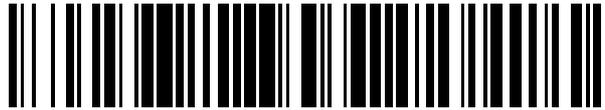


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 975**

51 Int. Cl.:

C07H 15/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2007 E 07760333 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2056842**

54 Título: **Galactosilceramida modificada para el tratamiento de enfermedades cancerosas**

30 Prioridad:

07.04.2006 US 790096 P

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

12.03.2013

73 Titular/es:

**THE SCRIPS RESEARCH INSTITUTE (33.3%)
10550 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037, US;
BRIGHAM YOUNG UNIVERSITY (33.3%) y
THE UNIVERSITY OF CHICAGO (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SAVAGE, PAUL, B.;
TEYTON, LUC y
BENDELAC, ALBERT**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 397 975 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

Galactosilceramida modificada para el tratamiento de enfermedades cancerosas.

5 Las células T asesinas naturales ("células NKT") constituyen una población de células de memoria de tipo innato/células efectoras que expresan tanto receptores de células asesinas naturales (NK) como receptores conservados semi-invariantes de células T (TCR), ($V\alpha 14$ - $J\alpha 18/V\beta \epsilon$ en ratones y $V\alpha 24$ - $J\alpha 18/V\beta 11$ en el hombre). Las células NKT se han visto implicadas en la supresión de la autoinmunidad y en el rechazo del injerto, en la mejora de la resistencia a los patógenos y en la mejora de la inmunidad tumoral.

10 Las células NKT reconocen antígenos lipídicos extraños y propios presentados por el elemento CD1d de la familia de las moléculas asociadas a las β_2 microglobulinas. Diversos lípidos con distintas estructuras han demostrado poder unirse a moléculas CD1d de una única forma que encaja una cadena de ácidos grasos en cada uno de los dos lugares (A' y F) de enlace hidrofóbico de la molécula CD1d. Las especies lipídicas capaces de unir moléculas CD1d incluyen ácidos micólicos, diacilgliceroles, esfingolípidos, poliisoprenoides, lipopéptidos, fosfomicoquetidos y pequeños compuestos hidrofóbicos. La conservación evolucionaria de las células NKT es sorprendente, pues las células NKT murinas reconocen la CD1d humana más el antígeno glicolípidos y viceversa.

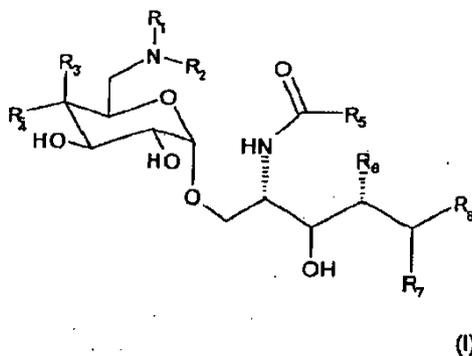
15 Las células NKT responden con una intensa producción de citoquinas a las horas de activación de TCR, liberando citoquinas de tipo T_{H1} , incluyendo IFN- γ y TNF, así como citoquinas de tipo T_{H2} , incluyendo IL-4 e IL-13. Así, las células NKT muestran una función dual: actúan como células inmunosupresoras mediante su producción de citoquinas tipo T_{H2} ; y actúan también como promotores inmunes para potenciar la inmunidad mediada celular mediante la producción de citoquinas de tipo T_{H1} .

20 Las células NKT se han estudiado, en primer lugar, en el contexto de la presentación de una α -galactosilceramida (α GC), denominada KRN7000, un glicolípidos que no se considera un antígeno natural para las células NKT. El aislamiento y cuantificación de las células NKT que responden a CD1d mediante citometría de flujo se ha llevado a cabo habitualmente utilizando tetrámeros CD1d marcados con fluorófonos, cargados con KRN7000, KRN7000 también se utiliza en estudios de las influencias de la estimulación de las células NKT en estados patológicos específicos. FUJI N. *et al.*, CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 6, n° 8, 2000, páginas 3.380-3.387 da a conocer que se informó que KRN7000 estimula las células NKT humanas de una forma CD1d dependiente y que la inmunoterapia que utiliza KRN7000 se espera que sea una modalidad adyuvante útil en el tratamiento del cáncer residual postoperatorio en humanos. Sin embargo, el aprovisionamiento de KRN7000, que deriva de una esponja marina, se ha limitado, teniendo este glicolípidos una solubilidad relativamente escasa en disolventes acuosos u orgánicos. LIU Y. *et al.*, JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 312, n° 1-2, 30, 2006, páginas 34-39 da a conocer que PBS-57 tiñe las células NKT murinas y humanas, tanto como KRN7000 y muestra una solubilidad relativamente alta, y que PBS-57 estimula las células NKT de modo más efectivo que KRN7000.

Sumario de la invención

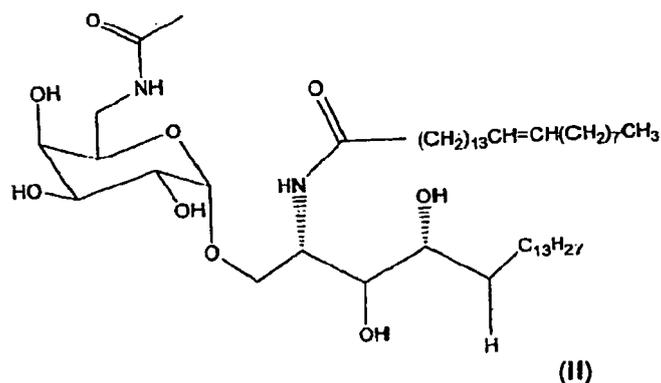
40 Se encontró que las α -galactosilceramidas modificadas que se describen en la aplicación estimulaban las células NKT de modo más efectivo que KRN7000, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, estas moléculas pueden mostrar un aumento en la solubilidad y una potenciación de la carga en los tetrámeros CD1d.

45 En un aspecto, la aplicación describe un compuesto representado por la fórmula estructural (I):



50 en la que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 se definen a continuación en la presente invención.

En otro aspecto, la aplicación describe un compuesto denominado "PBS-57", representado por la fórmula estructural (II)



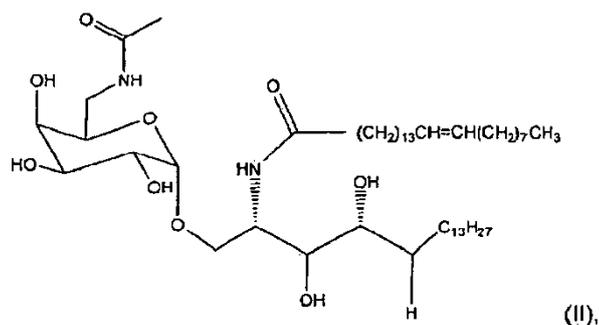
En otro aspecto, la aplicación describe un procedimiento para activar una células NKT, que incluye la puesta en contacto de la célula NKT con el compuesto de fórmula (1) en presencia de un monómero o tetrámero CD1d.

5 En otro aspecto, todavía, la aplicación describe un procedimiento para estimular una respuesta inmunitaria en un individuo. El procedimiento incluye una etapa de administración al individuo de una cantidad efectiva del compuesto de fórmula (1). Alternativamente, el procedimiento de estimulación de una respuesta inmunitaria en un individuo comprende una etapa de administración al individuo de una población de células NKT activadas mediante la puesta en contacto de éstas con el compuesto de fórmula (1) en presencia de una molécula CD1. Como tercera alternativa, el procedimiento de estimulación de una respuesta inmunitaria en un individuo comprende la administración al individuo de una población de células presentadoras del antígeno CD1 puestas en contacto con el compuesto de fórmula (1).

15 En otro aspecto, todavía, la aplicación describe una composición que comprende un compuesto de fórmula (1) y un vehículo fisiológicamente aceptable.

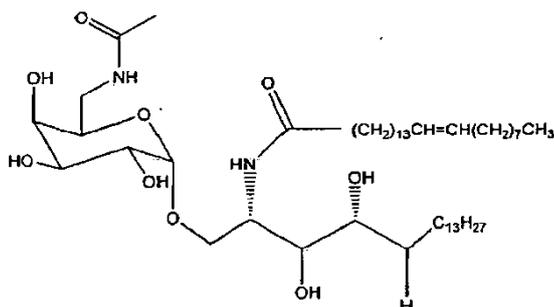
En otro aspecto, la aplicación describe un procedimiento para marcar una célula NKT en un medio, que comprende las etapas de formar un complejo de fórmula (1) con un tetrámero CD1d, poniendo en contacto el complejo con la célula NKT, eliminando el complejo no unido del medio, y detectando el complejo.

20 La presente invención se refiere a una composición que comprende un compuesto representado por la fórmula estructural (II)



25 un antígeno derivado de un tumor, y un vehículo fisiológicamente aceptable, para utilizarla en el tratamiento de enfermedades cancerosas, para la estimulación de una respuesta inmunitaria anti-tumoral.

La presente invención también proporciona un compuesto representado por la fórmula estructural (II):



y un antígeno derivado de un tumor,

5 como una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial, para uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas.

Descripción breve de las figuras

Las figuras 1A, 1B y 1C muestran un esquema sintético apropiado para PBS-57.

10 La Fig. 2 muestra las estructuras de un compuesto prototípico de la invención, denominado "PBS-57", y KRN7000.

La Fig. 3 muestra la tinción de las poblaciones celulares V α 14/NKT de un timo murino (A-C) y de células del bazo (D-F) con anti-TCR β -FITC y bien PBS-57 (C y F), KRN7000 (B y E) o sólo el vehículo (A y D).

15 La Fig. 4 muestra la unión de tetrámeros CD1d cargados con PBS-57 a progenies celulares de hibridomas NKT en el contexto de variantes V β TCR expresados por las células NKT. Los tetrámeros CD1d cargados con un glicolípido no estimulante (α -galactosicolesterol), se utilizó como un control negativo.

20 La Fig. 5 muestra la tinción de células NKT que responden a CD1d utilizando tetrámeros CD1d humanos y murinos cargados con PBS-57 en muestras sanguíneas humanas y de primates no humanos.

La Fig. 6 muestra la liberación de citoquinas a partir de esplenocitos B6 murinos estimulados con PBS-57 (cuadros negros) o KNR7000 (cuadros blancos).

25 La Fig. 7 muestra concentraciones séricas de INF- γ y de ratones a los que se inyectó intravenosamente con cantidades indicadas de glicolípidos PBS-57 (líneas negras) o KRN7000 (líneas blancas).

La Fig. 8 muestra estructuras para diversas formas de realización apropiadas de compuestos de la invención.

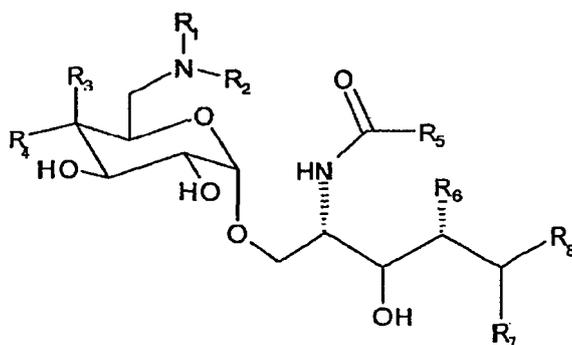
Descripción detallada de diversas formas de realización

30 En un esfuerzo para encontrar compuestos que activen las células NKT, los inventores han sintetizado y estudiado una serie de α -galactosilceramidas modificadas (" α GCs"). Como resultado de este trabajo, se determinó que una modificación apropiada en α GC des una adición de un doble enlace cis en la cadena acilo en la porción ceramídica del ácido graso. Se mostró que esta modificación aumentaba la solubilidad sobre los compuestos completamente saturados, facilitando la carga del glicolípido en el sitio de unión CD1d. Otra modificación apropiada reemplaza el grupo hidroxilo en la posición C6 de la galactosa en α GC con una amida unida a una pequeña molécula. Se encontró que estas modificaciones daban lugar a compuestos que conservan la capacidad de estimular la liberación histoquímica mediante las células NKT a niveles comparables a KRN7000.

40 Un compuesto prototípico de la invención, PBS-57 (que se muestra en la Fig. 1), que incluye las modificaciones anteriormente descritas, tiñe las células NKT humanas y murinas como KRN7000 y exhibe una solubilidad relativamente alta. Estudios *in vitro* e *in vivo* de las propiedades estimulantes de las células NKT de PBS-57 indicaron que éste estimula las células NKT más efectivamente que KRN7000.

