoléculas. Alternativamente, se dispone de bibliotecas de compuestos naturales o que se pueden producir fácilmente en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Además, las bibliotecas y compuestos producidos natural o sintéticamente se pueden modificar fácilmente a través de métodos físicos, químicos y bioquímicos convencionales. Los agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o al azar, como acilación, alquilación, esterificación o amidación para producir análogos estructurales.

Para el tratamiento del asma, son de interés anticuerpos específicos para CD1 para inhibir o bloquear la activación de los linfocitos NKT. Se pueden obtener anticuerpos adecuados mediante inmunización de un animal hospedador con péptidos que contengan toda o una porción de la proteína CD1. Los animales hospedadores adecuados incluyen ratón, rata, oveja, cabras, hámster, conejo, etc. El origen del antígeno proteico puede ser el ratón, el humano, la rata, el mono, etc. El animal hospedador será generalmente de una especie diferente de la del antígeno, p. ej. CD1 de ratón se usa para inmunizar hámsteres, CD1 humana para inmunizar ratones, etc. Los péptidos derivados de dichas regiones altamente conservadas se pueden usar como antígenos para generar anticuerpos con especificidad cruzada. El antígeno puede contener la proteína completa o sus fragmentos y derivados. Los antígenos preferidos comprenden todo o una parte del dominio extracelular de la CD1 humana, donde esos residuos pueden contener las modificaciones post tradccionales, como glucosilación, encontrada en los antígenos CD1 naturales. Los antígenos que contienen el dominio extracelular son producidos de diversas maneras conocidas en el área, p. ej. expresión de genes clonados usando métodos de recombinación convencionales, aislamiento de linfocitos T, poblaciones de células ordenadas que expresan altos niveles de CD1, etc. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante técnicas convencionales. Generalmente, el bazo y/o los ganglios linfáticos de un animal hospedador inmunizado proporcionan una fuente de células plasmáticas. Las células plasmáticas son inmortalizadas mediante fusión con células de mieloma para producir hibridomas. El sobrenadante del cultivo de hibridomas individuales se somete a detección sistemática usando técnicas corrientes para identificar los anticuerpos producidos con la especificidad deseada. Los animales adecuados para la producción de anticuerpos monoclonales para la proteína humana incluyen ratón, rata, hámster, etc. Para generar anticuerpos contra la proteína de ratón, el animal será generalmente un hámster, cobayo, conejo, etc. El anticuerpo se puede purificar de los sobrenadantes de hibridomas o de líquido ascítico mediante técnicas convencionales, p. ej. cromatografía por afinidad usando CD1 unida a un soporte insoluble, proteína A-sefarosa, etc. Para el uso *in vivo*, particularmente para inyección en humanos, es deseable disminuir la antigenicidad del bloqueante. Una respuesta inmunitaria de un receptor frente al bloqueante disminuirá posiblemente el lapso de tiempo en que la terapia es efectiva. Existen varios métodos que se pueden seguir para proporcionar anticuerpos humanos o humanizados, que incluyen la producción de anticuerpos humanos en hospedadores animales transgénicos, modificación de anticuerpos animales para "humanizar", o "revestir" el anticuerpo; o selección de fragmentos de anticuerpos humanos en técnicas de expresión en fago. Se puede encontrar una reseña de anticuerpos humanos y humanizados en Vaughan *et al.* (1998) Nat. Biotech. 16:535. Los métodos para humanizar anticuerpos son conocidos en el área. El anticuerpo de interés puede ser genomanipulado mediante técnicas de recombinación del ADN para sustituir CH1, CH2, CH3, dominios bisagra y/o el dominio de entramado (framework) con la correspondiente secuencia humana (véase WO 92/02190; Roguska *et al.* (1994) P.N.A.S. 91:969- 973; Jones *et al.* (1986) Nature 321:522-525; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28:489-498).

Se puede incluir una diversidad de otros reactivos en el ensayo de detección sistemática. Por ejemplo reactivos como sales, proteínas neutras, p. ej. albúmina, detergentes, etc. que se pueden usar para facilitar la unión óptima ADN-proteína y/o reducir las interacciones de fondo o no específicas. También se pueden usar reactivos que mejoren de otro modo la eficacia del ensayo, como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, antimicrobianos, etc.

Los ensayos funcionales de interés incluyen una evaluación de la activación funcional de los linfocitos NKT en una

configuración *in vivo* o *in vitro*. La activación se puede medir mediante la proliferación de linfocitos NKT; la liberación de citocinas, p. ej. IFN- $\gamma$  y/o IL-4; la lisis de células diana; y similares. Los controles positivos para la activación pueden incluir el uso de  $\alpha$ -galactosilceramida, presentada por células presentadoras de antígeno que expresan a CD1; o uno de sus análogos exento de células, p. ej. un tetrámero de CD1.

Los linfocitos NKT se pueden aislar de la sangre periférica del paciente usando diversos métodos de afinidad, p. ej. citometría de flujo, perlas inmunomagnéticas, etc. Los ensayos de activación se pueden realizar en clones de linfocitos NKT o en hibridomas de linfocitos NKT, p. ej. usando células humanas, células de roedor, etc. Los ensayos para controlar la activación de los linfocitos NKT son conocidos en el área e incluyen ensayos de proliferación y ensayos de liberación de citocina, inclusive ensayos de ELISA spot.

Los ensayos de proliferación miden el nivel de proliferación de linfocitos NKT en respuesta a un antígeno específico. En un ensayo de ejemplo, se preparan y se lavan células esplénicas de ratón, mezclas de linfocitos NKT purificados y células dendríticas purificadas, etc. y después se cultivan en presencia de un activador, p. ej.  $\alpha$ -galactosilceramida. Las células se cultivan usualmente entre 24 horas y varios días. Se evalúa la proliferación inducida por glucolípidos mediante el control de la síntesis de ADN por los cultivos, p. ej. incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina durante las últimas 18 h del cultivo.

Los ensayos de los linfocitos NKT citotóxicos miden la cantidad de linfocitos NKT citotóxicos que tienen actividad citolítica. Se evalúa la capacidad de los linfocitos NKT para lisar células diana. En un ensayo de ejemplo las células diana se marcan con  $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ . Después las células diana se agregan a una suspensión de linfocitos NKT potencialmente activados. La citotoxicidad se mide cuantificando la liberación de  $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$  desde las células lisadas. Típicamente se incluyen en el ensayo controles para la liberación espontánea y total. El porcentaje de liberación específica de  $^{51}\text{Cr}$  se puede calcular como un porcentaje de la liberación espontánea.

Se puede usar un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) y otros ensayos inmuno-específicos para determinar el perfil de citocina de los linfocitos NKT activados, y se puede usar para controlar la expresión de dichas citocinas como IL-4,  $\gamma$ -IFN, etc. Los anticuerpos de captura pueden ser cualquier anticuerpo específico para una citocina de interés, donde los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos NKT, como los descritos antes, se usan convenientemente como fuente de antígeno. Después de bloquear y lavar, se agregan anticuerpos detectores marcados, y se determina la concentración de proteína presente como una función del marcador que está unido.

#### Formulaciones

Los inhibidores de los linfocitos NKT se pueden suministrar en solución o de cualquier otra forma farmacológicamente adecuada para la administración. Los agentes se formulan para la administración de la manera habitual para la administración de dichos materiales. Las formulaciones típicas son las provistas en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, última edición, Mack Publishing Company, Easton, PA. La ruta de administración se seleccionará basándose en el compuesto que se va administrar, el estado del paciente y la enfermedad que se va a tratar. Un compuesto se puede administrar por rutas diferentes dependiendo de la gravedad de la enfermedad, p. ej. situaciones de urgencia pueden requerir administración i.v., una situación aguda pero no potencialmente mortal se puede tratar oralmente, en tanto el tratamiento crónico se puede administrar mediante aerosol.

Para el uso terapéutico, particularmente en las enfermedades de las vías respiratorias, se prefiere la administración local. La administración mediante inhalación o insuflación de aerosoles proporciona niveles de concentración del fármaco elevados en comparación con la concentración absorbida sistémicamente. Alternativamente, el agente se puede administrar mediante inyección, incluidas la inyección intramuscular, intravenosa (IV), subcutánea o peritoneal, muy preferentemente mediante inyecciones IV y local. Sin embargo, también se pueden usar otros modos de administración siempre que se disponga de medios que permitan que el agente ingrese en la circulación sistémica, como formulaciones orales, transmucosa o transdérmicas, las cuales se pueden aplicar como supositorios, parches cutáneos, o intranasalmente. Cualquier formulación adecuada que efectúe la transferencia del agente a la circulación sanguínea o localmente a los pulmones puede ser utilizada apropiadamente.

Para inyección, las formulaciones adecuadas consisten generalmente en soluciones o suspensiones acuosas que usan solución salina, solución de Hank u otros tampones, incluidos opcionalmente estabilizantes u otros componentes en menor proporción. También se pueden utilizar preparaciones liposómicas y otras formas de microemulsiones. El agente también se puede suministrar en forma liofilizada y reconstituirse para la administración. Las administraciones transmucosa y transdérmica incluyen generalmente agentes que facilitan el pasaje a través de la barrera mucosa o cutánea, como sales biliares, ácido fusídico y sus análogos, varios detergentes y similares. También es posible la administración oral (véase, por ejemplo, Miyamoto *et al.* (2001) *Nature* 413(6855):531-4).

La naturaleza de la formulación dependerá en alguna medida de la naturaleza del agente elegido. Una formulación adecuada se prepara usando técnicas conocidas y principios de formulación bien conocidos por los expertos en el área. El porcentaje de agente contenido en una composición farmacéutica particular dependerá también de la

naturaleza de la formulación; el porcentaje puede variar en un amplio rango entre aproximadamente 1% en peso y aproximadamente 85% en peso.

