

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 005**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2006 E 06733921 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1848813**

54 Título: **Activación por glucolípidos bacterianos de linfocitos NKT restringidos por CD1d**

30 Prioridad:

28.01.2005 US 648153 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.09.2013

73 Titular/es:

**BRIGHAM YOUNG UNIVERSITY (33.3%)
Technology Transfer Office, 3760 HBLL
Provo, UT 84602-6844, US;
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (33.3%) y
THE UNIVERSITY OF CHICAGO (33.3%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 423 005 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

Activación por glucolípidos bacterianos de linfocitos NKT restringidos por CD1d.

5 Declaración relativa a investigación con financiación federal

[0001] Esta invención se ha llevado a cabo con financiación del gobierno de los Estados Unidos otorgada por los Institutos Nacionales de la Salud a través del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (concesión n° AI053725). El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención.

10

INTRODUCCIÓN

[0002] La molécula CD1d es un miembro de la familia CD1 de moléculas asociadas a la β 2-microglobulina. A diferencia de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las clases I y II que presentan antígenos proteínicos a los linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente, las moléculas CD1 han evolucionado para capturar y procesar antígenos lipídicos tanto exógenos como propios para su presentación a los linfocitos T. Se ha demostrado que las moléculas CD1a, b y c presentan antígenos microbianos exógenos a linfocitos T con TRC $\alpha\beta$. Por el contrario, los linfocitos T restringidos por CD1d, o linfocitos NKT, son una población de células de memoria/efectoras de tipo innato que expresan los receptores de los linfocitos NK y un TCR conservado semivariante (V α 14-J α 18/V β 8 en ratones y V α 24-J α 18/V β 11 en humanos). Al igual que los linfocitos NK, los linfocitos NKT expresan constitutivamente el ARNm, pero no la proteína de IFN- γ , lo que demuestra su estado efector latente. Se ha implicado a los linfocitos NKT en la supresión de la autoinmunidad y el rechazo de injertos, la estimulación de la resistencia a patógenos y la estimulación de la inmunidad tumoral.

25 **[0003]** Mientras que se sabe que los linfocitos NKT responden a α -galactosilceramida (α Gal-Cer), un ligando sustitutivo derivado de una esponja marina, la falta de conocimiento sobre sus antígenos naturales ha impedido con anterioridad la comprensión de los mecanismos de su activación periférica y reclutamiento, así como de su desarrollo en el timo.

30 **[0004]** Los inventores han identificado previamente un antígeno endógeno natural, isoglobotrihexosilceramida (iGb3), que es presentado a los linfocitos NKT por células dendríticas activadas por LPS. Este trabajo sugiere que iGb3 es un ligando primario para los linfocitos NKT. Sin embargo, la parcial diversidad de la cadena β del TCR sugiere que puede existir una especificidad para múltiples antígenos naturales.

35 RESUMEN

[0005] En este documento se describe el sorprendente descubrimiento de los inventores de que glucolípidos derivados de miembros de la clase *Alphaproteobacteria* pueden actuar también como ligandos naturales de moléculas CD1d para activar los linfocitos NKT.

40

[0006] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la activación de un linfocito NKT que comprende la puesta en contacto del linfocito NKT con un glucolípido bacteriano complejado con una molécula CD1d. En algunas realizaciones, el glucolípido bacteriano puede derivarse de un miembro de la clase *Alphaproteobacteria*.

45

[0007] En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la inducción de la expresión de citocinas por un linfocito NKT que comprende la puesta en contacto de un receptor de linfocitos T del linfocito NKT con un glucolípido bacteriano complejado con una molécula CD1d.

50 **[0008]** En otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de linfocitos NKT activados por la puesta en contacto de un receptor de linfocitos T de los linfocitos NKT con un glucolípido bacteriano complejado con una molécula CD1d.