45 Compuestos

Los compuestos que se describen en la aplicación son glicolípidos representados por la fórmula 1, que se muestra a continuación:



(I)

en la que:

R₁ es seleccionado de entre:

(i) C(O)R₁₃;

(ii) C(R₁₃)R₁₄, siendo R₁₄-H, o R₁₃ o R₁₄ y R₂ tomados conjuntamente forman un doble enlace entre los átomos de carbono y nitrógeno, a los que se unen; o

(iii) SO₂R₁₃;

siendo R₁₃ halo; hidroxilo; OR₉; OR₁₀; amino, NHR₉; N(R₉)₂; NHR₁₀; N(R₁₀)₂; aralquilamino; o C₁-C₁₂ alquilo sustituido excepcionalmente con halo hidroxilo, oxo, nitro, OR₉, OR₁₀ aciloxilo, amino, NHR₉, N(R₉)₂, NHR₁₀, N(R₁₀)₂, aralquilamino, mercapto, tioalcoxilo, S(O)R₉, S(O)R₁₀, SO₂R₉, SO₂R₁₀, NHSO₂R₉, NHSO₂R₁₀, sulfato, fosfato, ciano, carboxilo, C(O)R₉, C(O)R₁₀, C(O)R₉, C(O)NH₂, C(O)NHR₉, C(O)N(R₉)₂, C₃-C₁₀ cicloalquilo que contiene 0-3 R₁₁, C₃-C₁₀ heterociclo contenido 0-3 R₁₁, C₂-C₆ alqueno, C₂-C₆ alqueno, C₅-C₁₀ cicloalqueno, C₅-C₁₀ heterocicloalqueno, C₆-C₂₀ arilo que contiene 0-3 R₁₂ o heteroarilo que contiene 0-3 R₁₂; o C₃-C₁₀ cicloalquilo, C₃-C₁₀ heterociclo, C₅-C₁₀ cicloalqueno, o C₅-C₁₀ heterocicloalqueno sustituido opcionalmente con uno o más halo hidroxilo, oxo, OR₉, OR₁₀ aciloxi, nitro, amino, NHR₉, N(R₉)₂, NHR₁₀, N(R₁₀)₂, aralquilamino, mercapto, tioalcoxilo, S(O)R₉, S(O)R₁₀, SO₂R₉, SO₂R₁₀, NHSO₂R₉, NHSO₂R₁₀, sulfato, fosfato, ciano, carboxilo, C(O)R₉, C(O)R₁₀, C(O)OR₉, C(O)NH₂, C(O)NHR₁₀, C(O)N(R₁₀)₂, alquilo, haloalquilo, C₃-C₁₀ cicloalquilo contenido 0-3 R₁₁, C₃-C₁₀ heterociclo que contiene 0-3 R₁₁, C₂-C₆ alqueno, C₂-C₆ alqueno, C₅-C₁₀ cicloalqueno, C₅-C₁₀ heterocicloalqueno, C₆-C₂₀ arilo heteroarilo contenido 0-3 R₁₂ o C₆-C₂₀ heteroarilo que contiene 0-3 R₁₂; o C₂-C₆ alqueno, C₂-C₆ alqueno, arilo, o heteroarilo sustituido excepcionalmente con halo, hidroxilo, OR₉, OR₁₀ aciloxilo, nitro, amino, NHR₉, N(R₉)₂, NHR₁₀, N(R₁₀)₂, aralquilamino, mercapto, tioalcoxilo, S(O)R₉, S(O)R₁₀, SO₂R₉, SO₂R₁₀, NHSO₂R₁₀, sulfato, fosfato, ciano, carboxilo, C(O)R₉, C(O)R₁₀, C(O)OR₉, C(O)NH₂, C(O)NHR₉, C(O)N(R₉)₂, alquilo, haloalquilo, C₃-C₁₀ cicloalquilo que contiene 0-3 R₁₁, C₃-C₁₀ heterociclo que contiene 0-3 R₁₁, C₂-C₆ alqueno, C₂-C₆ alqueno, C₅-C₁₀ cicloalqueno, C₅-C₁₀ heterocicloalqueno, C₆-C₂₀ arilo que contiene 0-3 R₁₂ o C₆-C₂₀ heteroarilo que contiene 0-3 R₁₂;

R₂ es -H o C₁-C₆ alquilo;

R₃ es -H si R₄ es -OH, o R₃ es -OH si R₄ es -H;

R₄ es -H si R₃ es -OH, o R₄ es -OH si R₃ es -H;

R₅ es seleccionado de entre:

(i) -(CH₂)_xCH=CH(CH₂)_yCH₃, o

(ii) -(CH₂)_xCH=CH(CH₂)_yCH=CH(CH₂)_zCH₃, donde X, y y Z son enteros seleccionados independientemente de 1 a 14 aproximadamente;

R₆ es-OH o forma un enlace doble con R₇;

R₇ es -H o forma un doble enlace con R₆;

R₈ es un hidrocarburo saturado o insaturado que posee entre 5 a 15 átomos de carbono, aproximadamente,

cada R₉ es independientemente un C₁-C₂₀ alquilo sustituido opcionalmente con halo, hidroxilo, alcoxilo, amino, alquil amino, dialquilamino, sulfato o fosfato,

cada R₁₀ es independientemente un arilo sustituido opcionalmente con halo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato o fosfato;

cada R₁₁ es independientemente halo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, oxo, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato o fosfato, y

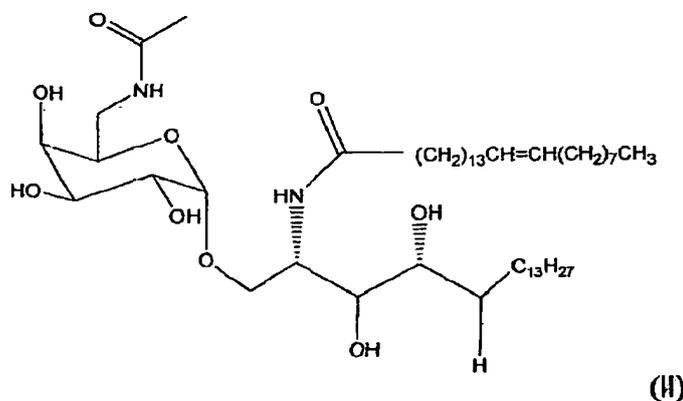
cada R₁₂ es independientemente halo, haloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato o fosfato.

En formas de realización particulares de compuestos de fórmula I, R₅ es (i), X es 13 e y es 7. En otras formas de realización apropiadas, R₁ es -CH₃. En otras formas de realización, todavía, R₁ es (i) y R₁₃ es -CH₃; R₅ es (i), y X es 13, e y es 7; R₆ es -OH; R₇ es -H; y R₈ es C₁₄H₂₉. En otras formas de realización si R₁ es (i), entonces R₁₉ no es -CH₃; si R₅ es (i), entonces X e y no son 13 y 7, respectivamente; R₆ no es -OH; R₇ no es -H; y R₈ no es C₁₄H₂₉. Estructuras para diversos ejemplos de compuestos que se describen en la aplicación, se muestran en la Figura 8.

Los términos utilizados en la descripción anterior de glicolípidos se definen de la forma siguiente:

- 5 El término "glicolípido" se refiere a cualquier compuesto que contenga uno o más residuos de monosacáridos (porción "glico"), unido mediante un enlace glicosídico a una mitad hidrofóbica tal como un acilglicerol, un esfingolípido, una ceramida (N-acilesfingolípido) o un pernil fosfato (porción "lipídica"). En formas de realización particulares, uno o más sacáridos se unen a una mitad ceramídica.
- El término "halo" o "halógeno", se refiere a cualquier radical de fluor, cloro, bromo o yodo.
- 10 El término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que puede ser recta o ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁-C₁₂ indica que el grupo puede tener inclusive entre 1 y 12 átomos de carbono en él. Los términos "arilarquilo" o "aralquilo", se refieren a una mitad alquilo en la que un átomo de hidrógeno alquilo es reemplazado por un grupo arilo, por ejemplo, los grupos bencilo o 9-fluorenilo. El término "alquilamino" y "dialquilamino" se refiere a los radicales -NH(alquilo) y -NH(alquilo)₂ respectivamente. El término "alcoxi" se refiere a un radical -O-alquilo. El término "mercapto" se refiere a un radical SH. El término "tioalcoxi" se refiere a un radical -S-alquilo.
- 15 El término "arilo" se refiere a un sistema de un hidrocarburo de anillo, aromático, mono, bi, o tricíclico en el que cualquier átomo cíclico capaz de sustitución puede sustituirse por un sustituyente, tal como, pero no limitado a fenilo, naftilo y antraceno.
- El término "cicloalquilo" tal como se utiliza en la presente memoria incluye grupos hidrocarburos cíclicos, bi, tri, o policíclicos que poseen de 3 a 12 carbonos en el que cualquier átomo cíclico capaz de sustitución puede ser sustituido por un sustituyente. Ejemplos de mitades cicloalquílicas incluyen, pero no se limitan a ciclohexilo y adamantilo.
- 25 El término "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico de 3-10 elementos, bicíclico de 8-12 elementos, o tricíclico de 11-14 elementos que posee 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionándose dichos heteroátomos de O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 ó 1-9 heteroátomos de N, O o S si son monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, respectivamente), donde cualquier átomo cíclico capaz de sustitución puede sustituirse por un sustituyente.
- 30 El término "cicloalqueno", tal como se utiliza en la presente memoria incluye grupos de hidrocarburos parcialmente insaturados, no aromáticos, cíclicos, bi o tricíclicos o policíclicos que poseen de 5 a 12 carbonos, preferentemente de 5 a 8 carbonos, donde cualquier átomo cíclico capaz de sustitución puede sustituirse por un sustituyente. Ejemplos de mitades cicloalquílicas incluyen, pero no se limitan a ciclohexeno, ciclohexadieno o norborneno.
- 35 El término "heterocicloalqueno" se refiere a un sistema de anillo parcialmente saturado, no aromático, monocíclico con 5-10 elementos, bicíclico con 8-12 elementos o tricíclico con 11-14 elementos, que posee 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionándose dichos heteroátomos que se seleccionan de O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 ó 1-9 heteroátomos de N, O o S si son monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, respectivamente en los que cualquier átomo cíclico capaz de sustitución, puede ser sustituido por un sustituyente.
- 40 La expresión "heteroarilo" se refiere a un sistema anular aromático monocíclico de 5-8 elementos, bicíclico de 8-12 elementos, o tricíclico de 11-14 elementos, que posee 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionándose dichos heteroátomos a partir de O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 ó 1-9 heteroátomos de N, O o S, si monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, respectivamente), donde cualquier átomo anular capaz de sustitución puede sustituirse por un sustituyente.
- 45 El término "oxo" se refiere a un átomo de oxígeno, que forma un carbonilo cuando se une al carbono, un N-óxido cuando se une a nitrógeno, y un sulfóxido o sulfona cuando se une a azufre.
- 50 El término "acilo" se refiere a un alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, arilcarbonilo heterociclilo carbonilo, cualquiera de los cuales puede sustituirse además por sustituyentes.
- 55 El término "sustituyentes" se refiere a un grupo "sustituido" en un alquilo, cicloalquilo, alqueno, heterociclilo, heterocicloalqueno, cicloalqueno, arilo o heteroarilo, en cualquier átomo de aquel grupo. Sustituyentes apropiados incluyen, sin limitación, alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, halo, hidroxilo, ciano, nitro, amino, SO₃H, sulfato, fosfato, perfluoroalquilo, perfluoroalcoxi, metilendioxilo, etilendioxilo, carboxilo, oxo, tioxi, imino (alquilo, arilo, aralquilo), S(O)_n alquilo (donde n es 0-2), S(O)_n arilo (donde n es 0-2), S(O)_n heteroarilo (donde n es 0-2), S(O)_n heterociclilo (donde n es 0-2), amino (mono-, di-, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, heteroaralquilo, y sus combinaciones), éster (alquilo, aralquilo, heteroaralquilo), amida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo y sus combinaciones), sulfonamida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo, y sus combinaciones), arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, heterociclilo no sustituido, y cicloalquilo no sustituido. En un aspecto, los sustituyentes en un grupo, son independientemente cualquiera de ellos, o cualquier subconjunto de los constituyentes mencionados anteriormente.
- 60
- 65

Un glicolípido de la invención particularmente apropiado, denominado "PBS-57" está representado por la fórmula estructural II:



5

Como con la mayoría de los glicolípidos, las cuestiones de solubilidad son cruciales para manejar los compuestos. Éstos se solubilizan habitualmente en DMSO, diluyéndose entonces a concentraciones apropiadas (para operar con ellas), en soluciones acuosas. Se ha mostrado que estos compuestos son más solubles en DMSO que KRN7000, dando lugar, por tanto, a concentraciones residuales bajas a DMSO en las soluciones operativas. En formas de realización apropiadas, los compuestos que se describen en la aplicación, son, por lo menos, de 10 mg/ml, en DMSO bajo condiciones ambientales (aproximadamente de 20°C). En formas de realización más apropiadas, los compuestos que se describen en la aplicación, son, por lo menos, de 20 mg/ml aproximadamente, en DMSO a temperatura ambiente. En otras formas de realización apropiadas, los compuestos que se describen en la aplicación, son, por lo menos, del 80% en ocasiones de magnitud doble, o, por lo menos, de 4 veces, con respecto a la solubilidad de KRN7000 en DMSO a temperatura ambiente.

En formas de realización particulares, los compuestos descritos en la aplicación, son capaces de unirse a un monómero o tetrámero CD1d. El monómero CD1d puede ser soluble, inmovilizarse sobre una superficie sólida, o expresarse en la superficie de una célula NKT. Los tetrámeros CD1d son bien conocidos y están disponibles comercialmente. Tal como se utiliza en la presente invención, "capaz de unirse a un monómero o tetrámero CD1d", significa que la capacidad del compuesto para unirse a CD1d en un ensayo de unión a un lípido, es decir, un ensayo competitivo de un glicolípidos cargado y de un control no cargado y la resolución de moléculas CD1 cargadas con el glicolípidos mediante IEF (electroforesis de focalización isoelectrónica), tal como se describe en Canti *et al.*, "The Paradox of Immune Molecular Recognition of α -Galactosylceramide: Low Affinity, Low Specificity for CD1d, High Affinity for α TCRs, Journal of Immunology, 2003, 170: p. 4673-4682, cuya exposición se incorpora como referencia a la presente memoria. Como se determina por la IEF, la unión del compuesto a las moléculas CD1d puede cuantificarse con respecto a la unión de un glicolípidos no cargado a las moléculas CD1d. El compuesto que se une a CD1d puede ser titulado a saturación y cuantificado a partir de geles IEF para determinar las constantes de la unión de equilibrio. Un compuesto se considerará capaz de unir una molécula CD1d si muestra una K_D menor que 1 mM cuando se determina utilizando el ensayo en Cantu *et al.*, anteriormente citado.