Los agentes se pueden administrar al paciente aquejado por medio de un sistema de administración farmacéutico por vía inhalatoria. Los compuestos se pueden formular en una forma adecuada para la administración por inhalación. El sistema de administración farmacéutico es aquel que es adecuado para el tratamiento respiratorio mediante administración tópica de agentes al revestimiento mucoso de los bronquios. Esta invención puede utilizar un sistema que depende de la potencia de un gas comprimido para expeler los agentes desde un envase. Se puede emplear un aerosol o un envase presurizado para este propósito.

Según se usa en este documento, el término "aerosol" tiene el significado convencional que hace referencia a partículas muy finas de un líquido o un sólido transportadas por un gas propelente sometido a presión al sitio de la aplicación terapéutica. Cuando en esta invención se emplea un aerosol farmacéutico, el aerosol contiene el principio terapéuticamente activo, que se puede disolver, suspender o emulsionar en una mezcla de un vehículo líquido y un propelente. El aerosol puede estar en forma de solución, suspensión, polvo o preparación semisólida. Los aerosoles empleados en la presente invención están destinados a la administración como partículas sólidas finas o como nieblas de líquido a través del aparato respiratorio de un paciente. Los expertos conocen diversos tipos de propelentes que se pueden utilizar. Los ejemplos de propelentes adecuados incluyen, pero no exclusivamente, hidrocarburos u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis puede ser determinada provyendo de una válvula para administrar una cantidad medida.

La presente invención también se puede llevar a cabo con un nebulizador, que es un instrumento que genera partículas líquidas muy finas de tamaño sustancialmente uniforme en un gas. Preferentemente, el líquido que contienen la gente se dispersa como gotitas. Las pequeñas gotitas pueden ser transportadas por una corriente de aire a través de un tubo de salida del nebulizador. La niebla resultante penetra en el aparato respiratorio del paciente.

Se puede administrar una composición en polvo que contenga el agente, con o sin lubricante, vehículo o propelente a un mamífero que necesite tratamiento. Esta realización de la invención se puede llevar a cabo con un dispositivo convencional para administrar una composición farmacéutica en polvo mediante inhalación. Por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón se puede presentar en una forma farmacéutica por ejemplo en cápsulas o cartuchos, p. ej. de gelatina, o blísteres, a partir de los cuales se puede administrar el polvo con ayuda de un inhalador.

Las micropartículas que contienen el agente pueden ser mantenidas como tales, es decir como un polvo seco, en un envase. Durante el almacenamiento o en la formulación, se pueden mezclar con cualquier otro agente farmacéutico adecuado, vehículos, agentes de esponjamiento, etc., y se pueden procesar por cualquier técnica deseada para dar un producto que tenga las propiedades buscadas para el uso terapéutico final. En particular, la formulación de partículas para formulaciones que pueden ser administradas al pulmón, p. ej. usando un inhalador de dosis fija o de polvo seco, es conocida por los expertos.

En este documento puede utilizarse un "excipiente farmacéuticamente aceptable" y se refiere a un compuesto que es útil para preparar una composición farmacéutica que sea en general segura, atóxica y que no sea indeseable ni biológicamente ni de ninguna otra manera, e incluye excipientes que son aceptables para el uso farmacéutico. Un excipiente farmacéuticamente aceptable según se usa en esta especificación y las reivindicaciones incluye uno o más de tales excipientes. Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, fosfatidilcolina, celulosa, agua estéril, jarabe y metilcelulosa.

Las formulaciones pueden incluir además: lubricantes como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; humectantes; emulsionantes y suspendientes; y conservantes como hidroxibenzoatos de metilo y propilo, y alcohol bencílico.

La formulación que contiene el principio activo de la presente invención se puede formular con diversos excipientes. Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser volátiles o no volátiles. Los excipientes volátiles, cuando se calientan, se volatilizan, se aerosolizan y se inhalan concurrentemente con la antihistamina. Las clases de dichos excipientes son conocidas en el área e incluyen, aunque no exclusivamente, gaseosos, líquidos supercríticos, y solventes sólidos y líquidos. La siguiente es una lista de vehículos de ejemplo dentro de las clases: agua; terpenos como mentol; alcoholes como etanol, propilenglicol, glicerol y otros alcoholes similares; dimetilformamida; dimetilacetamida; cera; dióxido de carbono supercrítico; hielo seco; y sus mezclas. Otros ejemplos de excipientes incluyen, únicamente a modo de ejemplo, surfactantes que son moléculas anfífilas que tienen tanto una porción lipófila como una hidrófila, con un equilibrio variable entre esas dos características. Si la molécula es lipófila, la baja solubilidad de la sustancia en agua puede limitar su utilidad. Si, no obstante, la parte hidrófila domina predominantemente, las propiedades de superficie activa de la molécula pueden ser mínimas. Por consiguiente,

para ser eficaz, el surfactante debe alcanzar un equilibrio adecuado entre una solubilidad suficiente y una actividad superficial suficiente. Todas las sales biliares y los derivados de las sales biliares (sales de sodio de ursodesoxicolato, taurocolato, glicolato y taurodihidrofusidato) potencian eficazmente la absorción en el pulmón.

5 Fosfolípidos, glucósido, octilglucopiranosido, alquil glucósidos, como tiogluco-piranosidos y maltopiranosidos, ciclodextrinas y sus derivados potencian eficazmente la absorción nasal, y pueden actuar de manera similar en el pulmón. Otros surfactantes potencialmente útiles son salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato de sodio y los surfactantes de origen natural como sales del ácido glicirricina, glucósidos de saponina y acil-carnitinas.

10 Se pueden usar lípidos en las formulaciones de la presente invención como, únicamente a modo de ejemplo, lípidos sintéticos, semisintéticos o de origen natural, incluidos fosfolípidos, tocoferoles, esteroides, ácidos grasos, glucoproteínas como albúmina, lípidos cargados negativamente y lípidos catiónicos. En términos de fosfolípidos, éstos podrían incluir lípidos como fosfatidilcolina de huevo (EPC), fosfatidilglicerol de huevo (EPG), fosfatidilinositol de huevo (EPI), fosfatidilserina de huevo (EPS), fosfatidiletanolamina (EPE) y ácido fosfatídico (EPA); las contrapartes de soja, fosfatidilcolina de soja (SPC); SPG, SPS, SPI, SPE y SPA; las contrapartes hidrogenadas de huevo y de soja ( p. ej., HEPC, HSPC), otros fosfolípidos compuestos por uniones éster de ácidos grasos en las posiciones 2 y 3 del glicerol que contienen cadenas de 12 a 26 átomos de carbono y diferentes grupos de cabeza en la posición 1 del glicerol que incluyen colina, glicerol, inositol, serina, etanolamina, así como los ácidos fosfatídicos correspondientes. Las cadenas de esos ácidos grasos pueden ser saturadas o insaturadas, y el fosfolípido puede estar compuesto de ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena y diferentes grados de insaturación. En particular, las composiciones de las formulaciones pueden incluir DPPC, un constituyente principal del surfactante pulmonar de origen natural. Otros ejemplos incluyen dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dioleilfosfatidil-etanolamina (DOPE) y fosfolípidos mixtos como palmitoilestearoilfosfatidil-colina (PSPC) y palmitoilestearoilfosfatidil-glicerol (PSPG), y fosfolípidos acilados individuales como mono-oleil-fosfatidiletanolamina (MOPE). Los esteroides pueden incluir, colesterol, ésteres de colesterol incluido hemi-succinato de colesterol, sales de colesterol incluidas sulfato ácido de colesterol y sulfato de colesterol, ergosterol, ésteres de ergosterol incluido hemi-succinato de ergosterol, sales de ergosterol incluidas sulfato ácido de ergosterol y sulfato de ergosterol, lanosterol, ésteres de lanosterol incluido hemi-succinato de lanosterol, sales de lanosterol incluidas sulfato ácido de lanosterol y sulfato de lanosterol. Los tocoferoles puede incluir tocoferoles, ésteres de tocoferoles incluidos hemi-succinatos de tocoferol, sales de tocoferoles incluidas sulfatos ácidos de tocoferol y sulfatos de tocoferol. La expresión "compuesto de esteroide" incluye esteroides, tocoferoles y análogos.

35 Los lípidos catiónicos utilizados pueden incluir sales de amonio de ácidos grasos, fosfolípidos y glicéridos. Los ácidos grasos incluyen ácidos grasos de longitudes de cadena carbonada de 12 a 26 átomos de carbono que son saturados o insaturados. Algunos ejemplos específicos incluyen: miristilamina, palmitilamina, laurilamina y estearilamina, dilauroil etilfosfocolina (DLEP), dimiristoil etilfosfocolina (DMEP), dipalmitoil etilfosfocolina (DPEP) y diestearoil etilfosfocolina (DSEP), cloruro de N-(2,3-di-(9-(Z)-octadecenilo)-prop-1-il-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP). Los lípidos cargados negativamente que se pueden usar incluyen fosfatidilgliceroles (PG), ácidos fosfatídicos (PA), fosfatidilinositoles (PI) y fosfatidilserinas (PS). Los ejemplos incluyen DMPG, DPPG, DSPG, DMPA, DPPA, DSPA, DMPI, DPPI, DSPI, DMPS, DPPS y DSPS.

45 Para los potenciadores iónicos ( p. ej. los surfactantes aniónicos descritos antes), la naturaleza del contraión puede ser importante. El contraión particular seleccionado puede influir en las propiedades del polvo, solubilidad, estabilidad, higroscopicidad y toxicidad local/sistémica del potenciador o de cualquier formulación que contenga el potenciador. También puede afectar la estabilidad y/o la solubilidad del principio activo con el cual está combinado. En general, iones metálicos monovalentes como sodio, potasio, litio, rubidio y cesio, amoníaco y aminas orgánicas. Los ejemplos de dichas aminas orgánicas incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, 2-amino-2-metiletilamina, betaínas, etilenodiamina, N,N-dibenciletilenotetraamina, arginina, hexametilenotetraamina, histidina, N-metilpiperidina, lisina, piperazina, espermidina, espermina y tris(hidroximetil)aminometano.