55 **[0009]** En otros aspectos, la invención proporciona procedimientos para mejorar la eficacia de vacunas, estimular el rechazo de tumores, modular la autoinmunidad, inhibir la hipersensibilidad inducida por alérgenos y tratar una infección en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de un glucolípido bacteriano derivado de un miembro de la clase *Alphaproteobacteria*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**[0010]**

- 5 La figura 1A representa la secreción de IFN- γ dependiente de CD1d por linfocitos NKT de ratón y humanos estimulados con bacterias muertas por calor o α Gal-Cer. Media y desviación estándar de tres experimentos.
- La figura 1B representa la proliferación de linfocitos NKT en un cultivo de células esplénicas estimuladas con bacterias muertas por calor o α Gal-Cer. Los puntos de datos muestran medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes.
- 10 La figura 1C representa la proliferación de linfocitos NKT en respuesta a estímulos bacterianos o α Gal-Cer. Fila superior: tinción con CD1d- α Gal-Cer/B220 de células esplénicas con una ventana de selección y un porcentaje de linfocitos NKT según se indican. Fila inferior: perfil de dilución con CFSE de una subpoblación seleccionada de 5×10^3 linfocitos NKT.
- 15 La figura 2A representa el IFN- γ liberado por células esplénicas totales cultivadas durante 48 horas con *Salmonella typhimurium*, *Sphingomonas capsulata* y *Ehrlichia muris* muertas por calor. Panel izquierdo, los datos se muestran como porcentaje del control de tipo natural. Panel derecho, los datos se muestran como media y desviación estándar de dos a tres experimentos independientes.
- 20 La figura 2B representa el bloqueo de las respuestas de linfocitos NKT humanos a DC más antígeno por la lectina IB4. Datos similares obtenidos en dos experimentos.
- 25 La figura 2C representa la estimulación de respuestas de linfocitos NKT de ratón al antígeno bacteriano presentado por DC *Hexb*^{+/-} o *Hexb*^{-/-}. Datos similares obtenidos en dos experimentos.
- La figura 3A representa estructuras de antígenos de la pared celular de *Sphingomonas* sintéticos. PBS-50 es una β -glucuronosilceramida de control.
- 30 La figura 3B representa la respuesta de IFN- γ de una línea de linfocitos NKT con V α 24-J α 18 y linfocitos NKT de ratón recién purificados estimulados por antígenos lipídicos sintéticos y DC. Los datos mostrados son la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes.
- 35 La figura 3C representa la tinción con tetrámeros de CD1d de linfocitos NKT humanos (fila superior) y células esplénicas de ratón (fila inferior) con glucolípidos sintéticos. La ventana de selección de los linfocitos NKT y los porcentajes son según se indican.
- La figura 4A representa la activación *in vivo* de linfocitos NKT 24 horas después de la infección con *Sphingomonas* (1 x 10⁷), *Ehrlichia* (1 x 10⁸) y *Salmonella* (1 x 10⁶) por vía intravenosa. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos.
- 40 La figura 4B representa la producción de IFN- γ por linfocitos NKT en respuesta a *Salmonella*. La diferencia entre *Hexb*^{+/+} y *Hexb*^{-/-} fue significativa para *Salmonella* (p = 0,001). Se analizaron tres ratones por grupo y se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.
- 45 La figura 4C representa la carga bacteriana en los pulmones de ratones CD1d^{+/-} y CD1d^{-/-} después de la infección con las UFC indicadas de *Sphingomonas* (cada barra representa cuatro o cinco ratones). Se indican los factores de aumento y los valores de p. Se muestran dos experimentos representativos.
- 50 La figura 4D representa la letalidad inmediata en ratones después de la inoculación de una alta dosis de 5×10^8 células de *Sphingomonas capsulata*. Se muestran experimentos independientes que comparan CD1d^{+/-} y CD1d^{-/-} (n = 24 en cada caso, p < 0,0001) y J α 18^{+/-} y J α 18^{-/-} (n = 12 en cada caso, p = 0,034).
- 55 La figura 4E representa la liberación inmediata en suero de IFN- γ e IL-12 p40 en ratones mutantes heterocigotos y homocigotos para CD1d y J α 18 y en controles de la misma camada después de la infección con 1×10^7 células de *Sphingomonas capsulata*. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.
- La figura 4F representa recuentos de *Ehrlichia* por PCR en pulmones, hígado y bazo de ratones CD1d^{+/-} y CD1d^{-/-}

recuperados en los días 2 y 7 después de la infección (cada barra representa tres ratones). Se indican los factores de incremento y los valores de p. Se muestra un experimento representativo.

La figura 5 representa varios glucolípidos sintéticos derivados de bacterias de la clase *Alphaproteobacteria*.