Se conocen otros procedimientos para evaluar la capacidad de un compuesto para unirse a un monómero o tetrámero CD1d, e incluyen, por ejemplo, cromatografía de filtración en gel, electroforesis en gel, resonancia plasmática superficial y ELISA. La unión puede evaluarse también tiñendo células NKT con compuestos acoplados con tetrámeros CD1d, tal como se describe en Liu *et al.*, J. Immun. Methods 2006, 312: 34-39.

Utilizando cualquier ensayo apropiado, la capacidad de un compuesto para unirse a las moléculas CD1d puede compararse con las capacidades de unión de KRN7000. De forma apropiada, el compuesto exhibe por lo menos el 80% de la capacidad de unión de CD1d de KRN7000, más preferentemente por lo menos del 90%, más preferentemente, por lo menos, de dos veces, más preferentemente por lo menos, de cuatro veces la capacidad de unión de CD1d de KRN7000.

En otras formas de realización, los compuestos que se definen en la aplicación, pueden activar una célula NKT. La activación de las células NKT puede evaluarse, por ejemplo, tal como se describe a continuación y en los ejemplos.

Procedimientos para activar las células NKT

"La estimulación de una célula NKT" y "la activación de una célula NKT" se utilizan de forma indistinta en la presente memoria para referirse a la inducción de un efecto observable en una célula NKT que está de acuerdo con una respuesta celular para la implicación del TCR de la célula NKT con un antígeno presentado en el contexto de la molécula CD1d. Los efectos observables de la activación de las células NKT incluyen la secreción de citoquinas, la

proliferación clonal y la regulación al alza de la expresión de los marcadores superficiales celulares, por ejemplo, las moléculas CD69, los receptores IL-12 y/o las moléculas CD40L. Para activar una célula NKT según estos procedimientos, la célula NKT se pone en contacto con un compuesto que se describe en la aplicación en presencia de un monómero o tetrámero CD1d. De forma apropiada, un compuesto tal como se describe en la aplicación, estimula una célula NKT cuando el compuesto se acompleja, o se une, a un monómero o tetrámero CD1d. La activación de la célula NKT proviene de la puesta en contacto TCR y la célula NKT con el complejo, provocando de este modo una respuesta observable, tal como, por ejemplo, una expresión alterada de la citoquina. "Un receptor celular T de una célula NKT", como el que se utiliza aquí, se refiere al TCR conservado y semi-invariante de las células NKT, que comprende, por ejemplo, V α 14-J α 18/V β 11 en el hombre y V α 14-J α 18/V β 8 en los ratones.

Tal como se utiliza en la presente memoria "poner en contacto con una célula NKT", se refiere a la adición *in vitro* de un compuesto tal como se describe en la aplicación, a células NKT en cultivo, en presencia, opcionalmente, de monómeros o tetrámeros de CD1d inmovilizados, solubles o insolubles, o células presentadoras de antígenos (APCs) que expresan moléculas CD1d, o a la administración *in vivo* de un compuesto tal como se describe en la aplicación a un individuo. El compuesto puede presentarse al TCR de la célula NKT mediante las moléculas CD1d en la superficie de las células presentadoras del antígeno (APC), tal como una célula dendrítica (DC) o macrófaga. Alternativamente, las células CD1d pueden sembrarse en placa y las células NKT y el compuesto tal como el descrito en la aplicación, pueden añadirse a las moléculas CD1d *in vitro*.

Ejemplos de citoquinas que pueden secretarse por las células NKT activadas tal como se describe en la aplicación pueden incluir, pero no se limitan a IL-10, IL-4 y IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α y TGF- β . Se aprecia que las combinaciones de cualquiera de las citoquinas anteriormente mencionadas pueden secretarse por las células NKT después de activarlas. Los procedimientos para detectar y medir los niveles de citoquinas secretadas son bien conocidos en la técnica. Como se apreciará, la evaluación de la activación de las células NKT se lleva a cabo apropiadamente midiendo la expresión de las citoquinas mediante las células NKT, con respecto a un control apropiado.

La proliferación de células NKT puede inducirse también contactando células NKT con uno o más de los compuestos que se dan a conocer en la aplicación. La proliferación se mide apropiadamente *in vitro* mediante procedimientos estándar, por ejemplo, ensayos de incorporación de H³-timidina o BrdU.

La regulación al alza de los marcadores celulares se observa también apropiadamente después de la activación de las células NKT. Por ejemplo, los receptores CD69, CD25, CD40L y IL-12 se regulan al alza después de la activación de las células NKT. Los procedimientos inmunológicos, tales como FACS, pueden utilizarse para detectar la regulación al alza de los marcadores superficiales celulares así como también de otros procedimientos que se utilizan habitualmente en la técnica. Los efectos a la baja de la activación de las células NKT, tal como la inducción de la maduración de DC, son también observables, por ejemplo, midiendo la regulación al alza de CD80 y/o CD-86 o DCs.

La activación *in vivo* y *ex vivo* de las células NKT, se contempla específicamente en la adición a la activación *in vitro*. La presentación de compuestos dados a conocer en la aplicación, a las células NKT en el contexto de moléculas CD1d da lugar a la activación de las células NKT y a la maduración de las células dendríticas. En consecuencia, estos compuestos estimulan respuestas inmunitarias contra antígenos nominales, así como contra agentes infecciosos y malignidades neoplásicas, incluyendo los tumores sólidos y los hematológicos. Tanto la inmunidad celular como la humoral, puede estimularse administrando compuestos agonistas de las células NKT, tal como se describe posteriormente a continuación.

Los procedimientos para estimular una célula NKT *in vivo*, es decir, en un individuo, incluyen la administración a éste de un compuesto agonista de la célula NKT. La administración a un individuo según algunos procedimientos que se describen en la aplicación, puede incluir, en primer lugar, la formulación del compuesto agonista de la célula NKT con un vehículo fisiológicamente aceptable y/o un excipiente, para proporcionar dosis deseadas, estabilidad, etc. Las formulaciones apropiadas para preparaciones vacunales y compuestos terapéuticos, son conocidos en la técnica. Los procedimientos para estimular una célula NKT *ex vivo* puede incluir la utilización de procedimientos adoptivos de transferencia que se basan en administrar células a las que se ha puesto en contacto con compuestos agonistas de células NKT *ex vivo* para estimular las células NKT en un individuo. En algunas formas de realización, las células pueden ser células NKT que son estimuladas *ex vivo* y que se inyectan en un individuo. En otras formas de realización, las células pueden ser APCs que se han puesto en contacto con compuestos descritos en la aplicación *ex vivo* para permitir la carga de las moléculas CD1d que se expresan con el compuesto para la presentación a las células NKT. Las células NKT estimuladas *ex vivo* o las APCs cargadas pueden administrarse entonces, por ejemplo, inyectándolas al individuo.

Procedimientos para estimular una respuesta inmunitaria

Algunas formas de realización que se dan a conocer en la solicitud proporcionan un procedimiento para estimular una respuesta inmunitaria en un individuo. Un "individuo" es un vertebrado, apropiadamente un mamífero, más apropiadamente un hombre. Como se apreciará, con propósitos de estudio, el individuo es apropiadamente un

modelo animal, por ejemplo, un ratón. “La estimulación de una respuesta inmunitaria”, incluye, pero no se limita, a la inducción de un efecto terapéutico o profiláctico que es mediado por el sistema inmune del individuo. Más específicamente, la estimulación de una respuesta inmunitaria en el contexto de la aplicación, se refiere a provocar una respuesta de la célula NKT en un individuo, mediante la administración de una cantidad efectiva de un compuesto al individuo tal como se describe en la aplicación, induciendo, por lo tanto, efectos tales como la producción de anticuerpos, el cambio del anticuerpo de tipo cadena pesada, la maduración de APCs, y la estimulación de las células T citotóxicas, de las células T colaboradoras, y de tanto las células de memoria T y B. Alternativamente, la estimulación de una respuesta inmunitaria en un individuo puede obtenerse administrando al individuo una población de células NKT que se activaron tal como se describe anteriormente, o una población de células presentadoras del antígeno CD1d+ que se pusieron en contacto con un compuesto tal como se describe en la aplicación. Adicionalmente, cualquier combinación de los procedimientos anteriores de estimulación de una respuesta inmunitaria, pueden ser apropiados.

En algunas formas de realización, la respuesta inmunitaria estimulada tal como se describe en la presente memoria, puede consistir en una respuesta inmunitaria antimicrobiana. Dicha respuesta inmunitaria promueve apropiadamente la depuración de un agente infeccioso o permite el control inmune del agente, de forma tal que los síntomas patológicos se reducen o desaparecen, por ejemplo, una infección persistente o latente.

En otras formas de realización, la respuesta inmunitaria que se potencia, puede ser una respuesta anticáncer o inmune antitumoral. Tal respuesta inmunitaria favorece apreciablemente el rechazo del tumor, reduce el volumen de éste, reduce su peso, evita las metástasis, y/o evita su recurrencia. El tumor puede ser cualquier tumor sólido o hematológico, incluyendo pero no limitándose a la leucemia, linfoma, cánceres relacionados con el SIDA, cáncer de huesos, cerebral, de mama, del sistema gastrointestinal, del sistema endocrino, ocular, tracto genitourinario, células germinales, órganos reproductivos, cabeza y cuello, sistema musculoesquelético, piel, sistema nervioso o respiratorio. Tal como se aprecia en la técnica, una respuesta cancerígena inmune específica puede monitorizarse mediante varios procedimientos, que incluyen: 1) medición citotóxica de las células efectoras utilizando, por ejemplo, un ensayo de liberación crónica; 2) medición de la secreción de citoquinas por células efectoras; 3) evaluación de las especificidades de los receptores de las células T (TCR), por ejemplo, utilizando multímeros MHC-péptidos; 4) midiendo la composición clonal de la respuesta de las células T; y/o 5) medir la degranulación de las células T.

Una respuesta inmunitaria potenciada es también evaluada apropiadamente mediante ensayos como, por ejemplo, la activación de las células NKT, induciendo la producción de citoquinas, la maduración de APCs, potenciando las funciones citotóxicas y de las células T auxiliares, potenciando el reclutamiento de las células CD8+ y CD4+, potenciando la producción de anticuerpos, induciendo el cambio de tipo de anticuerpos y la tolerancia a la ruptura.

La estimulación de una respuesta inmunitaria en un individuo tal como se describe en la presente memoria, puede llevarse a cabo administrando al individuo una composición que incluye un compuesto tal como se describe en la aplicación en algunas formas de realización, un antígeno. El compuesto y el antígeno puede o no inducir una respuesta inmunitaria que se potencia de forma detectable, cuando se administra independientemente a un individuo.

De forma apropiada, el compuesto y el antígeno se co-administran para estimular una respuesta inmunitaria en un individuo. El término “co-administración” significa que se hace referencia a cualquier protocolo de administración en el que un compuesto tal como se describe en la aplicación y un antígeno se administran a un individuo. El compuesto y el antígeno pueden estar en las mismas formulaciones de dosis o en formulaciones separadas. Si el compuesto y el antígeno están en formulaciones de dosis separadas pueden administrarse concurrentemente, simultánea o secuencialmente, (es decir, la administración de uno puede seguir directamente a la administración de los otros, o puede darse episódicamente, es decir, puede darse uno en un momento determinado, seguido por otro en un momento posterior, por ejemplo, en un plazo de una semana), siempre que se administran de forma suficiente para permitir que ambos alcancen cantidades terapéutica o profilácticamente efectivas en el individuo. El compuesto y el antígeno pueden también administrarse por varias vías, por ejemplo, uno puede administrarse intravenosamente, mientras que el segundo lo hace intramuscularmente, intravenosamente u oralmente.

En algunas formas de realización, el compuesto se añade apropiadamente a una composición vacunal o se co-administra con una composición vacunal. La adición de un compuesto tal como se describe en la aplicación, a una composición vacunal o la co-administración con una composición vacunal, puede ser particularmente apropiada en casos en los que el antígeno muestra una baja tasa de eficacia como vacuna, y/o debe administrarse en una cantidad o a una dosis superior a la que podría considerarse ideal debido a los efectos secundarios, coste y/o disponibilidad del antígeno, etc. Ejemplos de dichas vacunas pueden incluir, pero no se limitan a las vacunas del papilomavirus humano, vacuna de la otitis media aguda (PREVNAR®), vacunas de la gripe, vacunas del cólera y la vacuna telomérica del cáncer.

La administración a un individuo puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento apropiado, incluyendo la absorción intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transcutánea, oral, nasofaríngea o transmucosa, entre otras. De modo apropiado, un compuesto tal como se describe en la aplicación, se administra en una cantidad

efectiva para activar una célula NKT o células tales que en el individuo se alcanza un efecto profiláctico o terapéutico, por ejemplo, una respuesta inmunitaria antitumoral o una respuesta inmunitaria antimicrobiana.