Otros excipientes que pueden ser útiles en las formulaciones de los inhibidores de los linfocitos NKT pueden ser, únicamente a modo de ejemplo, microesferas de almidón y quelantes como, una sal de sodio del ácido etilendiaminotetracético (EDTA).

La relación preferida para la combinación inhibidor de los linfocitos NKT/excipiente (o inhibidor de los linfocitos NKT/excipiente/diluyente) puede ser determinada fácilmente por un experto en el área de la farmacología mediante métodos corrientes, basándose en criterios como administración eficaz y uniforme de la dosis óptima, minimización de los efectos secundarios y velocidad de absorción aceptable.

Existen varios tipos diferentes de metodologías de inhalación que se pueden emplear en relación con la presente invención. Los antagonistas de la presente invención se pueden formular básicamente en tres tipos diferentes de formulaciones para inhalación. En primer lugar, los inhibidores de la invención se pueden formular con propulsores

de bajo punto de ebullición. Dichas formulaciones se administran generalmente mediante inhaladores de dosis fija convencionales (MDI). Sin embargo, los MDI convencionales pueden ser modificados de modo de aumentar la capacidad para obtener dosis repetibles utilizando tecnología que mida el volumen inspiratorio y la velocidad de flujo del paciente según se trata en las patentes de los Estados Unidos 5,404,871 y 5,542,410. Alternativamente, los inhibidores de la presente invención se pueden formular en soluciones acuosas o etanólicas y administrar mediante nebulizadores convencionales. No obstante, más preferentemente, dichas formulaciones en solución se aerosolizan usando dispositivos y sistemas como los dados a conocer en las patentes de los Estados Unidos 5,497,763; 5,544,646; 5,718,222 y 5,660,166. En último lugar, los compuestos inhibidores de la presente invención se pueden formular como formulaciones de polvo seco. Dichas formulaciones se pueden administrar simplemente inhalando la formulación de polvo seco después de crear una niebla en aerosol del polvo. La tecnología para llevar a cabo esto se describe en la patente de los Estados Unidos 5,775,320 presentada el 7 julio de 1998 y la patente de los Estados Unidos 5,740,794 presentada el 21 abril de 1998.

Para las preparaciones orales, los agentes se usan solos o en combinación con aditivos adecuados para fabricar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes como celulosa cristalina, derivados de la celulosa, acacia, almidón de maíz o gelatinas; con desintegrantes como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes como talco o estearato de magnesio; y en algunas realizaciones, con diluyentes, tampones, humectantes, conservantes y saborizantes.

En una realización de la invención, las formulaciones orales contienen recubrimientos entéricos se, de modo que el principio activo se administra en el intestino. La formulaciones entéricas se usan a menudo para proteger un principio activo del contenido fuertemente ácido del estómago. Dichas formulaciones se fabrican recubriendo una forma farmacéutica sólida con una película de un polímero insoluble en ambientes ácidos y soluble en ambientes básicos. Los ejemplos de películas son acetato ftalato de celulosa, acetato ftalato de polivinilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de metacrilato y acetato ftalato de celulosa.

Otras formulaciones entéricas comprenden microesferas de polímeros genomanipulados elaboradas de polímeros biológicamente erosionables, que presentan fuertes interacciones adhesivas con la mucosidad gastrointestinal y los revestimientos celulares, que pueden atravesar tanto el epitelio mucoso absorbente como el epitelio asociado al folículo que cubre el tejido linfóide de las placas de Peyer. Los polímeros mantienen contacto con el epitelio intestinal durante periodos prolongados y en realidad lo penetran, a través y entre células. Véase, por ejemplo, Mathiowitz *et al.* (1997) *Nature* 386 (6623): 410-414. Los sistemas de administración de fármacos pueden también utilizar un centro de hidrogeles superporosos (SPH) y SPH compuesto (SPHC), según describen Dorkoosh *et al.* (2001) *J Control Release* 71 (3):307-18.

La formulaciones se proveen típicamente en una forma farmacéutica, donde el término "forma farmacéutica" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas farmacéuticas de la presente invención dependen del agente particular empleado y del efecto que se va a lograr, y de la farmacodinamia asociada a cada complejo del hospedador.

Co-formulaciones:

Los inhibidores de los linfocitos NKT en cuestión se pueden formular o administrar conjuntamente con otros agentes que alivian los síntomas de SLE, asma, etc. Esos agentes incluyen antiinflamatorios no esteroideos (AINE), p. ej. ácido acetilsalicílico; ibuprofeno; naproxeno; indometacina; nabumetona; tolmetina, etc. Los corticoesteroides se usan para reducir la inflamación y suprimir la actividad del sistema inmunitario. El fármaco de este tipo más comúnmente prescrito es la Prednisona. Cloroquina (Aralen) o hidroxiclороquina (Plaquenil) también pueden ser muy útiles en algunos individuos con lupus. Se prescriben muy a menudo para los síntomas cutáneos y articulares del lupus. Azatioprina (Imuran) y ciclofosfamida (Cytoxan) suprimen la inflamación y tienden a suprimir el sistema inmunitario. Los efectos secundarios de estos fármacos incluyen anemia, bajo recuento de glóbulos blancos y mayor riesgo de infección. Otros agentes, p. ej. metotrexato y ciclosporina se usan para controlar los síntomas del lupus. Ambos son fármacos inmunomoduladores que tienen sus propios efectos secundarios. Los anticoagulantes se emplean para evitar que la sangre coagule rápidamente. Varían desde aspirina a dosis muy bajas que evita que las plaquetas se adhieran hasta heparina/coumadina.

Los medicamentos que se pueden administrar conjuntamente con el inhibidor de los linfocitos NKT de acuerdo con la invención incluyen todos los fármacos administrados de manera útil mediante inhalación por ejemplo, analgésicos, p. ej. codeína, dihidromorfina, ergotamina, fentanilo o morfina; preparaciones anginosas, p. ej. diltiazem; antialérgicos, p. ej. cromoglicato, ketotifeno o nedocromil; antibióticos, p. ej. cefalosporinas, penicilinas, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclinas o pentamidina; antihistamínicos, p. ej. metapirileno; antiinflamatorios, p.

ej. beclometasona, flunisolida, budesonida, tiptredano, acetónido de triamcinolona o fluticasona; antitusígenos, p. ej. noscapina; broncodilatadores, p. ej. efedrina, adrenalina, fenoterol, formoterol, isoprenalina, metaproterenol, fenilefrina, fenilpropanolamina, pirbuterol, reproterol, rimiterol, salbutamol, salmeterol, terbutalina, isoetarina, tulobuterol, orciprenalina o (-)-4-amino-3,5-dicloro- $\alpha$ -[[[6-[2-(2-piridinil)etoxi]hexil]-amino]metil]bencenometanol; 5  
 diuréticos, p. ej. amilorida; anticolinérgicos, p. ej. ipratropio, atropina u oxitropio; hormonas, p. ej. cortisona, hidrocortisona o prednisolona; xantinas, p. ej. aminofilina, teofilinato de colina, teofilinato de lisina o teofilina; y proteínas y péptidos terapéuticos, p. ej. insulina o glucagón. Será evidente para un experto en el área que, cuando sea adecuado, los medicamentos se pueden usar en forma de sales ( p. ej. como sales de metales alcalinos o 10  
 aminas, o como sales de adición de ácido) o como ésteres ( p. ej. ésteres de alquilo inferior) o como solvatos (p. ej. hidratos) para optimizar la actividad y/o la estabilidad del medicamento.

Los inhibidores de los linfocitos NKT se administran a un paciente que sufre una activación indeseable de los linfocitos NKT, donde dichos pacientes pueden incluir individuos que sufren enfermedades alérgicas, inclusive asma, SLE y similares. Los pacientes con SLE pueden sufrir indicios de la enfermedad cutáneos, articulares, renales y/o 15  
 del sistema nervioso central. En otras realizaciones, pacientes con cáncer se pueden beneficiar de los métodos para inhibir los linfocitos NKT, para mitigar la regulación por disminución de la vigilancia inmunológica. Los pacientes con aterosclerosis también se pueden beneficiar con los métodos de la invención.

#### Dosis

Se pueden emplear diversos métodos para la administración. La formulación del agente puede ser inhalada, inyectadao por vía intravascular, subcutánea, peritoneal, etc. La dosis de la formulación terapéutica variará 20  
 ampliamente, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, el modo de administración, el propósito de la administración, la depuración del agente en el hospedador, y similares. La dosis administrada variará dependiendo de factores conocidos, como las características farmacodinámicas del agente particular, el modo y la ruta de administración, la edad, la salud y el peso del receptor, la naturaleza y la magnitud de los síntomas, los tratamientos concomitantes, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. La dosis se puede 25  
 administrar tan infrecuentemente como una vez por semana o cada dos semanas, o fraccionada en dosis menores y administrada diariamente, semi-semanalmente, etc. para mantener un nivel de dosis eficaz. Generalmente, una dosis diaria de principio activo puede ser entre aproximadamente 0.1 a 100 mg/kg de peso corporal. Las formas farmacéuticas adecuadas para administración interna contienen generalmente entre aproximadamente 0.1 mg de 30  
 500 mg de principio activo por unidad. El principio activo puede variar de 0.5 a 95% en peso basado en el peso total de la composición.

El principio activo puede variar de 0.5 a 95% en peso basado en el peso total de la composición.

En algunas realizaciones, la dosis de principio activo puede ser menor de 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%,14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 40  
 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001 %, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% o 0.0001% en peso basado en el peso total de la composición.