5

La figura 6 representa un esquema de síntesis ejemplar para el glucolípido PBS-61.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE VARIAS REALIZACIONES

10 **[0011]** Los linfocitos T restringidos por CD1d poseen funciones tanto efectoras como auxiliares e interactúan con diversos tipos de células, incluidos macrófagos, células dendríticas, linfocitos NK, linfocitos T y linfocitos B, con lo que contribuyen a ambas respuestas inmunitarias, innata y adaptativa. Un subgrupo de estos linfocitos T, los linfocitos NKT, también denominados linfocitos restringidos por CD1d o linfocitos T positivos para tetrámeros de CD1d, se caracterizan por cadenas invariantes de TCR α , reactividad frente a lípidos propios y respuestas efectoras
15 rápidas. Estos linfocitos desempeñan un papel importante en numerosas funciones inmunitarias, incluidas respuestas antimicrobianas, inmunidad antitumoral y en la regulación del equilibrio entre la tolerancia y la autoinmunidad.

[0012] En ausencia de antígenos exógenos, los linfocitos NKT se estimulan por la exposición a células presentadoras de antígenos CD1⁺, como monocitos, células dendríticas (DC) y macrófagos. Las clases de autoantígenos que pueden presentarse a los linfocitos NKT y ser reconocidos por estos incluyen fosfolípidos, como fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol, así como esfingolípidos. Sin embargo, no todas las clases desencadenan una respuesta en los linfocitos NKT con respecto a la liberación de citocinas.

25 **[0013]** También se sabe que los linfocitos NKT reconocen α -galactosilceramida (α Gal-Cer), un glucoesfingolípido que se encuentra en esponjas marinas. Esta molécula no tiene una función inmunológica conocida ni ninguna otra función fisiológica en mamíferos, pero es ampliamente usada por los investigadores para estudiar la activación de los linfocitos NKT. Con anterioridad a la presente invención, la activación de los linfocitos NKT por la presentación directa de glucolípidos microbianos era desconocida.

30

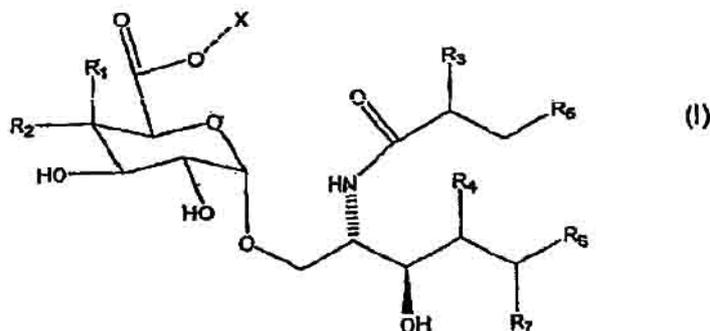
[0014] Los linfocitos NKT se activan rápidamente tras la estimulación por antígenos lipídicos polares presentados por CD1d. La "activación", como término usado en este documento y en la técnica, se refiere a la secreción por parte de los linfocitos NKT de IFN- γ , IL-4, IL-2, IL-10, IL-13, GM-CSF o TNF- α , o de combinaciones de estas citocinas, tras su contacto con antígenos estimulantes presentados por CD1d. Alternativamente, la "activación"
35 puede referirse al aumento de la expresión de marcadores de la superficie celular en los linfocitos T activados, por ejemplo CD69.

[0015] La activación de los linfocitos NKT comprende la puesta en contacto de un linfocito NKT, o más específicamente, de un receptor de linfocitos T (TCR) del linfocito NKT, con un lípido polar bacteriano complejado con CD1d. Los glucolípidos son tipos adecuados de lípidos polares. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la activación de los linfocitos NKT comprende la puesta en contacto de un linfocito NKT con un glucolípido bacteriano derivado de un miembro de la clase *Alphaproteobacteria*. Un "receptor de linfocitos T de un linfocito NKT", según se usa el término en este documento, se refiere al TCR seminvariante conservado de los linfocitos NKT que comprende, por ejemplo, V α 14-J α 18/V β 8 en ratones y V α 24-J α 18/V β 11 en humanos. La "puesta en contacto",
45 según se usa en este documento, se refiere a la adición *in vitro* de un glucolípido bacteriano en disolución a moléculas CD1d inmovilizadas, solubles o insolubles, o la administración *in vivo* del glucolípido bacteriano a un sujeto con células presentadoras de antígenos que expresan moléculas CD1d en la superficie celular.