La administración a un individuo incluye también la utilización de procedimientos adoptivos de transferencia, que se basan en la administración de células que se han puesto en contacto con un compuesto tal como se describe en la aplicación *ex vivo*, para estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en un individuo. En algunas formas de realización, las células pueden ser células NKT que se activan *ex vivo* y se inyectan en un individuo para proporcionar o potenciar una respuesta inmunitaria a, por ejemplo, células cancerosas o agentes infecciosos. En algunas formas de realización, las células pueden ser APCs que se han puesto en contacto con un compuesto tal como se describe en la aplicación, *ex vivo*, para permitir el acomplejamiento con las células CD1d expresadas por APC. Las células presentadoras de antígenos pueden ser administradas entonces por ejemplo, mediante inyección en el individuo, para proporcionar una respuesta inmunitaria apropiada. Este procedimiento de administración permite la estimulación de la respuesta inmunitaria con una expresión mínima del individuo o de las células de éste a los compuestos.

La administración de compuestos tal como se describe en la aplicación (a un individuo) tal como se describe en la presente memoria, parece mostrar efectos beneficiosos de forma dependiente de la dosis. Así, entro de límites se espera que la administración de cantidades más grandes de los compuestos active mayores números de células NKT, o active las células NKT a un grado superior del que lo hace la administración de una cantidad más pequeña. Además, la eficacia se contempla también a dosis por debajo del nivel al que se aprecia toxicidad.

Se apreciará que la dosis específica administrada en cualquier caso dado, se ajustará según el compuesto a compuestos que se administren, la patología que va a tratarse o prevenirse, la situación del individuo, y otros factores médicos importantes que pueden modificar la actividad del compuesto o la respuesta del individuo, como es bien conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la dosis específica para un paciente particular depende de la edad, peso corporal, estado general de salud, dieta, el ritmo y el modo de administración, la tasa de excreción, los medicamentos utilizados en combinación y la gravedad de la alteración particular a la que se aplica la terapia. Las dosis para un paciente dado pueden determinarse utilizando consideraciones convencionales, por ejemplo, mediante la comparación habitual de las actividades diferenciales del compuesto de la invención, y de un agente conocido tal como α GalCer, mediante un protocolo farmacológico o profiláctico convencional apropiado.

La dosis máxima para un individuo es la dosis más alta que no causa efectos secundarios intolerables o indeseables. El número de variables con respecto a un régimen de tratamiento o profiláctico individual es grande, esperándose un número considerable de dosis. Se anticipa que las dosis del compuesto tal como se describe en la presente memoria evitarán o reducirán los síntomas de por lo menos el 50%, comparados con los síntomas de pre-tratamiento, contemplándose específicamente que las preparaciones vacunales y las composiciones como las que se dan a conocer en la presente memoria, pueden paliar o aliviar síntomas de la enfermedad, sin proporcionar una cura, o, en algunos formas de realización, pueden utilizarse para curar o prevenir la enfermedad o alteración.

Cantidades apropiadas de dosis efectivas para la administración de los compuestos, pueden determinarse por los expertos en la materia, pero, típicamente, son del orden de 1 microgramo a 10.000 microgramos por kilo de peso corporal, semanalmente, aunque, en este tiempo, son típicamente del orden, aproximadamente de 1.000 microgramos o menos por kilogramo de peso corporal. En algunas formas de realización, la cantidad efectiva de la dosis es del orden de entre 10 y 5.000 microgramos aproximadamente por kilogramo semanalmente de peso corporal. En otra forma de realización, la cantidad efectiva de dosis es del orden de entre 50 y 1.000 microgramos aproximadamente, por kilogramo, de peso corporal, semanalmente. En otra forma de realización, la cantidad de dosis efectiva es del orden de entre 75 a 500 microgramos aproximadamente por kilogramo de peso corporal, semanalmente. Las cantidades eficaces de dosis en la presente memoria, se refieren a las cantidades totales administradas, es decir, si se administra más de un compuesto, las cantidades efectivas de dosificación corresponden a la cantidad total administrada. El compuesto puede administrarse como una dosis semanal única, o como dosis divididas.

En algunas formas de realización, un antígeno tumoral y el compuesto, se co-administran a un individuo, para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral en el individuo. De modo apropiado, la co-administración del antígeno con el compuesto, potencia la respuesta anti-tumoral y da lugar a la inhibición del crecimiento tumoral, la reducción en el peso tumoral y el tratamiento del cáncer, tal como se describe anteriormente.

Composiciones

Los compuestos que se describen en la solicitud, tal como se ha descrito antes, se incluyen apropiadamente en una composición con un vehículo fisiológicamente aceptable. Un vehículo "fisiológicamente estable" es cualquier vehículo que sea apropiado para la administración *in vivo* (por ej., oral, transdérmica o parenteral) o las utilización *in vitro*, es decir, el cultivo celular. Vehículos apropiados fisiológicamente aceptables para la administración *in vivo* incluyen agua, soluciones tampón y soluciones de glucosa, entre otras. Un vehículo apropiado para el cultivo celular es un medio celular disponible comercialmente. Componentes adicionales de las composiciones pueden incluir apropiadamente excipientes tales como estabilizantes, conservantes diluyentes, emulsificantes o lubricantes,

además del vehículo fisiológicamente aceptable y de uno o más compuestos de la invención. En particular, excipientes apropiados incluyen, pero no se limitan a Tween 20, DMSO, sacarosa, L-histidina, polisorbato 20 y suero.

5 De forma apropiada, las composiciones que incluyen compuestos que se describen aquí, pueden formularse para uso *in vivo*, es decir, la administración terapéutica o profiláctica de un individuo. En algunas formas de realización, las composiciones se formulan para la administración parental. Una forma de dosis apropiada para la administración parental, es un inyectable. Una forma de dosificación inyectable puede consistir en una solución isotónica o en una
10 suspensión, y puede prepararse utilizando un agente apropiado de dispersión, un agente humectante o un agente de suspensión, tal como se conoce en la técnica. En otras formas de realización, las composiciones se formulan para administración oral. Formas apropiadas de dosificación oral incluyen comprimidos, cápsulas, jarabes, pastillas y obleas entre otras. Las formulaciones de dosificación oral incluyen apropiadamente lactosa, almidón, derivados de la celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, glicoles y otras. Se apreciará que las composiciones que se describen en la presente memoria no se limitan a cualquier forma de dosificación ejemplificada, sino que pueden
15 formularse de alguna forma descrita en la técnica, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Marck Publishing Co., (2000), que se incorpora en la presente memoria como referencia.

Además del compuesto que se describe en la presente memoria, y de un vehículo fisiológicamente aceptable, algunas formas de realización que se dan a conocer en la presente memoria, incluyen además monómeros o
20 tetrámeros CD1d. En estas composiciones una porción, por lo menos, del compuesto que se encuentra en la composición, se une a, por lo menos, una porción de los monómeros o tetrámeros CD1d, opcionalmente, pueden optimizarse cantidades de moléculas CD1d y la concentración del compuesto que se describe en la aplicación, de tal forma, que sustancialmente, todas las moléculas CD1d en la composición se unen por el compuesto que se describe en la aplicación.

25 En otras formas de realización, el compuesto que se describe en la presente memoria (o el compuesto unido por un monómero o tetrámero) y un antígeno, se co-formulan apropiadamente en una composición. Los antígenos incluidos en la composición pueden ser mitades polipeptídicas o de hidratos de carbono, o sus combinaciones, por ejemplo, glicoproteínas. El antígeno puede derivarse de un agente infeccioso (por ejemplo, un microorganismo patogénico), un tumor, una molécula endógena (por ejemplo una molécula "propia"), o, con propósitos de estudio, un antígeno nominal, tal como la ovoalbúmina. La composición puede formularse asimismo como una vacuna, utilizando diversos procedimientos de preparación conocidos por los expertos en la materia. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Marck Publishing Co., (2000), que se incorpora en la presente memoria como referencia.

35 En algunas formas de realización, los antígenos para inclusión en las composiciones que se dan a conocer en la aplicación, se derivan apropiadamente de agentes infecciosos que se eliminaron o atenuaron. Se entenderá que los micro-organismos enteros o sus porciones (por ejemplo, imágenes secundarias de membrana, preparaciones en bruto de ésta, lisados y otras preparaciones del microorganismo), pueden incluirse apropiadamente como un antígeno. Agentes infecciosos apropiados, a partir de los cuales puede derivarse un antígeno, incluyen, pero no se limitan, a virus patogénicos y microorganismos. En algunos contextos, se obtienen o derivan antígenos apropiados de un patógeno vírico que está asociado con enfermedades humanas, que incluye, pero no se limitan a SIDA (Retroviridos, por ejemplo, moléculas gp120 para aislamientos HIV-1 y HIV-2, HTLV-1, HTLV-11), virus de la gripe (ortomixoviridos, por ejemplo, tipos A, B y C), herpes (por ejemplo, virus del herpes simple, glicoproteínas gB, gD y gH de HSV-1 y HSV-2), infecciones por rotavirus (Reoviridos), infecciones respiratorias (virus de parainfluenza y
45 sinucial respiratoria), Poliomiélitis (Picomaviridos, por ejemplo, poliovirus, runovirus), sarampión y paperas, (Paramixoviridos), Rubéola (Togaviridos, por ejemplo, virus de la Rubeola), hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis tipo A, B, C, D, E y/o G), citomegalovirus (por ejemplo, gB y gH, gastroenteritis (Caliciviridos), fiebre amarilla y del oeste del Nilo (Flaviviridos), Rabia (Rhabdoviridos), fiebre hemorrágica coreana (Bunyaviridos), fiebre de Venezuela (Arenaviridos), verrugas (Papilomavirus) virus de la inmunodeficiencia de los simios, virus de la encefalitis, virus varicella zoster, virus Epstein-Barr y otras familias de virus, incluyendo Coronaviridos, Birnaviridos y
50 Filoviridos.

Antígenos bacterianos apropiados y parásitos puedan obtenerse también o derivarse de agentes bacterianos conocidos responsables de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a difteria, tos ferina, tétanos, tuberculosis, neumonía bacteriana o fúngica, otitis media, gonorrea, cólera, tífus, meningitis, mononucleosis, peste, sigelosis o salmonelosis, enfermedad del Legionario, enfermedad de Lyme, lepra, malaria, anquilostomosis oncocercosis, esquistosomiasis, tripanosomiasis, leishmaniasis, giardiasis, amebiasis, filariasis, Borrelia y triquinosis. Pueden obtenerse o derivarse todavía otros antígenos de patógenos no convencionales, tales como los agentes que causan el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), encefalopatía esponjiforme ovina, encefalopatía transmisible del visón y enfermedades crónicas consuntivas, o de partículas infecciosas proteínicas tales como priones que están asociados con la enfermedad de las vacas locas.

65 Patógenos específicos de los que pueden derivarse antígenos incluyen *M. tuberculosis*, *Chlamydia*, *N.gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Uersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A y B), pneumococcus, meningococcus, *Haemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*,

Moraxella catarrhalis, donovanosis, y actinomicosis; los patógenos fúngicos incluyen candidiasis y aspergilosis; patógenos parásitos incluyen Taenia, helmintos, nematodos, amebiasis, giardiasis, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, tricomoniasis y triquinosis. La presente memoria puede también utilizarse para proporcionar una respuesta inmunitaria apropiada contra numerosas enfermedades veterinarias, tales como glosopeda, coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter*, *Strongylus vulgaris*, *Actinobacillus pleuroneumonia*, virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, y *Bordetella pertussis*, *parapertussis* y *brochiseptica*.

En algunas formas de realización, los antígenos para la inclusión en las composiciones que se describen en la presente memoria son antígenos apropiadamente derivados de tumores, o células tumorales enteras autólogas o alogénicas. De forma apropiada, el antígeno tumoral es un antígeno tumoral específico (TSA) o un antígeno asociado a un tumor (TAA). Varios antígenos tumorales y sus patrones de expresión se conocen en la técnica y pueden seleccionarse basándose en el tipo tumoral que va a tratarse. Ejemplos no limitantes de antígenos tumorales incluyen cdk-4 (melanoma), β -catenina (melanoma), caspasa-8 (carcinoma de células escamosas), MAGE-1 y MAGE-3 (melanoma, mama, glioma), tirosinasa (melanoma), idiotipo superficial Ig (ejemplo, BCR) (linfoma). Her-2/neu (mama, ovario), MUC-1 (mama, pancreático) y HPV E6 y E7 (carcinoma cervical). Antígenos tumorales apropiados adicionales incluyen antígeno específico prostático (PSA), siálil Tn (STn), proteínas de choque térmico, y péptidos tumorales (por ejemplo, gp 96), moléculas gangliósidas (por ej., GM2 y GD3), antígeno carcinoembrionario (CEA) y MART-1.

20 Marcaje de células NKT

En otra forma de realización, la aplicación da a conocer un procedimiento para marcar las células NKT en un medio. El procedimiento puede utilizarse para identificar células NKT en un medio, de otros tipos celulares. En una primera etapa, un compuesto que se describe en la presente memoria, forma complejo con el tetrámero CD1d soluble. El tetrámero se marca apropiadamente. Una "marca", tal como se utiliza en la presente memoria, es cualquier entidad que puede ensayarse. Marcas apropiadas incluyen, pero no se limitan, a estreptavidina, biotina y fluoróforos, tales, por ejemplo como PE o FITC. Las células NKT se marcan poniéndolas en contexto con el compuesto marcado complejo tetramérico CD1d en un medio apropiado. Un medio apropiado puede ser solución salina de fosfato tamponada (PBS) o medio celular comercialmente disponible, tal como se conoce en la técnica. Los complejos de glicolípidos no unidos (tetrámeros pueden eliminarse de los medios mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, lavado y centrifugación de las células y remoción del medio. Las células marcadas con el complejo se pueden detectar mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ayudar a un conocimiento ulterior de la invención. Los materiales particulares y las condiciones utilizadas tienen la intención de ilustrar posteriormente la invención y no limitan su alcance razonable.