En algunas realizaciones, la dosis de principio activo puede ser mayor de 20%, 19.75%, 19.50%, 19.25% 19%, 18.75%, 18.50%, 18.25% 18%, 17.75%, 17.50%, 17.25% 17%, 16.75%, 16.50%, 16.25% 16%, 15.75%, 15.50%, 45  
 15.25% 15%, 14.75%, 14.50%, 14.25% 14%, 13.75%, 13.50%, 13.25% 13%, 12.75%, 12.50%, 12.25% 12%, 11.75%, 11.50%, 11.25% 11%, 10.75%, 10.50%, 10.25% 10%, 9.75%, 9.50%, 9.25% 9%, 8.75%, 8.50%, 8.25% 8%, 7.75%, 7.50%, 7.25% 7%, 6.75%, 6.50%, 6.25% 6%, 5.75%, 5.50%, 5.25% 5%, 4.75%, 4.50%, 4.25%, 4%, 3.75%, 3.50%, 3.25%, 3%, 2.75%, 2.50%, 2.25%, 2%, 1.75%, 1.50%, 1.25% , 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1 %, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 50  
 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% o 0.0001% en peso basado en el peso total de la composición.

En algunas realizaciones, la dosis de principio activo está en el rango entre aproximadamente 0.0001 % y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 0.001% y aproximadamente 40 %, entre aproximadamente 0.01 y 55  
 aproximadamente 30%, entre aproximadamente 0.02% y aproximadamente 29%, entre aproximadamente 0.03% y aproximadamente 28%, entre aproximadamente 0.04% y aproximadamente 27%, entre aproximadamente 0.05% y aproximadamente 26%, entre aproximadamente 0.06% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 0.07% y aproximadamente 24%, entre aproximadamente 0.08% y aproximadamente 23%, entre aproximadamente 0.09% y aproximadamente 22%, entre aproximadamente 0.1% y aproximadamente 21%, entre aproximadamente 0.2% y 60  
 aproximadamente 20%, entre aproximadamente 0.3% y aproximadamente 19%, entre aproximadamente 0.4% y aproximadamente 18%, entre aproximadamente 0.5% y aproximadamente 17%, entre aproximadamente 0.6% y aproximadamente 16%, entre aproximadamente 0.7% y aproximadamente 15%, entre aproximadamente 0.8% y aproximadamente 14%, entre aproximadamente 0.9% y aproximadamente 12%, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10% en peso basado en el peso total de la composición.

5 En algunas realizaciones, la dosis de principio activo es igual o menor que 10 g, 9.5 g, 9.0 g, 8.5 g, 8.0 g, 7.5 g, 7.0 g, 6.5 g, 6.0 g, 5.5 g, 5.0 g, 4.5 g, 4.0 g, 3.5 g, 3.0 g, 2.5 g, 2.0 g, 1.5 g, 1.0 g, 0.95 g, 0.9 g, 0.85 g, 0.8 g, 0.75 g, 0.7 g, 0.65 g, 0.6 g, 0.55 g, 0.5 g, 0.45 g, 0.4 g, 0.35 g, 0.3 g, 0.25 g, 0.2 g, 0.15 g, 0.1 g, 0.09 g, 0.08 g, 0.07 g, 0.06 g, 0.05 g, 0.04 g, 0.03 g, 0.02 g, 0.01 g, 0.009 g, 0.008 g, 0.007 g, 0.006 g, 0.005 g, 0.004 g, 0.003 g, 0.002 g, 0.001 g, 0.0009 g, 0.0008 g, 0.0007 g, 0.0006 g, 0.0005 g, 0.0004 g, 0.0003 g, 0.0002 g o 0.0001 g por kg de peso corporal.

10 En algunas realizaciones, la dosis de principio activo es más de 0.0001 g, 0.0002 g, 0.0003 g, 0.0004 g, 0.0005 g, 0.0006 g, 0.0007 g, 0.0008 g, 0.0009 g, 0.001 g, 0.0015 g, 0.002 g, 0.0025 g, 0.003 g, 0.0035 g, 0.004 g, 0.0045 g, 0.005 g, 0.0055 g, 0.006 g, 0.0065 g, 0.007 g, 0.0075 g, 0.008 g, 0.0085 g, 0.009 g, 0.0095 g, 0.01 g, 0.015 g, 0.02 g, 0.025 g, 0.03 g, 0.035 g, 0.04 g, 0.045 g, 0.05 g, 0.055 g, 0.06 g, 0.065 g, 0.07 g, 0.075 g, 0.08 g, 0.085 g, 0.09 g, 0.095 g, 0.1 g, , 0.15 g, 0.2 g, , 0.25 g, 0.3 g, , 0.35 g, 0.4 g, , 0.45 g, 0.5 g, 0.55 g, 0.6 g, , 0.65 g, 0.7 g, 0.75 g, 0.8 g, , 0.85 g, 0.9 g, 0.95 g, 1 g, 1.5 g, 2 g, 2.5, 3 g, 3.5, 4 g, 4.5 g, 5 g, 5.5 g, 6 g, 6.5 g, 7 g, 7.5 g, 8 g, 8.5 g, 9 g, 9.5 g o 10 g por kg de peso corporal.

15 En algunas realizaciones, una dosis de principio activo es 0.0001-10 g, 0.0005-9 g, 0.001-8 g, 0.005-7 g, 0.01-6 g, 0.05-5 g, 0.1-4 g, 0.5-4 g, o 1-3 g por kg de peso corporal.

20 Generalmente, una dosis diaria de principio activo puede ser entre aproximadamente 0.1 y 100 mg/kg de peso corporal. Las formas farmacéuticas adecuadas para administración interna contienen generalmente entre aproximadamente 0.1 mg y 500 mg de principio activo por unidad. En algunas realizaciones de la presente invención la dosis de principio activo puede ser 0.1-10 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones de la presente invención la dosis de principio activo puede ser 0.1-5 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones de la presente invención la dosis de principio activo puede ser 0.1-2 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones de la presente invención la dosis de principio activo puede ser 0.5-10 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones de la presente invención la dosis de principio activo puede ser 0.5-2 mg/kg de peso corporal.

30 En algunos aspectos de la presente invención, se provee de dosis unitarias de las formulaciones para administración de la formulación del inhibidor de los linfocitos NKT a un paciente. Dicha dosis unitaria puede tener, por ejemplo, un volumen total menor de 50 mL, 40 mL, 30 mL, 20 mL, 10 mL, 9 mL, 8 mL, 7 mL, 6, mL 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL, 0.9 mL, 0.8 mL, 0.7 mL, 0.6 mL, 0.5 mL, 0.4 mL, 0.3 mL, 0.2 mL, 0.1 mL, 0.09 mL, 0.08 mL, 0.07 mL, 0.06 mL, 0.05 mL, 0.04 mL, 0.03 mL, 0.02 mL, 0.01 mL, 0.009 mL, 0.008 mL, 0.007 mL, 0.006 mL, 0.005 mL, 0.004 mL, 0.003 mL, 0.002 mL, 0.001 mL, 0.0009 mL, 0.0008 mL, 0.0007 mL, 0.0006 mL, 0.0005 mL, 0.0004 mL, 0.0003 mL, 0.0002 mL o 0.0001 mL. En algunas realizaciones, dicha dosis unitaria puede tener un volumen total de más de 0.2 mL y menos de 500 mL. En algunas realizaciones, dicha dosis unitaria puede tener un volumen total de menos de 0.1 mL. En algunas realizaciones, dicha dosis unitaria puede tener un volumen total de menos de 0.1 mL. En algunas realizaciones, dicha dosis unitaria puede tener un volumen total de 0.1-0.2 mL (inclusive de 0.1 mL y 0.2 mL). En algunas realizaciones, dicha dosis unitaria puede tener un volumen total de menos de 0.1 mL y más de 0.2.

40 En algunas realizaciones, una dosis unitaria tiene un volumen total en el rango de 0.0001-500 mL, 0.0005-400 mL, 0.001-300 mL, 0.005-200 mL, 0.01-100 mL, 0.05-90 mL, 0.06-80 mL, 0.07-70 mL, 0.08-60 mL, 0.09-50 mL, 0.1-40 mL, 0.2-30 mL, 0.3-29 mL, 0.4-28 mL, 0.5-27 mL, 0.6-26 mL, 0.7-25 mL, 0.8-24 mL, 0.9-23 mL, 10-22 mL, 11-21 mL, 12-20 mL, 13-19 mL, 14-18 mL o 15-17 mL por sitio diana.

#### 45 Dispositivos

50 Para administrar los volúmenes relativamente pequeños de las formulaciones de la presente invención por inhalación, en períodos de dosificación relativamente cortos, las formulaciones se pueden administrar con el uso de un dispositivo de inhalación que tenga una velocidad de salida del aerosol relativamente alta. Los dispositivos útiles también pueden tener una alta eficiencia de dosis emitida (es decir, bajo volumen residual en el dispositivo). Para aumentar la eficiencia general del sistema, la emisión puede ser limitada además a los períodos de inhalación real por el paciente (es decir, activada por la respiración). Por lo tanto, los nebulizadores de chorro de aire convencionales pueden tener una velocidad de salida del aerosol en el orden de 3 µl/s, de aproximadamente 4 µl/s, de aproximadamente 5 µl/s o no menos de aproximadamente 8 µl/s. Los dispositivos de inhalación útiles para la práctica de la presente invención pueden liberar al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 75%, más preferentemente al menos aproximadamente 80% y muy preferentemente al menos aproximadamente 85% de la dosis cargada como aerosol para la inhalación por el paciente. En algunas realizaciones, los dispositivos de inhalación para usar en la presente invención pueden ser activados por la respiración y restringidos a la administración de partículas aerosolizadas de la formulación que contiene el inhibidor de los linfocitos NKT al período de inhalación real por el paciente. El inhalador puede ser un inhalador manual, autónomo y fácil de transportar. En otras realizaciones de la invención, los dispositivos útiles para administrar las formulaciones concentradas de inhibidor de los linfocitos NKT de la invención, incluyen nebulizadores de chorro de aire convencionales acoplados con un compresor capaz de presiones de salida superiores a las convencionales.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a título ilustrativo y no con carácter limitante.

#### Parte experimental

##### 5 Ejemplo 1

La inyección i.p. de  $\alpha$ -galactosilceramida (obtenida de Brigham Young University, Provo, UT) en ratones C57BL/6 aumenta los niveles séricos de IL-4 e IFN- $\gamma$  mediante activación selectiva de los linfocitos NKT. La inyección i.p. de C12  $\beta$ -galactosilceramida (Avanti Lipids, Inc.) antagoniza la capacidad de la  $\alpha$ -galactosilceramida para elevar los niveles de IL-4, interferón-gamma e IgE en el suero de esos ratones.