[0016] La activación de los linfocitos NKT puede medirse *in vitro* o *ex vivo* por cualquier procedimiento adecuado. Un ejemplo de una prueba *in vitro* que permite la evaluación de la activación de los linfocitos NKT es el cocultivo de linfocitos NKT con células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas (DC), en presencia de un glucolípido bacteriano activador o supuestamente activador y el subsiguiente ensayo para determinar IFN- γ u otras citocinas secretadas en el sobrenadante. Alternativamente, la activación de los linfocitos NKT puede medirse *ex vivo* mediante la administración de un antígeno glucolipídico bacteriano a un sujeto o la
50 administración de células presentadoras de antígenos CD1d⁺ a un sujeto después de su puesta en contacto *ex vivo* con glucolípidos bacterianos. Los linfocitos NKT de estos sujetos pueden aislarse, por ejemplo, por tinción con tetrámeros de CD1d y selección de subpoblaciones por citometría de flujo, y posteriormente analizarse para determinar el CD69 superficial (antígeno de activación temprana de linfocitos T) y/o el IFN- γ intracelular por los procedimientos adecuados.

- [0017]** La clase *Alphaproteobacteria* pertenece al filo *Proteobacteria* y está compuesta en su mayor parte por bacterias con dos fenotipos fundamentales: bacterias púrpuras no del azufre y bacterias aerobias que contienen bacterioclorofila. Los miembros bacterianos de la clase *Alphaproteobacteria* se aíslan principalmente del suelo, lagos o charcas. Varios miembros son patógenos humanos conocidos.
- [0018]** La clase *Alphaproteobacteria* incluye seis órdenes: *Rhodospirillales*, *Rickettsiales*, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales*, *Caulobacterales* y *Rhizobiales* (Garrity, G. M. y col., Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera, BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology, 2ª edición, abril de 2001). Los glucolípidos bacterianos que pueden ser útiles para la activación de los linfocitos NKT pueden derivarse de miembros de cualquiera de estos órdenes. Sin embargo, se consideran especialmente adecuados miembros de los órdenes *Rickettsiales*, *Sphingomonadales* y *Rhizobiales*.
- [0019]** El orden *Rickettsiales* incluye tres familias: *Rickettsiaceae*, *Ehrlichiaeae* y *Holosporaceae*. Se considera que los lípidos polares derivados de miembros de la familia *Ehrlichiaeae* en el género *Ehrlichia* son adecuados. Por ejemplo, los glucolípidos derivados de *E. muris* pueden ser adecuados.
- [0020]** El orden *Sphingomonadales* incluye la familia *Sphingomonadaceae*. Los glucolípidos derivados de miembros de esta familia en el género *Sphingomonas*, por ejemplo, *S. capsulata*, se consideran adecuados.
- [0021]** El orden *Rhizobiales* incluye diez familias: *Rhizobiaceae*, *Bartonellaceae*, *Brucellaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae* y *Rhodobiaceae*. Los glucolípidos derivados de miembros de la familia *Brucellaceae* en el género *Brucella* se consideran de uso adecuado en los procedimientos mencionados anteriormente.
- [0022]** *Sphingomonas capsulata* es un patógeno de la clase *Alphaproteobacteria* que es una bacteria gramnegativa sin lipopolisacárido (LPS), cuyos lípidos de la pared celular han sido caracterizados exhaustivamente. Los glucolípidos derivados de las paredes celulares de estas bacterias pueden usarse para la activación de los linfocitos NKT.
- [0023]** De manera similar, los miembros del género *Ehrlichia* son bacterias gramnegativas sin LPS, cuyos lípidos de la pared celular pueden usarse para la activación de los linfocitos NKT. Aunque los lípidos de la membrana celular de *Ehrlichia* no están tan bien caracterizados como los de *Sphingomonas capsulata*, se considera que los miembros de este género funcionarán para activar los linfocitos NKT en ensayos de activación adecuados, así como *in vivo*.
- [0024]** *Brucella* es otro género de esta clase del que se sabe que es patógeno. Las cuatro especies de este género que pueden infectar a humanos incluyen *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. canis*. La enfermedad de la brucelosis en humanos se caracteriza como una enfermedad febril aguda o una enfermedad persistente con una amplia diversidad de síntomas. Es una zoonosis verdadera, en el sentido de que prácticamente todas las infecciones humanas proceden de animales. Es común una infección subclínica. A diferencia de *Ehrlichia* y *Sphingomonas* spp., la membrana celular exterior comprende un componente de LPS dominante y tres grupos principales de proteínas. Se considera que fracciones o componentes concretos de estas membranas celulares bacterianas pueden usarse para activar directamente los linfocitos NKT.
- [0025]** Según se ha señalado, los glucolípidos bacterianos adecuados derivan de bacterias de la clase *Alphaproteobacteria*. "Derivados de" se refiere al aislamiento y/o purificación a partir de fuentes bacterianas y también se refiere a la nueva síntesis de compuestos bacterianos o de compuestos diseñados racionalmente basados en compuestos bacterianos mediante procesos de síntesis adecuados conocidos en la técnica. Según apreciará un experto en la técnica, los "glucolípidos bacterianos" pueden incluir también bacterias muertas o atenuadas por calor. Por ejemplo, la puesta en contacto de un linfocito NKT con un glucolípido bacteriano adecuado incluye la puesta en contacto de un linfocito NKT con una bacteria muerta o atenuada por calor, así como con glucolípidos bacterianos aislados o sintéticos.
- [0026]** El término "glucolípido" designa cualquier compuesto que contiene uno o más restos de monosacárido unidos por un enlace glucosídico a una fracción hidrófoba como un acilglicerol, un esfingoide, una ceramida (*N*-acilesfingoide) o un fosfato de prenilo. En particular, uno o más sacáridos unidos a una fracción de ceramida pueden ser especialmente útiles para la activación de linfocitos NKT.