40 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Síntesis de PBS-57 y solubilidad

Se sintetizó PBS-57 tal como se muestra en la Fig. 1. Los reactivos que corresponden a la Fig. 1A son los siguientes (rendimientos entre paréntesis): (a) PPh_3 , DPPA, DIAD (79%). (b) Cal, MeOH (81%). (c) BnBr, NaH, DMF (47%). (d) AcOH, HCl (69%). (e) DAST, CH_2Cl_2 (87%). Los reactivos que corresponden a la Fig. 1B son los siguientes (rendimientos entre paréntesis): (a) ácido nervónico, DCC, NHS, THF; Ac_2O , Et_3N , DMAP, (48%). (b) MeONa, MeOH, (71%). (c) cloruro de dimetilhexilsililo, pirimidina; Ac_2O , DMAP, (80%). (d) THF, HF, (83%). Los reactivos que corresponden a la Fig. 1C son los siguientes (rendimientos entre paréntesis): (a) AgClO_4 , SnCl_2 , CH_2Cl_2 , (56%). (b) $\text{PPh}_3/\text{H}_2\text{O}$, THF. (c) Ac_2O , piridina, DMAP, (80% del total). (d) Na° , NH_3 , -78°C (47%).

La preparación de los intermediarios en la vía sintética que se muestra en la Fig. 1, se describe a continuación.

Preparación de 2: El compuesto 1 (3,00 g, 11,3 mmol) se disolvió en THF seco (20 ml), se enfrió a 0°C , añadiéndose a la solución PPh_3 (5,95 g, 22,6 mmol), seguido por DIAD (5 ml, 22,6 mmol), DPPA entonces (3,7 ml, 22,6 mmol). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla se concentró bajo presión reducida, disolviéndose entonces en EtOAc (200 ml), lavada con HCl al 5% (80 ml), se continuó lavando con NaHCO_3 saturado, concentrándose los extractos al vacío, y se purificó el producto mediante cromatografía en columna (SiO_2 , 1:5 EtOAc, hexanos), dando lugar a un material de vidrio claro (2,61 g, rendimiento del 79%), RMN (^1H , CDCl_3) d 5,55 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 4,63 (dd, J = 2,5, 8,0 Hz, 1H), 4,34 (dd, J = 2,5, 5,0 Hz, 1H), 4,20 (dd, J = 2,0, 8,0 Hz, 1H), 3,93-3,90 (m, 1H), 3,51 (dd, J = 9,0, 12,5 Hz, 1H), 3,36 (dd, J = 5,5, 13,0 Hz, 1H), 1,55 (s, 3H), 1,46 (s, 3H), 1,34 (s, 3H); ^{13}C RMN (500 Hz, CDCl_3) d 109,8, 108,9, 96,5, 77,2, 77,0, 67,17, 50,8, 26,2, 26,1, 25,1, 24,6.

Preparación de 4: El compuesto 2 (3,71 g, 13,0 mmol), se disolvió en MeOH (40 ml), se enfrió a 0°C , añadiéndose Cal (8,6 ml), se dejó que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente, agitándose entonces por la noche. Se eliminó el disolvente bajo presión reducida, purificándose el residuo mediante cromatografía (SiO_2 , 10% MeOH y

CH₂Cl₂), lo que produjo el compuesto 3 (como mezcla anómeros), como un sólido blanco (2,31 g, rendimiento del 81%). A una solución del 3 (1,5 g, 6,9 mmol) en DMF (60 ml) se añadió hidruro sódico en aceite (1,26 g, 60% en aceite mineral). La mezcla se agitó durante 5 min a 0°C, añadiendo entonces, gota a gota, bromuro de bencilo (4,9 ml, 41,4 mmol). Se continuó la agitación durante 12 horas a temperatura ambiente, añadiéndose entonces metanol (10 ml). Se eliminó el disolvente al vacío y el sólido resultante se disolvió/suspendió en CH₂Cl₂. Se lavó la mezcla con 2 M HCl y agua, se secó en (Na₂SO₄) y se concentró. La cromatografía en columna (SiO₂, EtOAc: hexanos 1:6), dio el producto 4 como un material de vidrio claro (1,6 g, 47% de rendimiento), RMN (¹H, CDCl₃) δ 7,40-7,25 (m, 15H), 5,02-4,62 (m, 7H), 4,14-3,76 (m, 4H), 3,57-3,48 (m, 1H), 3,39 (s, 3H), 2,94 (dd, J = 2,4, 4,4 Hz, 1H); RMN (¹³C, CDCl₃) δ 138,65, 138,58, 138,34, 128,68, 128,61, 128,32, 128,12, 128,01, 128,87, 127,78, 99,01, 79,16, 76,48, 75,45, 74,81, 73,69, 69,98, 55,71, 51,61; HRFAB-MS (triglicerol + H⁺ matriz) m/e [(M + H)⁺] 490,2347 calcd 490,2342.

Preparación de 5: El compuesto 4 (1,6 g, 3,2 mmol) se disolvió en ácido acético: 6M HCl (50 ml; 7 ml). La mezcla se agitó a 85°C durante 1 hora, y la solución se concentró bajo presión reducida. Se extrajo el producto con cloroformo (100 ml) y se lavó con agua fría (2 x 50 ml), secándose los extractos combinados sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío. Después de la cromatografía (SiO₂, EtOAc: hexano 1:4), se obtuvo el compuesto 5 (1,0 g, 69% de rendimiento) como un aceite claro RMN (¹H, CDCl₃) δ 7,39-7,28 (m, 15H), 6,38 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 5,02-4,58 (m, 6H), 4,17 (dd, J = 11,0, 4,0 Hz, 1H), 3,91-3,88 (m, 3H), 3,47 (dd, J = 12,5, 7,0 Hz, 1H), 3,15 (dd, J = 12,5 Hz, 1H), 2,12 (s, 3H); RMN (¹³C, CDCl₃) δ 169,55, 138,59, 138,13, 138,00, 128,68, 128,62, 128,57, 128,56, 128,53, 128,51, 128,18, 128,13, 128,10, 128,03, 127,98, 127,85, 127,79, 127,60, 90,65, 78,67, 75,45, 75,31, 74,95, 74,69, 74,60, 74,42, 73,57, 73,53, 71,89, 50,85, 21,28; HRFAB-MS (matriz de tioglicerol + Na⁺) m/e [(M + Na)⁺] 540.2112 (100%), calcd 540.2111.

Preparación de 6: El compuesto 5 (3,09 g, 5,7 mmol) se disolvió en 200 ml de CH₂Cl₂, seguido por la adición gota a gota de DAST (0,906 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de que la reacción se templara con agua (30 ml). Se diluyó entonces la mezcla con CH₂Cl₂ y se lavó con agua y salmuera, secándose entonces la capa orgánica y concentrada al vacío. El producto deseado (2,7 g, 87% de rendimiento), se obtuvo como un aceite claro después de cromatografía (SiO₂, EtOAc:hexanos 1:6). RMN (¹H, CDCl₃) δ 7,40-7,25 (m, 15H), 5,63 (dd, J = 54,0, 2,5 Hz, 1H), 5,00 (d, J = 11,5 Hz, 1H) 4,88-4,72 (m, 4H), 4,61 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 4,01-3,88 (m, 4H), 3,51 (dd, J = 12,5 Hz, 1H), 3,13 (dd, J = 12,0, 6,0 Hz, 1H); RMN (¹³C, CDCl₃) δ 138,38, 138,09, 138,07, 128,74, 128,71, 128,66, 128,56, 128,23, 128,20, 128,16, 128,04, 127,80, 107,12, 105,32, 78,45, 75,85, 75,67, 74,99, 74,48, 73,99, 72,67, 72,14, 72,11, 50,96; HRFAB-MS (matriz de tioglicerol + Na⁺) m/e [(M + Na)⁺], 500.1956 (100%), calcd 500.1962.

Preparación de 8: el ácido nervónico (3,0 g, 8,2 mmol) se disolvió en THF anhidro (100 ml) a 5°C, seguido por NHS (1,88 g, 16,3 mmol) y DCC (3,38 g, 16,3 mmol). Se calentó la mezcla hasta reflujo durante 2 horas. Se añadió fitesfingosina disuelta en THF y piridina a la mezcla reactiva y se sometió a reflujo durante 12 h. Se añadió anhídrido acético (9 ml), seguido por trietilamina (9 ml), DMAP (300 mg), agitándose la mezcla durante 2 horas. Se eliminó el disolvente al vacío. El triacetato 7 (3,4 g, 48,6% rendimiento) se aisló mediante cromatografía (SiO₂, EtOAc: hexano 1:8). A MeOH se añadió metal sódico (230 mg, 10 mmol) (100 ml). Se añadió triacetato 7 (3,4 g, 4,4 mmol), agitándose la mezcla durante 1 hora, y centrifugándose entonces (3.000 rpm, 5 m), para dar lugar a un sólido blanco. El sobrenadante se eliminó y el sólido se enjuagó con MeOH fresco (80 ml), para eliminar cualquier base que hubiera quedado. Después de eliminar el sobrenadante, el sólido blanco en bruto (2,1 g, 71%) se secó al vacío. RMN (¹H, CDCl₃) δ 6,14 (d, J = 9,5, 1H), 5,34 (m, 2H), 5,12 (dd, J = 3, 8,5 Hz, 1H), 4,93 (m, 1H), 4,50 (m, 1H), 4,29 (dd, J = 5, 11,5 Hz, 1H), 4,0 (dd, J = 3,0, 11,5 Hz, 1H), 2,21 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,08 (s, 3H), 2,05-1,99 (m, 10H), 1,66-1,60 (m, 4H), 1,33-1,22 (m, 56H), 0,89 (t, J = 7,0 Hz, 6H); RMN (¹³C, CDCl₃) δ 178,25, 173,19, 171,31, 170,99, 170,20, 129,99, 73,15, 71,92, 63,05, 60,52, 47,50, 36,81, 34,11, 32,05, 29,91, 29,83, 29,80, 29,74, 29,67, 29,51, 29,45, 29,39, 29,26, 28,10, 27,33, 25,80, 25,68, 24,92, 22,82, 21,13, 20,88, 20,84, 14,30, 14,24. HRFAB-MS (matriz de tioglicerol + Na⁺) m/e [(M + Na)⁺] 814.6526, calcd 814.6537.

Preparación de 10: Se disolvió triol 8 (2,1 g, 3,09 mmol) en piridina (15 ml), añadiéndose cloruro de dimetilhexilsililo (0,606 ml, 3,09 mmol). Después de 5 minutos, se añadieron anhídrido acético (1,16 ml, 12,3 mmol) y DMAP (200 mg), agitándose la mezcla durante 2 horas. La purificación cromatográfica (SiO₂, EtOAc:Hex 1:20) produjo 9 (2,0 g, 80% rendimiento), como un aceite claro. El compuesto 9 (2,0 g, 2,4 mmol) se disolvió en THF (5 ml) en un tubo de centrifuga ((de plástico), seguido por la adición de HF acuoso (5 ml). Después del cumplimiento de la reacción, la mezcla se vertió en NaHCO₃ (80 ml), extrayéndose entonces con EtOAc (100 ml x 2). La capa orgánica se secó y concentró, y se purificó entonces mediante cromatografía (SiO₂, EtOAc: Hexano 1:2), para obtener el producto 10 como un sólido blanco (1,5 g, 83%). (¹H, CDCl₃) δ 6,66 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 5,34 (t, J = 1,0 Hz, 1H), 5,10 (dd, J = 2,0, 9,0 Hz, 1H), 4,95-4,92 (m, 1H), 4,20-4,14 (m, 1H), 3,61-3,56 (m, 2H), 2,22 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 2,13 (s, 3H), 2,04-1,99 (m, 7H), 1,68-1,60 (m, 4H), 1,34-1,22 (m, 56H), 0,89-0,86 (m, 6H), RMN (¹³C, CDCl₃) δ 173,44, 171,52, 171,45, 130,08, 73,54, 72,49, 61,61, 49,74, 36,93, 32,15, 32,13, 29,94, 29,90, 29,84, 29,78, 29,76, 29,64, 29,56, 27,87, 27,42, 25,97, 25,93, 22,91, 21,27, 21,09, 14,26. HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na⁺) m/e [(M + Na)⁺] 772.6429, calcd 772.6431.

Preparación de 11: El compuesto 6 (112 mg, 0,21 mmol) y el compuesto 10 (75 mg, 0,10 mmol), se disolvieron en CH₂Cl₂ (15 ml), añadiéndose filtros moleculares de 4 Å (900 mg). La mezcla se enfrió a 0°C, se agitó durante 10 minutos y se introdujeron AgClO₄ (62 mg, 0,30 mmol) y SnCl₂ (57 mg, 0,30 mmol). La mezcla se dejó calentar a

temperatura ambiente, agitándose durante 3 horas, filtrándose entonces con celita y lavándose con CH_2Cl_2 . El filtrado combinado se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía (SiO_2 , EtOAc: hexanos 1:7) para dar 11 (68 mg, 56% de rendimiento). RMN (^1H , CDCl_3) δ 7,42-7,19 (m, 15H), 6,67 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 5,37-5,33 (m, 2H), 5,24-5,22 (m, 1H), 4,98 (dd, $J = 11,0$ Hz, 3,0, 1H), 4,93 (dt, $J = 10,5$ Hz, 3,0 Hz, 1H), 4,86-4,55 (m, 6H), 4,37-4,31 (m, 1H), 4,03 (dd, $J = 10,5$ Hz, 3,0 Hz, 1H), 3,92-3,77 (m, 4H), 3,60-3,56 (m, 2H), 3,05 (dd, $J = 4,5$ Hz, 12,5 Hz, 1H), 2,14 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 2,06-2,00 (m, 10H), 1,67-1,69 (m, 4H), 1,38-1,25 (m, 56H), 0,91-0,87 (m, 6H); RMN (^{13}C , CDCl_3) δ 173,20, 171,22, 170,38, 138,76, 138,40, 138,23, 130,14, 128,78, 128,67, 128,36, 128,23, 128,11, 127,85, 127,67, 100,81, 78,73, 75,01, 74,90, 73,71, 73,42, 71,64, 70,59, 60,80, 51,50, 48,40, 36,96, 32,16, 29,96, 29,68, 29,57, 27,75, 27,46, 25,96, 25,88, 22,94, 21,26, 21,17, 14,38; HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na^+) m/e ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 1229.8448, calcd 1229.8433.