Se administró a ratones C57BL/6 machos de aproximadamente 8 semanas de edad cualquiera de 100  $\mu$ g de  $\beta$ -galactosilceramida ( $\beta$ -Galcer) i.p., 0.1  $\mu$ g de  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -Galcer) i.p., 100  $\mu$ g de  $\beta$ -Galcer i.p. o bien 1 hora antes o al mismo tiempo que 0.1  $\mu$ g de  $\alpha$ -Galcer i.p., o ningún tratamiento.  $\beta$ -Galcer se obtuvo de Avanti Lipids Inc. Los glucolípidos estaban en solución acuosa con PBS. Los niveles de citocina se determinaron mediante ELISA según describieron previamente Zeng *et al.* (2003), supra. Todos los ratones se sacrificaron 6 horas más tarde, y se determinaron los niveles séricos de IFN- $\gamma$  e IL-4, como se muestra en las figuras 1A y 1B.

El ensayo para IFN- $\gamma$  mostró que los ratones normales (sin tratar) tenían un nivel de aproximadamente 50 pg/mL. La inyección de  $\beta$ -Galcer anterior no aumentó el nivel, pero la inyección de  $\alpha$ -Galcer sola aumentó el nivel más de dos veces. Sin embargo, cuando se administró  $\beta$ -Galcer 1 hora antes que  $\alpha$ -Galcer o al mismo tiempo que  $\alpha$ -Galcer entonces los niveles estuvieron por debajo de 40 pg/mL. Los resultados muestran que  $\beta$ -Galcer bloqueó el aumento inducido por  $\alpha$ -Galcer.

Se observó un patrón similar cuando se determinaron los niveles séricos de IL-4. Los ratones sin tratar tuvieron aproximadamente 100 pg/mL de IL-4, y 100  $\mu$ g de  $\beta$ -Galcer sola no aumentó el nivel. Sin embargo, 0.1  $\mu$ g de  $\alpha$ -Galcer aumentó el nivel en aproximadamente 10 veces hasta 1000 pg/mL. Cuando se administraron 100  $\mu$ g de  $\beta$ -Galcer una hora antes que 0.1  $\mu$ g de  $\alpha$ -Galcer entonces el aumento se bloqueó completamente, y cuando ambos glucolípidos se administraron al mismo tiempo, el nivel de IL-4 fue de aproximadamente 250 pg/mL. Los resultados muestran que  $\beta$ -Galcer puede inhibir no sólo el aumento en el nivel de IFN- $\gamma$  sérico, inducido por  $\alpha$ -Galcer, sino que también puede inhibir el aumento en el nivel de IL-4. Concluimos que  $\beta$ -Galcer puede bloquear la activación de linfocitos NKT *in vivo* inducida por  $\alpha$ -Galcer según se juzga por la secreción de citocinas en el suero.

En otro experimento, se midieron los niveles séricos medios de IgE de grupos de tres ratones C57BL/6 antes o 10 días después de una única inyección i.p. de 0.1  $\mu$ g de  $\alpha$ -Galcer sola, 100  $\mu$ g de  $\beta$ -Galcer sola o 100  $\mu$ g de  $\beta$ -Galcer inyectados 1 hora antes que 0.1  $\mu$ g de  $\alpha$ -Galcer. Los resultados, que se muestran en la figura 1 C y 1 D, demuestran que  $\alpha$ -Galcer sola elevó el nivel de IgE aproximadamente tres veces hasta cerca de 500 ng/mL,  $\beta$ -Galcer indujo un aumento menor hasta cerca de 400 ng/mL, y la combinación de glucolípidos indujo un nivel de aproximadamente 250 ng/mL. Las barras muestran medias de las determinaciones por triplicado y los paréntesis muestran las desviaciones estándar. La única diferencia significativa entre antes y después en los niveles séricos se observó con  $\alpha$ -Galcer sola ( $p < 0.05$ ) según se juzga por la prueba t de student de medias independientes. Concluimos que  $\beta$ -Galcer bloquea el aumento en los niveles séricos de IgE inducido por  $\alpha$ -Galcer. No se observó ningún cambio significativo la expresión de IgG2c de control.

##### 45 Ejemplo 2

#### Efectos de $\beta$ -GalCer en el asma

En un modelo murino de asma, se administró  $\beta$ -GalCer a ratones BALB/c inmunizados con OVA o a ratones con hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) inducida por  $\alpha$ -GalCer.

#### Materiales y métodos

Animales: se obtuvieron ratones BALB/cByJ de Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. El Comité sobre Bienestar Animal de la Universidad de Stanford aprobó los protocolos utilizados en este estudio.

Anticuerpos monoclonales: se purificaron anticuerpos monoclonales de líquido ascítico mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. Se usaron los hibridomas siguientes: R46A2 (mAb anti-IFN- $\gamma$ ) obtenido de ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); XMG1.2 (anticuerpo anti-IFN- $\gamma$ ); BVD4-1D11, BVD6-24G2 (mAb anti-IL-4). Anti-38C13 idiotipo mAb 4G10 (IgG2a de rata) se usó como control de isotipo.

Inmunizaciones. Se sensibilizaron ratones BALB/c en las almohadillas de las patas con OVA (100  $\mu$ g/ratón) adsorbida en 200  $\mu$ g de alum ( $Al(OH)_3$ ). Los ratones fueron provocados intranasalmente con 50  $\mu$ g de OVA en 50  $\mu$ l NaCl al 0.9% 7, 8 y 9 días más tarde. Un día después de la última provocación intranasal con OVA, se midió la

hiperreactividad de las vías respiratorias de ratones conscientes después de la inhalación de concentraciones crecientes de metacolina en un pletismógrafo de cuerpo entero. La inmunización con  $\alpha$ -GalCer se realizó según se describió.

5 Para facilitar la aspiración pulmonar durante la administración intranasal del antígeno, los ratones se anestesiaron ligeramente por vía intraperitoneal (i.p.) con 0.25 mL de ketamina (0.44 mg/mL)/xilazina (6.3 mg/mL) en solución salina normal. 75% del antígeno administrado por intranasalmente se detectó a continuación en los pulmones (Tsuyuki *et al.* (1997) *J. Exp. Med.* 185:1671-9.

10 ELISA de citocina. Se llevaron a cabo ensayos de ELISA como describieron previamente Macaulay *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:1694-1700. Los pares de anticuerpos se usaron de la manera siguiente, listados por detección captura/biotinilado: IL-4, BVD4-1 D11/BVD6-24G2; IFN- $\gamma$ , R4-6A2/ XMG1.2. Se usaron como patrones las citocinas recombinantes, con curvas generadas en diluciones 1:2 desde 500 a 39 pg/mL para IL-4, y 20-2, 156 ng/mL para IFN- $\gamma$ .

15 Medición de los isotipos de anticuerpos anti-OVA. Se extrajo la sangre de los ratones en el momento del sacrificio y se midió el anticuerpo específico para OVA usando el ensayo de ELISA específico para el antígeno modificado. Para la medición de la IgG específica para OVA, se recubrieron placas durante toda la noche con 5  $\mu$ g/mL de OVA. Después de lavar y bloquear se agregaron diluciones seriadas de sueros a las placas. Luego de la incubación durante toda la noche, las placas se desarrollaron usando anticuerpos específicos para la subclase anti-IgG conjugado con HRPO en cabra (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, ALA). Después de otro lavado, se agregó sustrato OPD, se desarrollaron las placas y se determinó la densidad óptica a 492 nm. Se usaron mAb IgG1 anti-OVA 6C1 y mAb IgG2a anti-OVA 3A11 como patrones para la cuantificación de cada subclase de IgG. La determinación de IgE específica para OVA se realizó mediante ELISA, usando el mAb anti-IgE de ratón producido en rata EM95 (5.0  $\mu$ g/mL) para recubrir las placas. Después que las muestras se aplicaron y se incubaron durante toda la noche, las placas se lavaron y se les agregó OVA biotinilada (10  $\mu$ g/mL). Dos horas más tarde, las placas se lavaron y se les agregó estreptavidina conjugada con HRPO (Southern Biotechnology Associates). Las placas se desarrollaron con sustrato OPD y se determinó la densidad óptica a 492 nm. Se cuantificó la IgE en sueros de ratones hiperinmunizados con OVA en alum y se usaron como patrones para el ensayo de ELISA de IgE específica para OVA.

30 Medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias. Se evaluó la hiperreactividad de las vías respiratorias mediante obstrucción del flujo aéreo inducida por metacolina de ratones conscientes colocados en un pletismógrafo de cuerpo entero (modelo PLY 3211, Buxco Electronics Inc., Troy, NY). La obstrucción del flujo aéreo pulmonar se midió por Penh usando la fórmula siguiente:

$$\text{Penh} = \left( \frac{\text{Te}}{\text{RT}} - 1 \right) \times \left( \frac{\text{PEF}}{\text{PIF}} \right),$$

donde

40 Penh = pausa mayor (sin dimensiones), Te = tiempo de espiración, RT = tiempo de relajación, PEF = flujo espiratorio máximo (mL/s) y PIF = flujo inspiratorio máximo (mL/s) (Hamelmann *et al.* (1997) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:766-75. La pausa mayor (Penh), el volumen minuto, el volumen tidal y la frecuencia respiratoria se obtuvieron de la presión de la cámara medida con un transductor (modelo TRD5100) conectado a módulos preamplificadores (model MAX2270) y analizados por el sistema informático XA (modelo SFT 1810). Las mediciones del grado de respuesta a la metacolina se obtuvieron exponiendo ratones durante 2 minutos a NaCl al 0.9%.