Preparación del 12: A una solución del 11 (68 mg, 0,056 mmol) en THF (3 ml), se añadió H_2O (0,6 ml) y trifetilfosfina (23 mg, 0,085 mmol). La mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente por la noche. La solución se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en THF (5 ml) y se añadieron Ac_2O (0,1 ml), Et_3 (0,1 ml) y DMAP (5 mg). La mezcla se agitó durante 2 horas. La solución se concentró, y la columna cromatográfica dio lugar al compuesto 13 (55 mg, 80% de rendimiento). RMN (^1H , CDCl_3) δ 7,41-7,27 (m, 15H), 6,73 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 6,12 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H), 5,36-5,34 (m, 2H), 5,24 (dd, $J = 3,0$ Hz, 13,5 Hz, 1H), 4,96 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H), 4,86 (tt, $J = 10,5$, 3,0 Hz, 1H), 4,82-4,65 (m, 6H), 4,38 (tt, $J = 3,0$, 9,5 Hz, 1H), 4,04 (dd, $J = 3,0$, 10,5 Hz, 1H), 3,93 (dd, $J = 3,0$, 11,5 Hz, 1H), 3,87-3,78 (m, 3H), 3,53-3,46 (m, 2H), 3,32-3,27 (m, 1H), 2,13 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 2,06-2,00 (m, 10H), 1,88 (s, 3H), 1,72-1,157 (m, 4H), 1,38-1,22 (m, 56H), 0,90-0,87 (m, 6H); RMN (^{13}C , CDCl_3) δ 173,49, 171,74, 170,51, 170,40, 138,89, 138,64, 138,56, 130,13, 129,21, 128,65, 128,31, 128,11, 127,77, 100,91, 79,14, 76,64, 74,91, 73,84, 73,64, 71,32, 71,10, 70,27, 48,68, 40,24, 36,84, 32,14, 29,94, 29,90, 29,86, 29,82, 29,76, 29,68, 29,60, 29,55, 27,89, 27,45, 25,94, 25,79, 23,37, 22,92, 21,41, 21,19, 14,35; HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na^+) m/e ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 1245.8634, calcd 1245.8633.

Preparación de PBS57. Se añadió Na^+ (21 mg, 0,91 mmol) a NH_3 líquido (20 ml) bajo N_2 a -78°C , agitándose la mezcla durante 5 min. El compuesto 13 (55 mg, 0,045 mmol) se disolvió en THF seco (2 ml). La solución se añadió al líquido azul NH_3 y se agitó 2 horas. La reacción se templó con MeOH. Después de que se eliminara el amoniaco, se concentró la solución, y la columna cromatográfica dio lugar a PBS57 (18 mg, 47%). RMN (^1H , 10% MeOD en CDCl_3) δ 5,35 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 4,87 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 4,16-4,13 (m, 1H), 3,85-3,51 (m, 9H), 3,24-3,21 (m, 1H), 2,1 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,03-1,98 (m, 7H), 1,64-1,52 (m, 4H), 1,38-1,22 (m, 56H), 0,89-0,86 (m, 6H); RMN (^{13}C , 10% MeOD en CDCl_3) δ 174,61, 172,60, 129,96, 99,57, 74,71, 72,16, 69,92, 69,12, 68,88, 67,14, 50,53, 49,48, 49,30, 49,13, 48,96, 48,79, 48,62, 39,70, 36,58, 32,70, 31,97, 29,83, 29,77, 29,65, 29,56, 29,50, 29,45, 29,42, 29,39, 29,36, 27,25, 25,95, 25,91, 22,72, 22,58, 14,10; NRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na^+) m/e ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 891.7014, calcd 891.7014.

La solubilidad de KRN7000 en DMSO es menor de 5 mg/ml, mientras que la solubilidad de PBS-57 en DMSO fue de 20 mg/ml (22,4 mM).

40 **Ejemplo 2:** Tinción de células V α 141 NKT con tetrámeros CD1d cargados con PBS-57.

Un medio típico para aislar y cuantificar las células NKT que responden a Cd1 es mediante la citometría de flujo utilizando tetrámeros CD1d marcados con fluoróforos cargados con esfingoglicolípidos. Para ensayar la capacidad de PBS-57 para facilitar la tinción del tetrámero CD1d, se formaron tetrámeros CD1d cargados con glicolípidos. Moléculas sCD1d biotiniladas murinas (en PBS) se mezclaron con PBS-57 o KRN7000 con una proporción molar de 1:3 (proteína:lipido), y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se añadieron 80 μg de estreptavidina-PE (Pharmagen) a 200 μg de la mezcla CD1-glicolípidos, y se incubaron a temperatura ambiente durante 4 horas. Se guardaron tetrámeros a 4°C hasta que se usaron.

Se aislaron suspensiones celulares únicas de timocitos y esplenocitos a partir de ratones C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine), tal como se conoce en la técnica. El repertorio TCR de las células NKT fue limitado con una subunidad V_α invariable ($V_\alpha 14$ en ratones y subunidades V_β variadas. Se incubaron 10^6 células con 200 μl de medio de tinción (2% BSA, 1% NaN_3 , 10 mM EDTA en PBS) con 2,4G2 (1:100, ATCC, Manassas, VA) y Neutravidina (5 μg /200 μl ; Molecular Probes, Eugene, OR) durante 20 minutos en hielo. Las células se sedimentaron y se volvieron a suspender en medio de tinción con anti-TCR β FITC (1:100; H57-597 BD-Pharmigen, San Diego, CA) y tetrámeros cargados con CD1/glicolípidos o vehículo (sin glicolípidos), se conjugaron con estreptavidina-PE (1:400) y se incubaron en hielo durante 45 minutos. Las células se lavaron 2 veces en el medio de tinción, se fijaron con 1% de paraformaldehído en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Tal como se aprecia en la figura 3 PBS-57 tiñó células NKT en el bazo y en el timo, de forma similar a KRN7000.

60 **Ejemplo 3:** PBS-57 puede facilitar la tinción de las células NKT que expresan una amplia variedad de subunidades V_β

Los TCR que se expresan en las células NKT, se limitan a una subunidad V_α invariante, y a una subunidad variable V_β que responde a la presentación glicolípidica mediante CD1d. Para determinar si los tetrámeros cargados con PBS-57 eran específicos para las subunidades V_β en su capacidad para unirse, hibridomas celulares que expresan

distintas V_{β} se ensayaron en cuanto a su capacidad para unirse a tetrámeros CD1d cargados con PBS-57. Se establecieron hibridomas NKT en los laboratorios Bendelac y Hayakawa tal como se ha descrito previamente (Zhou *et al.*, Reconocimiento de glicofingolípidos en los lisosomas por las células NKT, *Science*, 2004, 306: p. 1.786-1.788, y Gui *et al.*, la cadena beta de TCR influencia pero no controla solamente la autoreactividad de las células Valfa 14J281T, *Journal of Immunology*, 2001, 167: p. 6.239-6.246).

Para teñir los hibridomas de las células NKT, tetrámeros CD1d solubles (sCD1d) se cargaron con PBS-57 o KRN7000 mediante el procedimiento siguiente. Se prepararon los siguientes reactivos de almacenamiento: sCD1d (1 mg/ml en solución salina tamponada de fosfato (PBS)); PBS-57 (1 mg/ml en DMSO); Tween 20 (0,5% en PBS); y estreptavidina-APC (80 μ g/ml en PBS). 10 μ l de sCD1d stock, 1 μ l PBS-57 stock, y 10 μ l Tween 20 stock se mezclaron y se añadieron 79 μ l de PBS para llevar el volumen hasta 100 μ l. Se incubó la solución a 37°C durante 3 horas. Para separar el glicolípido no unido, la mezcla se aplicó a un filtro Microcon YM30 (Millipore) que se había humedecido previamente con PBS (400 ml). La membrana cargada se centrifugó hasta que sólo permanecieron –10 μ l de la solución. Se aumentó entonces el volumen hasta 100 μ l añadiendo PBS. Se agitó la solución entonces para ayudar en que la proteína se liberara del filtro. La unidad Microcon se vertió en un tubo Eppendorf reciente y el contenido se centrifugó en el tubo. Una alícuota de 10 μ l de la solución, se eliminó, añadiendo la solución estreptavidina-APC (5 μ l). La solución resultante se incubó a 37°C durante 2 horas.

Los hibridomas celulares NKT se suspendieron en PBS y estreptavidina (1 μ g/ml) para bloquear la biotina superficial de las células durante 20 minutos a temperatura ambiente. El sCD1d-estreptavidina-cicromo no cargado se utilizó para evaluar la unión no específica de los tetrámeros CD1d vacíos no cargados mediante la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente. La tinción de las células NKT se llevó a cabo a 37°C durante 4 horas, utilizando el complejo glicolípido-1CD1d-estreptavidina-APC. Las células se lavaron con PBS y se ensayaron mediante citometría de flujo.

Tal como se aprecia en la Fig. 4 las variaciones en la solubilidad V_{β} de TCR en la célula NKT, no afectaron a la unión de los tetrámeros CD1d cargados con PBS-57, y, de este modo, PBS-57 puede ser un ligando “universal” para las células NKT.

Ejemplo 4: Capacidad de PBS-57 para facilitar la tinción del tetrámero CD1d de las células NKT en muestras sanguíneas humanas y de primates no humanos.

Para ensayar si PBS-57 podría facilitar la unión de las células NKT en las muestras sanguíneas de tanto primates no humanos como del hombre, tetrámeros CD1d humanos y murinos se cargaron con PBS-57 tal como se describe en el Ejemplo 2. Una mayoría de las muestras sanguíneas humanas contenía suficientes células NKT (>0,08% de células CD-3-positivas), para obtener la tinción (14 de las 17 muestras), mientras algunas muestras pueden haber contenido demasiadas pocas células NKT, para permitir la detección de la tinción (Lee *et al.*, 2002). Entre los primates no humanos, se observó una tinción significativa de las células NKT, con una mayoría de muestras sanguíneas de chimpancé (6 de 10 muestras) y un cuarto de muestras de macacos rhesus (12 muestras). En la Fig. 5, se muestran graficaciones de puntos representativos de la tinción de células NKT en el hombre, chimpancés y macacos rhesus. No se apreció tinción en las muestras de macacos de cola de cerdo o de mangabeyes grises, pudiendo deberse esto a la población limitada de células NKT circulantes en la sangre y al pequeño tamaño de la muestra.

Ejemplo 5: Liberación de citoquinas en respuesta al complejo tetrámero PBS-57/CD1d *in vitro*

Para determinar si PBS-57 estimulaba la liberación de citoquinas por las células NKT *in vitro*, 5×10^5 esplenocitos murinos aislados de los ratones B6, se incubaron en pocillos separados con 10^5 , 10^4 , 10^3 , 100, 10 y 1 μ g/ml, de PBS-57 o KRN7000 en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, 50 μ M de 2-mercaptoetanol 2 mM de glutamina y antibióticos. Después de 48 horas, se midieron los niveles de IL-4 e IFN γ mediante ELISA (BD Pharmingen)- Tal como se aprecia en la Fig. 6, las respuestas citoquímicas al plateau de PBS-57 a 100 μ g/ml aproximadamente se compararon con 100 μ g/ml para KRN7000. PBS-57 pudo inducir tanto la secreción de citoquinas Th1 como las de Th2.

Ejemplo 6: Liberación citoquímica en respuesta al complejo tetrámero PBS-57/CD1d *in vivo*

Para examinar si PBS-57 producía una respuesta imune *in vivo*, se ensayó la capacidad de PBS-57 y KRN7000 para provocar un aumento en los niveles de citoquinas en un ratón. Se prepararon soluciones de almacenamiento de 1 mg/ml de PBS-57 y de KRN7000 en DMSO. Las soluciones PBS-57 y KRN7000 se diluyeron con PBS a 1, 100, 10^4 y 10^8 μ g/ml. 100 μ l de cada solución se inyectaron intravenosamente en ratones B6 de 6 semanas de edad. Las muestras séricas se aislaron a partir de los ratones a las 24 horas, ensayándose la concentración, mediante ELISA (BD Pharmingen) de INF- γ . La Fig. 7 demuestra las concentraciones séricas de INF- γ , y PBS-57 parece favorecer que el nivel de citoquinas sea igual o superior que KRN7000.

Aunque las composiciones y los procedimientos divulgados en la presente memoria se han descrito como formas de realización ejemplificativas, resultará evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse las variaciones a

las composiciones y procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas de los procedimientos que se describen en la presente memoria. Más específicamente, resultará evidente que ciertos agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes que se describen en esta Memoria, siempre que se obtengan idénticos o similares resultados.

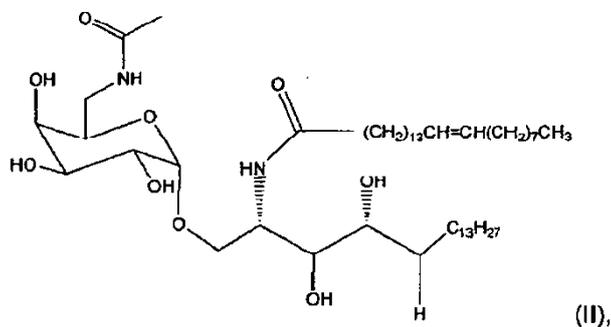
5 Tal como se utilizan en la presente memoria y en las reivindicaciones que se adjuntan, las formas singulares “una”, “una” y “la”, incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente otra cosa. Así por ejemplo la referencia a una composición que contiene “un polinucleótido” incluye una mezcla de dos o más polinucleótidos. También hay que explicar que el término “o” se utiliza generalmente en su sentido, que incluye “y/o”, a menos que el contenido dicte claramente otra cosa. Todas las publicaciones, patentes y aplicaciones de patentes a las que se hace referencia en esta memoria, indican el nivel de conocimiento ordinario de la técnica a la cual esta invención pertenece. En caso de conflicto entre esta exposición y las patentes, publicaciones y referencias, esta exposición asumirá el control.

10
15 También se entiende específicamente que cualquier valor numérico al que se haga alusión en la presente memoria, incluye todos los valores, desde el más bajo al más alto, es decir, todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más inferior y el más alto que se enumeran, van a considerarse como expresamente consideradas en esta aplicación.

20

REIVINDICACIONES

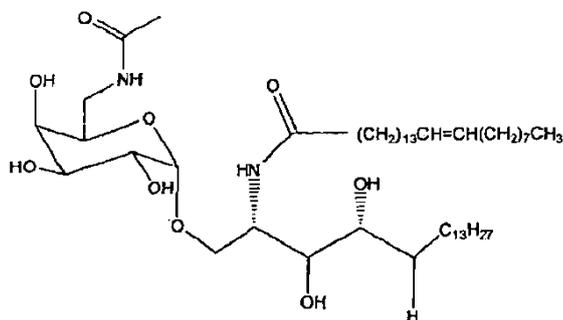
1. Composición, que comprende un compuesto representado por la fórmula estructural (II)



(II),

un antígeno derivado de un tumor, y un vehículo fisiológicamente aceptable, para su utilización en el tratamiento de enfermedades cancerosas, para estimular una respuesta inmunitaria antitumoral.

- 5 2. Composición para su utilización según la reivindicación 1, en la que la solubilidad del compuesto de fórmula (II) es por lo menos de aproximadamente 20 mg/ml en DMSO.
3. Composición para su utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que el compuesto de fórmula (II) puede unirse a un tetrámero o monómero CD1d.
- 10 4. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el compuesto de fórmula (II) puede activar una célula NKT.
5. Composición para su utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto de fórmula (II) se une mediante un tetrámero o monómero CD1d.
- 15 6. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la enfermedad cancerosa es un tumor sólido o hematológico.
- 20 7. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la enfermedad cancerosa es seleccionada de entre el grupo constituido por leucemia, linfoma, cánceres relacionados con el SIDA, cánceres de huesos, cerebrales, de mama, del sistema gastrointestinal, del sistema endocrino, oculares, del tracto genitourinario, de células germinales, de órganos reproductores, de cabeza y cuello, del sistema musculoesquelético, de la piel, del sistema nervioso y del sistema respiratorio.
- 25 8. Compuesto representado por la fórmula estructural (II):



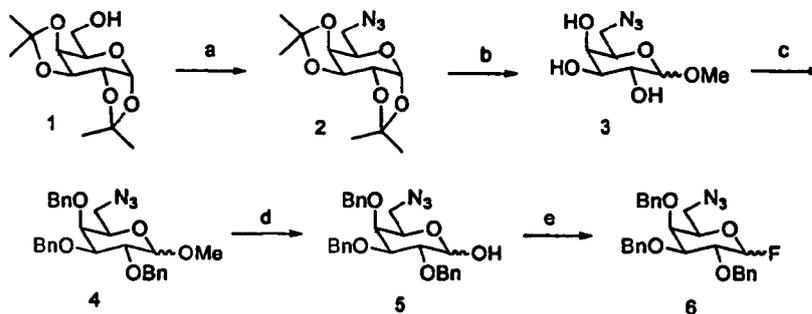
y un antígeno derivado de un tumor,

como una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial, destinada a su utilización en el tratamiento de enfermedades cancerosas.

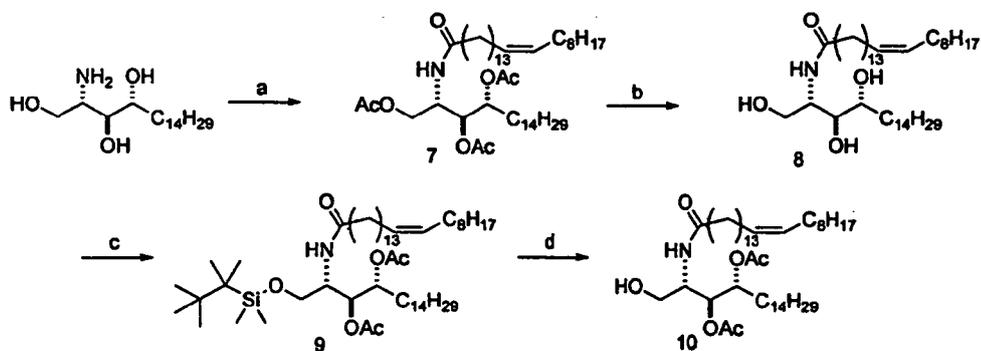
- 30 9. Preparación combinada para su utilización según la reivindicación 8, en la que la respuesta inmunitaria antitumoral es reforzada con respecto a la administración del antígeno derivado de un tumor solo.
10. Preparación combinada para su utilización según la reivindicación 8 ó 9, en la que la enfermedad cancerosa es un tumor sólido o hematológico.

- 5 11. Preparación combinada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que la enfermedad cancerosa es seleccionada de entre el grupo constituido por leucemia, linfoma, cánceres relacionados con el SIDA, cánceres de huesos, cerebrales, de mama, del sistema gastrointestinal, del sistema endocrino, oculares, del tracto genitourinario, de células germinales, de órganos reproductores, de cabeza y cuello, del sistema musculoesquelético, de la piel, del sistema nervioso y del sistema respiratorio.

A)



B)



C)