45 Recolección del líquido de lavado broncoalveolar (BAL) e histología pulmonar. Se inyectó a los animales una dosis letal i.p. de fenobarbital (450 mg/kg). Se introdujo una cánula en la traquea y los pulmones se lavaron tres veces con 0.8 mL de PBS, y se juntó el líquido. Se contaron las células en el líquido de lavado usando un hemocitómetro y se determinaron las características diferenciales de las células del BAL en extendidos en portaobjetos teñidos con Hansel Stain (Lide Laboratories, Florissant, MO). Se diferenciaron al menos 200 células con un microscopio de luz basándose en los criterios morfológicos convencionales. En algunos animales, no se realizó BAL pero se extirparon los pulmones, se lavaron con PBS, se fijaron en formalina al 10% y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Resultados.

55 El tratamiento con C12- $\beta$ -GalCer bloquea la AHR inducida  $\alpha$ -GalCer. Como se muestra en la figura 2, la administración i.v. de 100  $\mu$ g de C12- $\beta$ -GalCer administrada 2 horas antes que 1.5  $\mu$ g de  $\alpha$ -GalCer administrada i.n. reduce en gran medida la AHR a las 24 horas. La administración i.v. de C12- $\beta$ -GalCer sola no induce por sí misma ninguna AHR, (b) la administración i.n. e i.v. de 50  $\mu$ g de C12- $\beta$ -GalCer 2 horas antes de la administración i.n. de 0.5  $\mu$ g de  $\alpha$ -GalCer reduce en gran medida la AHR a las 24 horas, aunque C12- $\beta$ -GalCer administrada i.n. induce una AHR leve. Se usó un mínimo de 4 ratones por grupo.

- 5 El tratamiento con C12- $\beta$ -GalCer reduce la AHR inducida OVA/alum. Como se muestra en la figura 3, los ratones fueron sensibilizados mediante inyección i.p. de 100  $\mu$ g de OVA con 200  $\mu$ l de hidróxido de aluminio (alum) y después provocados i.n. con 50  $\mu$ g de OVA 7, 8 y 9 días más tarde. (a) Se midió la AHR el día 10. Se administró C12- $\beta$ -GalCer por vía i.v. (100  $\mu$ g) 1 día antes de la sensibilización con OVA/alum y 6 horas antes de cada provocación i.n. (100  $\mu$ g). El tratamiento redujo la AHR. (b) Se redujo la IgE específica para OVA sérica en el grupo tratado con C12- $\beta$ -GalCer, (c) Las células de los ganglios linfáticos del grupo tratado con C 12- $\beta$ -GalCer produjeron ligeramente menos IFN- $\gamma$  y menos IL-4 después de 4 días en cultivo con 62.5  $\mu$ g/mL de OVA ( $5.0 \times 10^6$  células por pocillo). Se analizaron 4 ratones por grupo.
- 10 El tratamiento con anticuerpo anti-CD1d (HB323) bloquea la AHR inducida por OVA/alum. como se muestra la figura 4. (a) Se sensibilizaron ratones mediante inyección i.p. de 100  $\mu$ g de OVA con 200  $\mu$ l de hidróxido de aluminio (alum) y después se provocaron i.n. con 50  $\mu$ g de OVA 7, 8 y 9 días más tarde. Se midió la AHR el día 10. Se administró i.p. anticuerpo anti-CD1d 1 día antes de la sensibilización con OVA/alum (500  $\mu$ g) y nuevamente inmediatamente antes de la provocación i.n. (500  $\mu$ g). El tratamiento redujo la AHR. (b) El tratamiento con anticuerpo anti-CD1d (HB323) reduce la producción de citocina en los ganglios linfáticos. Se establecieron cultivos de ganglios linfáticos de  $5.0 \times 10^5$  células por pocillo el día 11 después de la sensibilización con OVA/alum y la provocación de las vías respiratorias. Los cultivos se trataron con OVA titulada de 125  $\mu$ g/mL y la citocina del sobrenadante se determinó mediante ELISA. Se usó un mínimo de 4 ratones por grupo, los datos son representativos de los experimentos.
- 15 C12- $\beta$ -GalCer causa que se produzca más IFN- $\gamma$  sérico luego de la AHR inducida por  $\alpha$ -GalCer. La histología demuestra que se reduce la inflamación eosinofílica peribronquiolar con el tratamiento con C12- $\beta$ -GalCer. Es importante señalar que, la inyección i.v. de C12- $\beta$ -GalCer por sí misma no produce ninguna inflamación pulmonar. El grupo tratado con C12- $\beta$ -GalCer presentó ganglios linfáticos bronquiales y mediastinales más grandes. Esos ratones mostraron mediante histología, una infiltración eosinofílica de los pulmones menor, pero presente, con posiblemente más neutrofilia que el control positivo de OVA/alum. La histología también demostró que la inflamación eosinofílica se reducía (pero aún estaba presente) en los pulmones de los ratones tratados con anti-CD1d. Si bien el bloqueo con HB323 proporciona los mejores resultados, el uso de un anticuerpo anti-CD1d 1B1 también causa una reducción en la AHR.
- 20 Esos datos demuestran la participación de los linfocitos NKT en la AHR y el asma, y demuestran además la eficacia del bloqueante  $\beta$ -GalCer, y anti-CD1, en el tratamiento de esta enfermedad.
- 25
- 30

### Ejemplo 3

#### 35 Administración oral de agentes inhibidores

Se administraron oralmente dosis de  $\beta$ -galactosilceramida que variaban de 100 a 800  $\mu$ g/ratón. Los niveles de citocina de IFN- $\gamma$  e IL-4 se determinaron mediante ELISA según describieron previamente Zeng *et al.* (2003), *supra*, de los niveles séricos.

40 El ensayo para IFN- $\gamma$  mostró que 24 horas después de la administración, no había aumento en los niveles séricos a ninguna dosis. Se observó un patrón similar cuando se determinaron los niveles séricos de IL-4.

45 Como se muestra la figura 5, la administración oral de  $\beta$ -galactosilceramida disminuyó la tinción para los marcadores de los linfocitos NKT en el hígado.

Las dosis de 100 a 800  $\mu$ g/ratón son equivalentes a una dosis de 4 a 32 mg/kg. Usando los lineamientos de la FDA para la equivalencia humana, la dosis equivalente humana es 0.32 - 2.6 mg/kg.

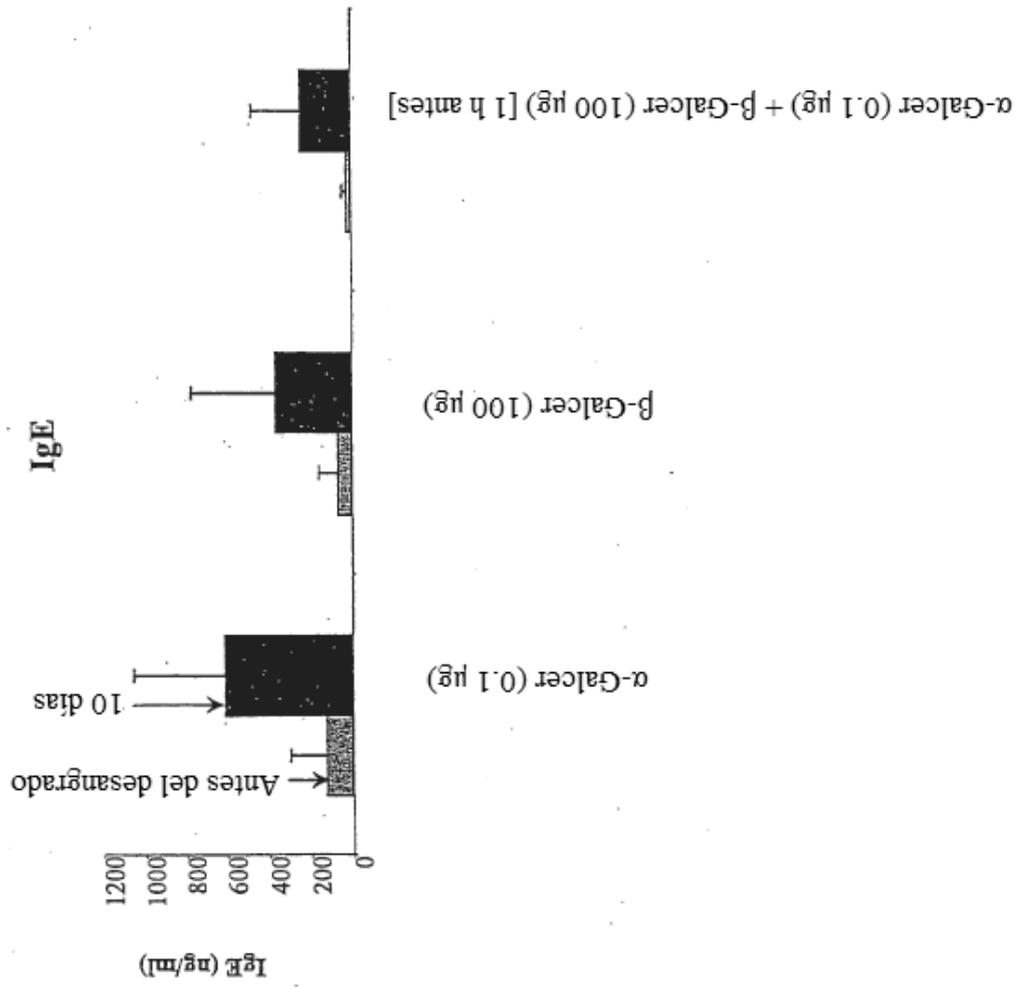
50 Aunque la invención precedente se haya descrito en detalle por medio de ilustraciones y ejemplos con la finalidad de clarificar su comprensión, será fácilmente evidente para los técnicos con experiencia en el área, a la luz de las enseñanzas de esta invención, que pueden efectuársele ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones subordinadas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una dosis eficaz de un  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d para bloquear o reducir la hiperreactividad de las vías respiratorias asociada al asma, donde dicho  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d es administrado local o sistémicamente.
- 10 2. El  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d de la reivindicación 1, donde la administración local comprende inhalación o nebulización.
3. El  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d de la reivindicación 2, donde la administración local es inhalación.
- 15 4. El  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d de la reivindicación 1, donde la administración sistémica comprende la inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea, peritoneal o local; o la administración oral, transmucosa, transdérmica o intranasal.
- 20 5. El  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d de la reivindicación 1, donde dicho  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d se administra profilácticamente.
6. El  $\beta$ -glucolípido de la reivindicación 1, donde dicho  $\beta$ -glucolípido comprende un azúcar pentosa, un azúcar hexosa, un oligosacárido o un polisacárido.
7. El  $\beta$ -glucolípido de la reivindicación 6, donde dicha azúcar hexosa comprende glucosa, galactosa o manosa.
- 25 8. El  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d de la reivindicación 1, donde dicho  $\beta$ -glucolípido consiste en un lípido que comprende un ácido graso C8 a C30, un alcohol secundario de cadena larga, un amino alcohol de cadena larga, o una amida de ácido graso con una di- o trihidroxi base de cadena larga, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente fosforilado o sulfatado.
- 30 9. El  $\beta$ -glucolípido de la reivindicación 1, donde dicho  $\beta$ -glucolípido consiste en un lípido que comprende una ceramida, esfingomielina, cerebrosidos, esfingosina, dihidroesfingosina, C20-dihidroesfingosina, fitoesfingosina, C20-fitoesfingosina, dehidrofitoesfingosina o esfingadienina.
- 35 10. El  $\beta$ -glucolípido de la reivindicación 1, donde dicho  $\beta$ -glucolípido es  $\beta$ -galactosilceramida.
11. El  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d de la reivindicación 1, donde dicho  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d consiste en 0.5 a 95% en peso basado en el peso total de la composición.
- 40 12. El  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d de la reivindicación 1, donde dicho  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d se administra en una dosis entre aproximadamente 0.1 y 100 mg/kg de peso corporal en una base diaria.
13. El  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d de la reivindicación 1, donde dicho  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d consiste en 0.1 mg a 500 mg de una forma farmacéutica para administración interna.
- 45 14. El  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d de la reivindicación 1, donde dicho  $\beta$ -glucolípido o anticuerpo anti-CD1d consiste en una solución acuosa, una suspensión acuosa, una preparación liposómica o una formulación en polvo.

Figura 1A

Exp N° 05.29.04 (Revisado)  
C57BL/6, F, 4 a 6 semanas de vida



Exp# 05.29.04  
C57BL/6, F, 4 a 6 semanas de vida

Figura 1B

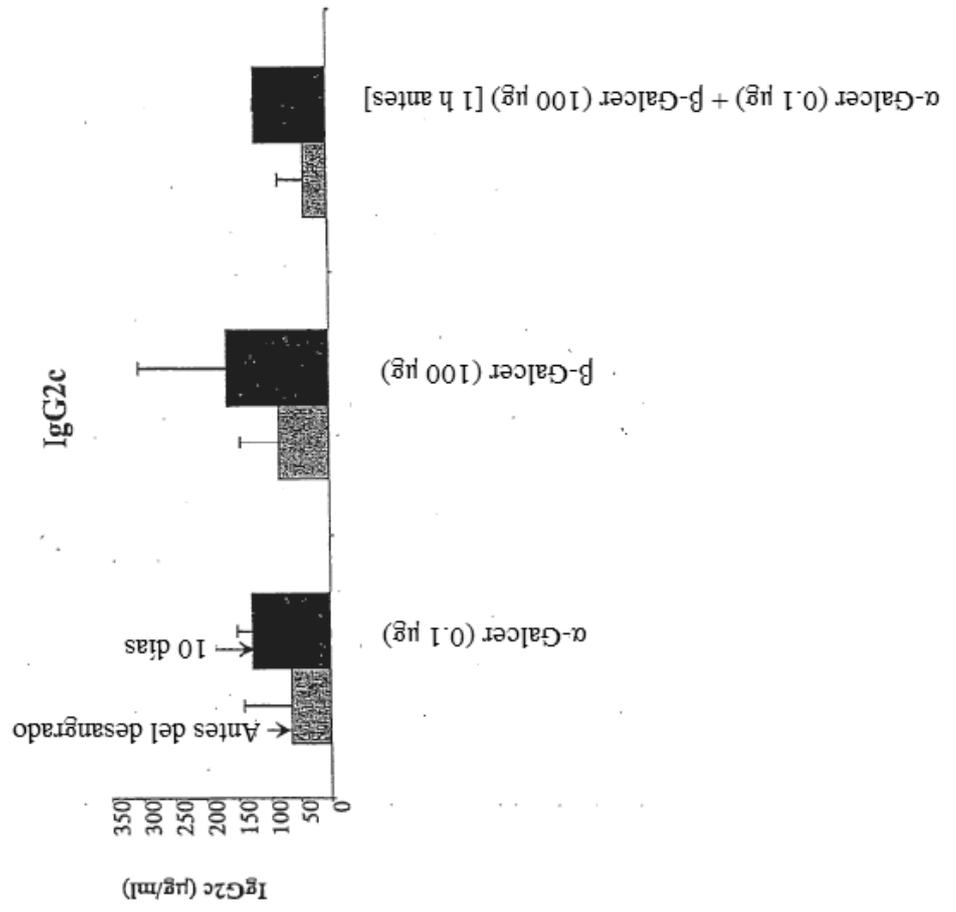


Figura 1C

**Exp N° 5/14/04 (Revisado)**  
 C57BL/6 ratones inyectados con  $\alpha$ -Galcer y  $\beta$ -Galcer  
 Los ratones se sacrificaron después de 6 h

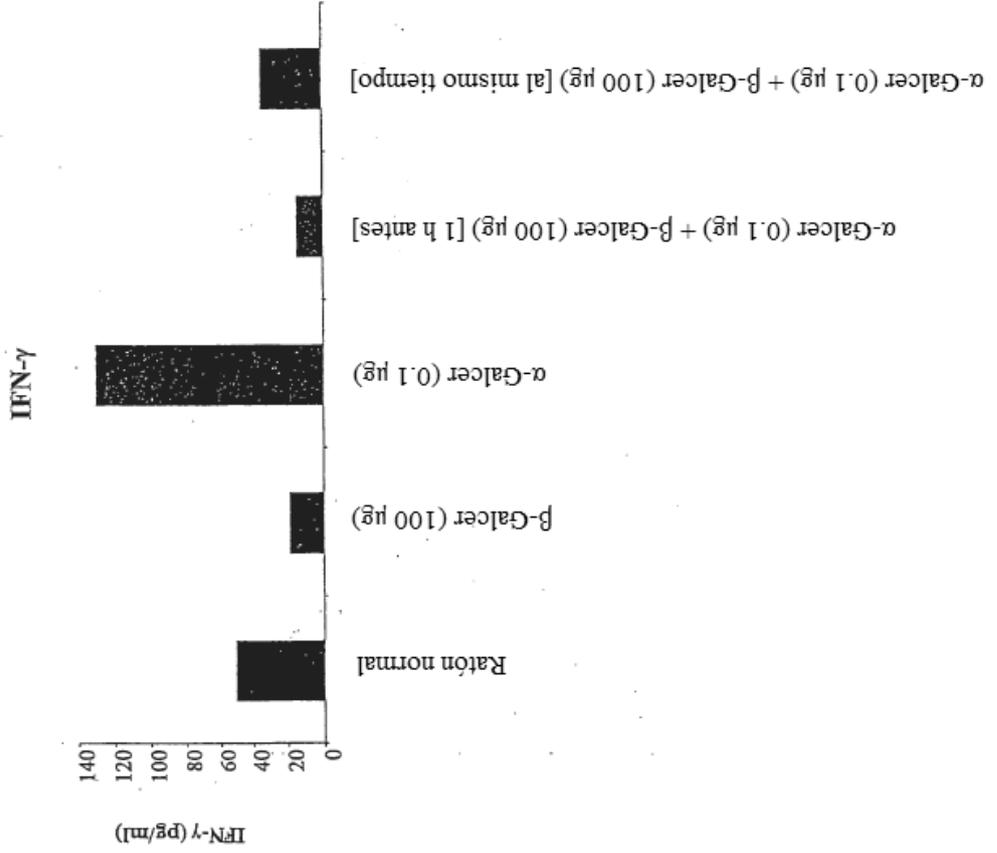


Figura 1D

Exp# 5/14/04  
C57BL/6 ratones inyectados con  $\alpha$ -Galcer y  $\beta$ -Galcer  
Los ratones se sacrificaron después de 6 h