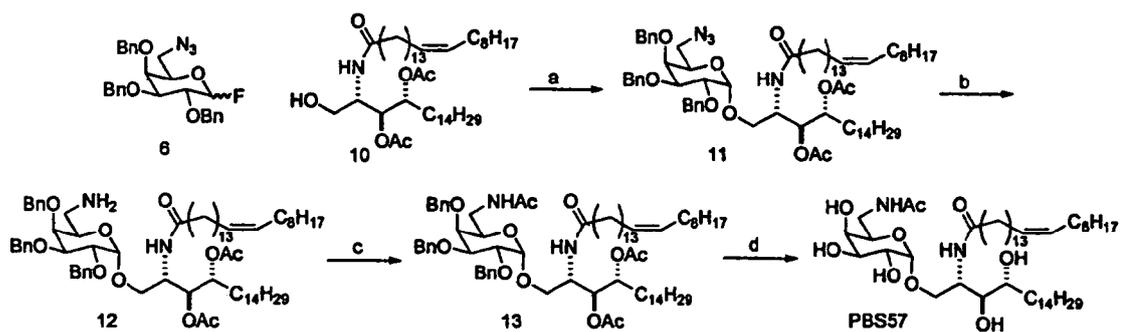


FIG. 1

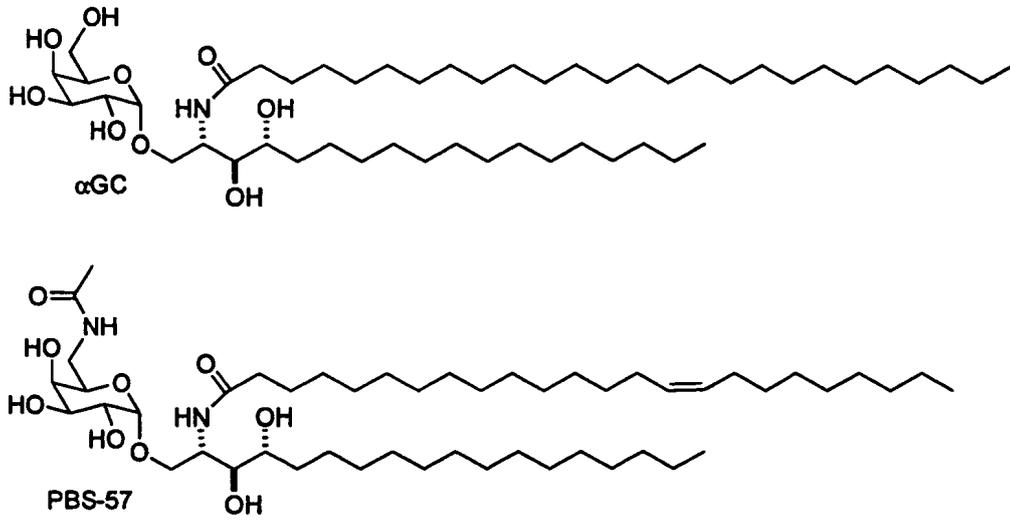


FIG. 2

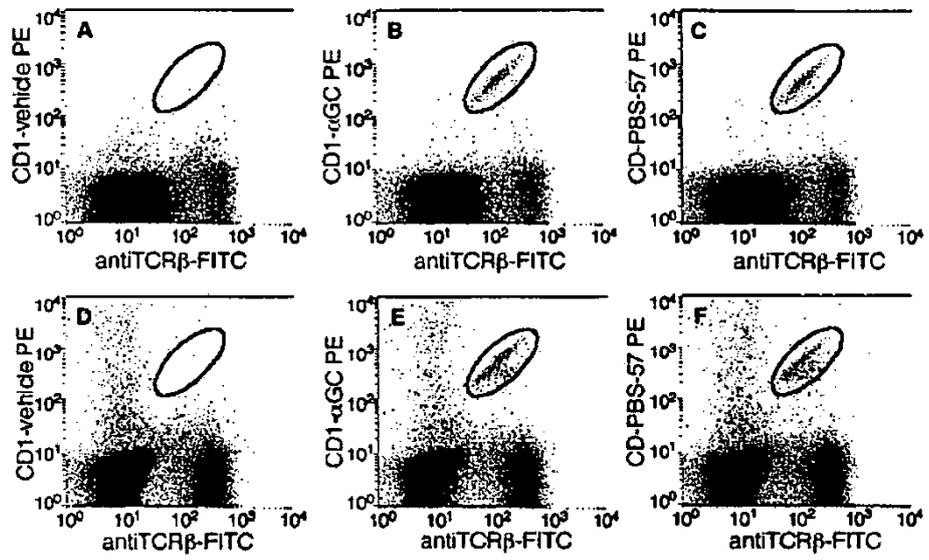


FIG. 3

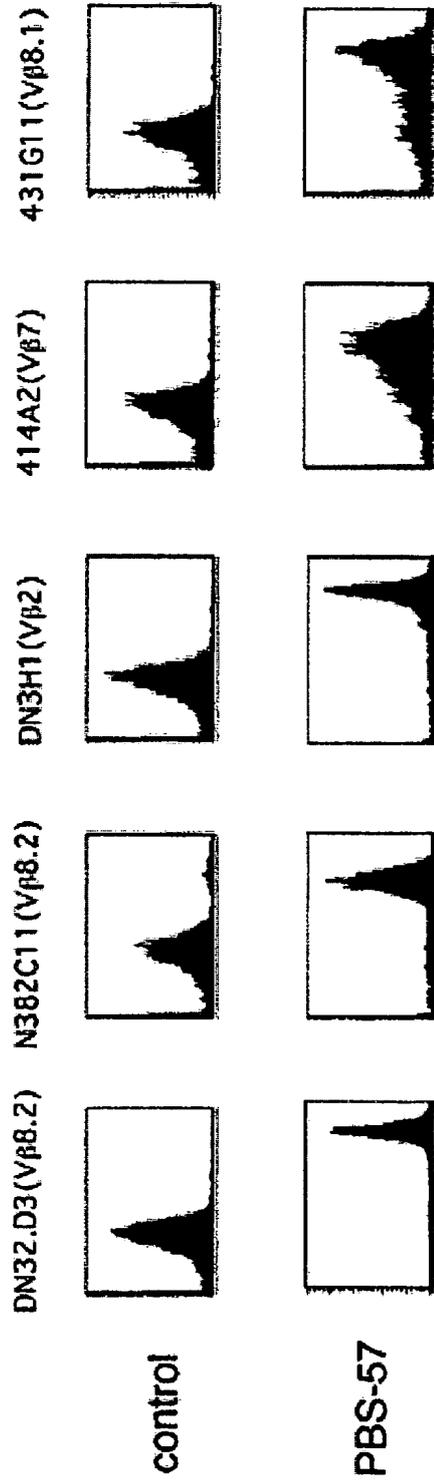


FIG. 4

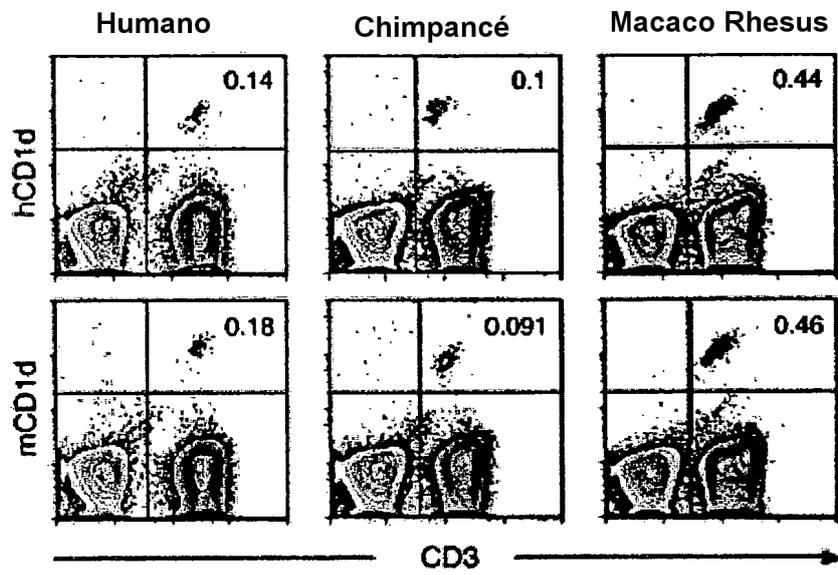


FIG. 5

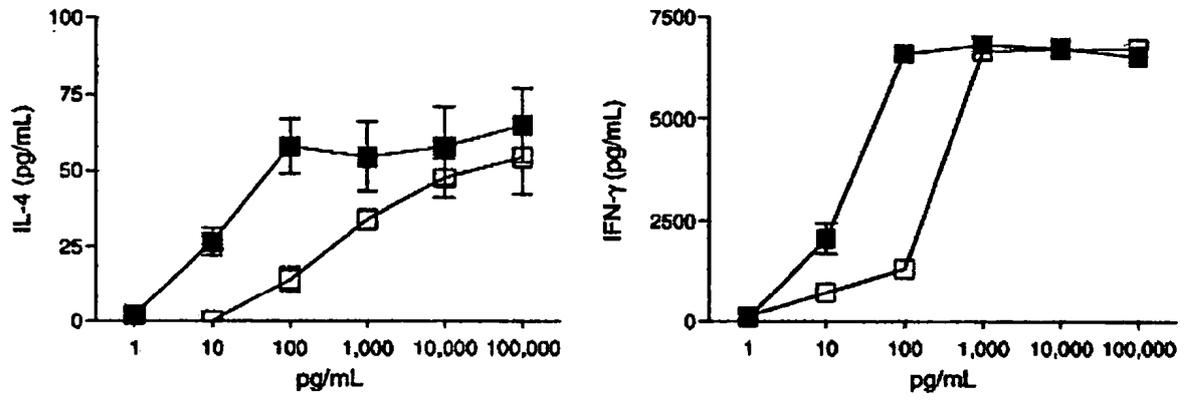


FIG. 6

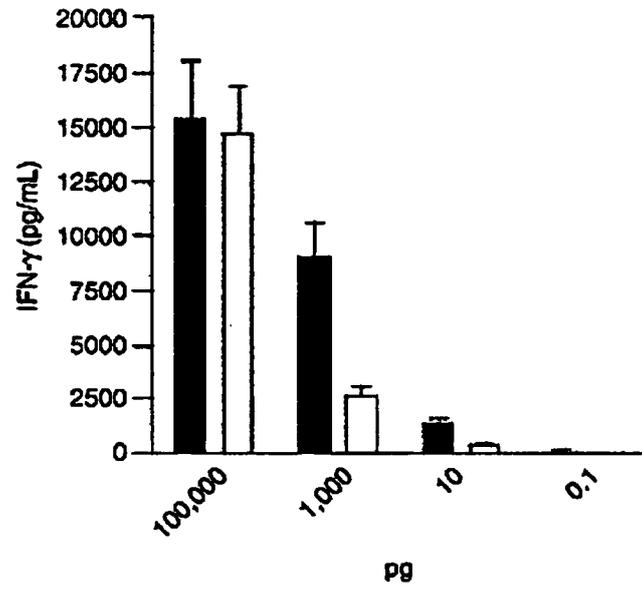


FIG. 7

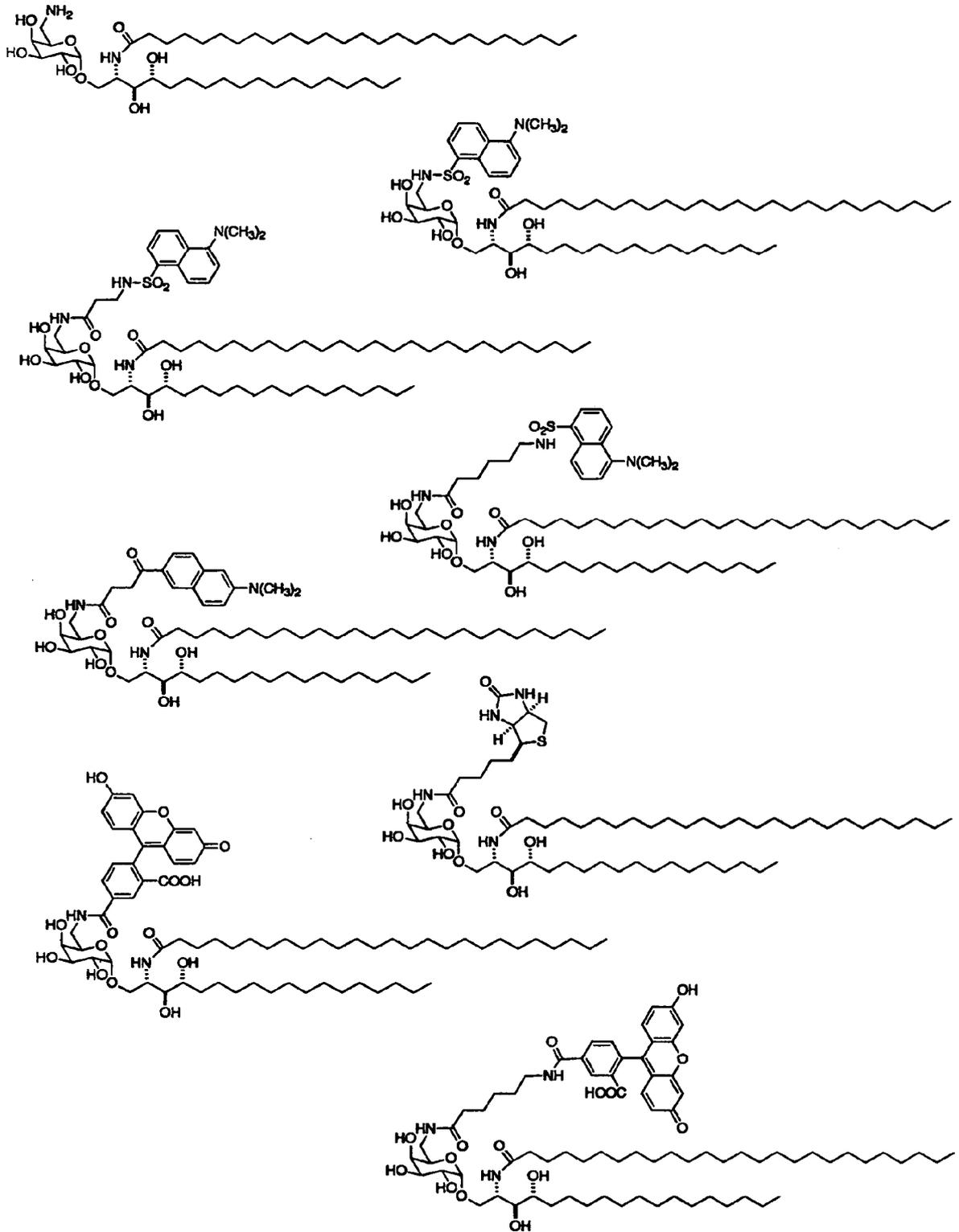


FIG. 8

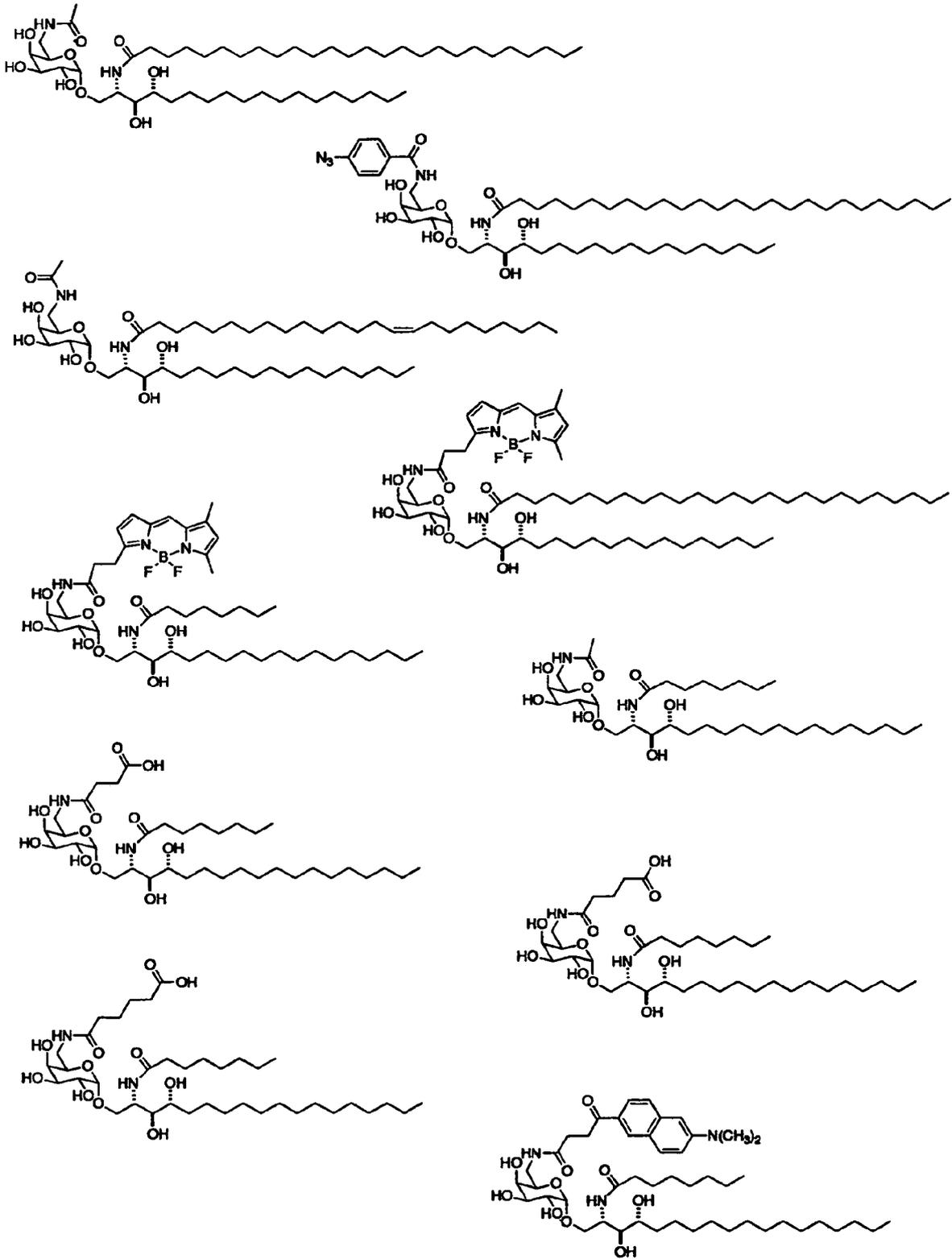


FIG. 8 (cont.)

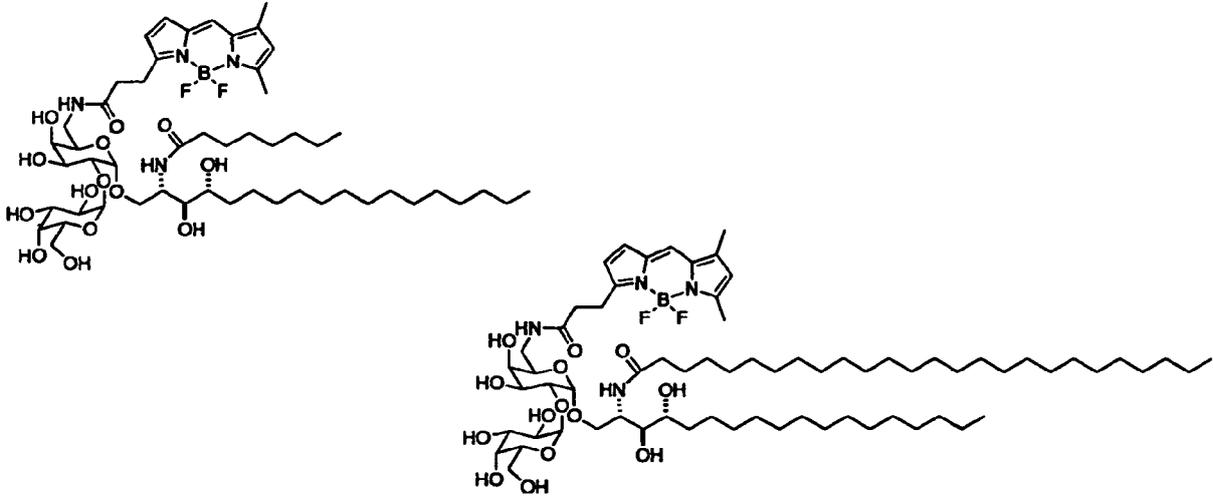


FIG. 8 (cont.)