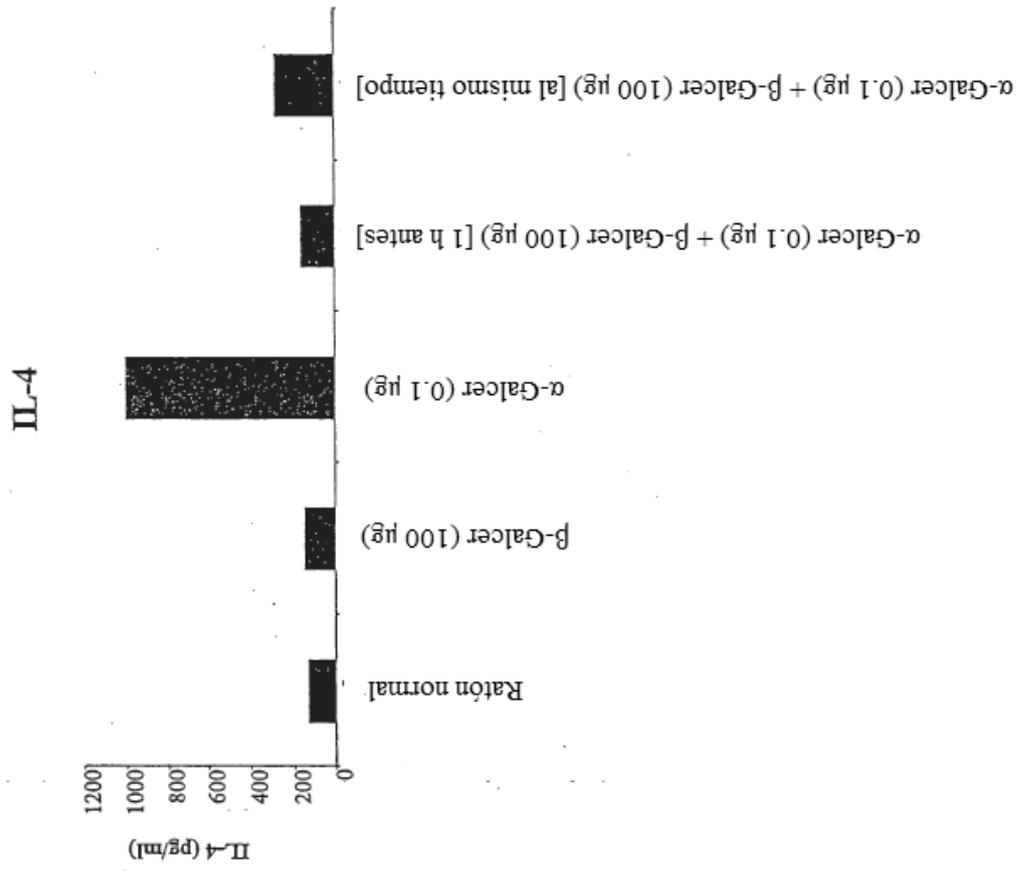


Figura 2

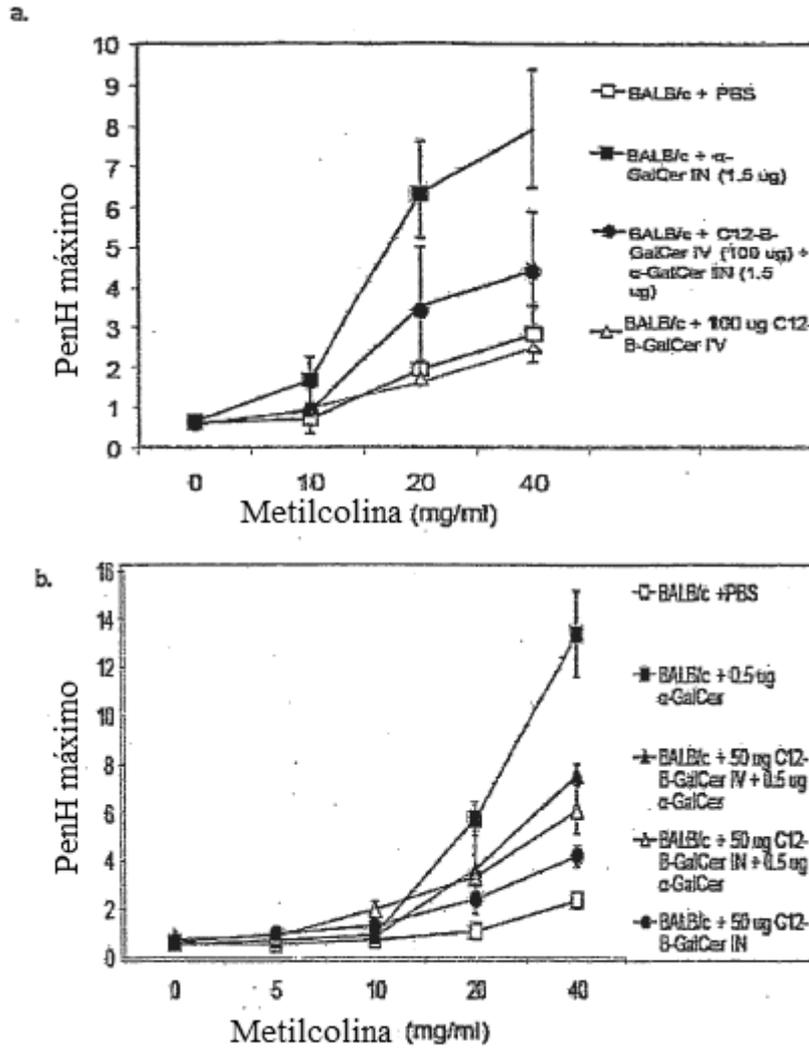


Figura 3

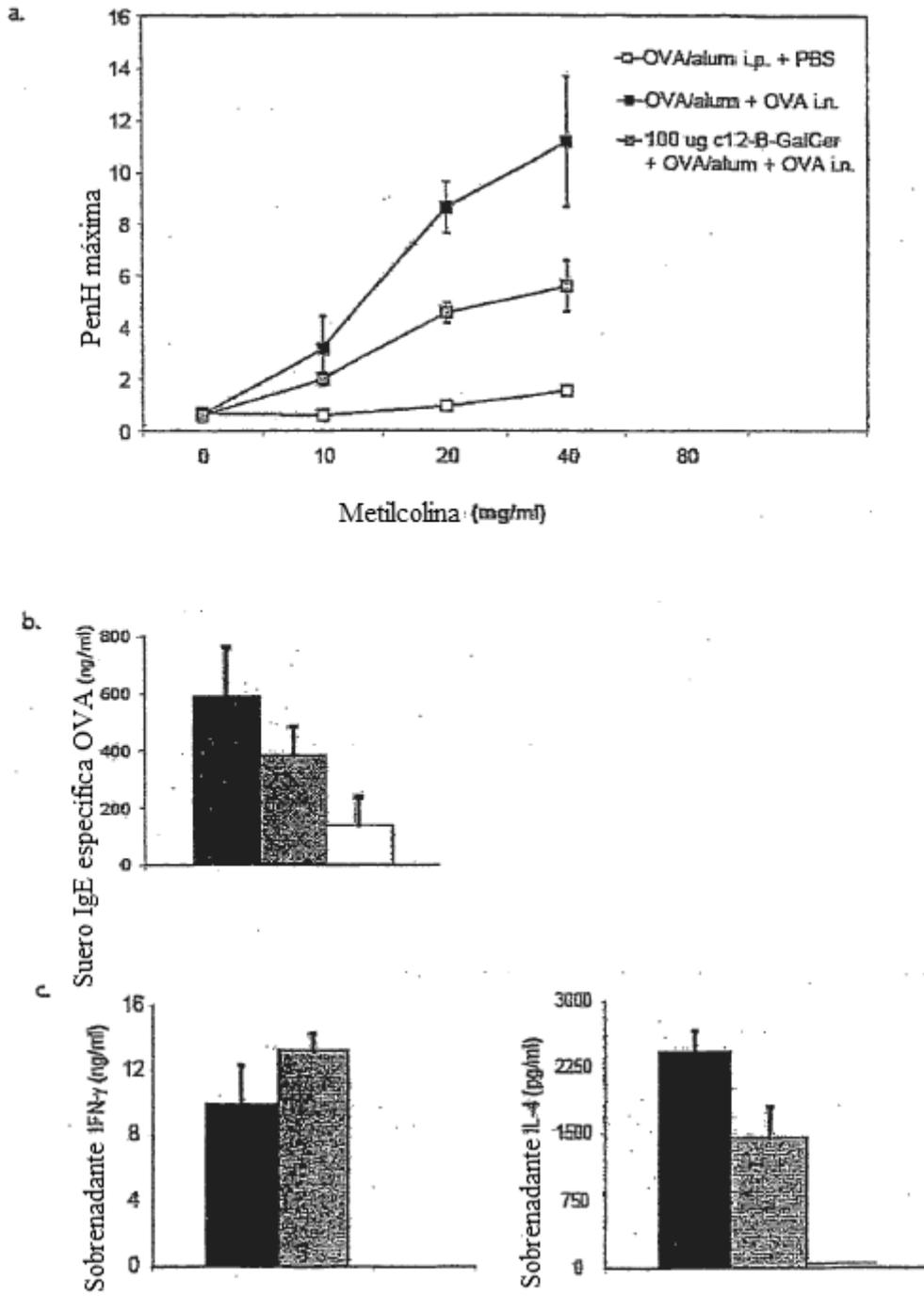


Figura 4

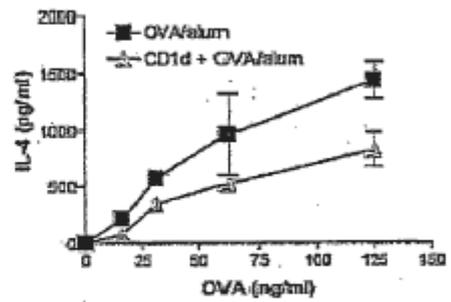
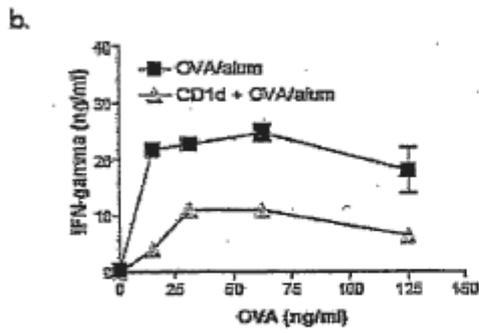
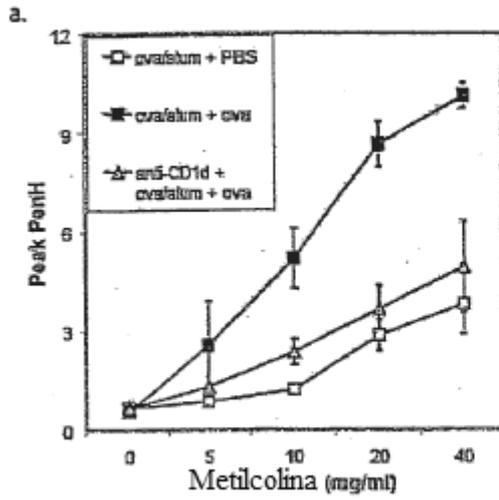


Figura 5

**Distribución de linfocitos NKT, 24 horas después de la administración oral de  $\beta$ -Galcer en ratones C57BL/6.**

**N = 2, Edad = 12 semanas**