[0027] Los glucolípidos bacterianos adecuados para uso en procedimientos de activación de los linfocitos NKT pueden ser generalmente de la fórmula estructural (I):



5

en la que - indica un enlace sencillo en el que X es H o alquilo inferior o un enlace iónico en el que X es un contraión; R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consta de -H, -OH, un monosacárido y un oligosacárido; R₃ es -H u -OH, R₄ es -H u -OH o, junto con R₇, forma un enlace doble; R₅ y R₆ son independientemente alquilo C₁-C₃₀, en que el alquilo C₁-C₃₀ está saturado o insaturado o comprende uno o más grupos ciclopropilo; y R₇ es -H o, junto con R₄, forma un enlace doble. Según se usa en este documento, el término “alquilo inferior” pretende indicar un resto de hidrocarburo saturado o insaturado, lineal o ramificado con uno a cuatro átomos de carbono. Algunos ejemplos específicos de tales restos de hidrocarburo son metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, etenilo, propenilo, butenilo, isobutenilo, isopropenilo, formilo, acetilo, propionilo, butirilo o ciclopropilo. Además, según se usa en este documento, un “contraión” es cualquier especie cargada positivamente que puede asociarse por medio de un enlace iónico con un carboxilato cargado negativamente en el glucolípidio.

[0028] Algunos ejemplos representativos de glucolípidos bacterianos adecuados para formar complejos con moléculas CD1d y activar los linfocitos NKT se representan en la figura 5.

[0029] En particular, la presente invención se refiere a los glucolípidos bacterianos siguientes:

- PBS-49, en el que X es metilo; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₁₁; R₆ es alquilo C₁₃; y R₇ es -H;

- PBS-45, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₁₁; R₆ es alquilo C₁₃; y R₇ es -H;

- PBS-30, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₁₆; R₆ es alquilo C₁₅; y R₇ es -H;

- PBS-29, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -H; R₄ es -OH; R₅ es alquilo C₂₃; R₆ es alquilo C₁₃; y R₇ es -H;

- PBS-62, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₂₃; R₆ es alquilo C₁₅ que comprende un enlace doble; y R₇ es -H; y

- PBS-65, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₁₁; R₆ es alquilo C₁₃ que comprende un grupo ciclopropilo; y R₇ es -H;

PBS-30, PBS-45 y PBS-59 se sintetizaron basados en moléculas conocidas de membranas celulares de *Sphingomonas* y se encontró que activaban linfocitos NKT *in vitro*. Por el contrario, PBS-50 y PBS-60 no activan los linfocitos NKT. El resto de los compuestos representados en la figura 5 se diseñaron racionalmente basados en las siguientes características que se determinó que eran comunes entre los glucolípidos capaces de activar los linfocitos NKT: 1) un enlace glucosídico de tipo α y 2) una oxidación en la posición 6 de la fracción carbohidrato del glucolípidio.

[0030] En algunas realizaciones, la activación de los linfocitos NKT por la administración de un glucolípido bacteriano de acuerdo con la invención puede proporcionar un modo de estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto. Una “respuesta inmunitaria”, según se usa en este documento, se refiere a cualquier elevación de la respuesta humoral o celular que puede medirse en un sujeto en comparación con el nivel de referencia o el estado sin estimular del sujeto. Los procedimientos para la medida de las respuestas inmunitarias humoral y celular son bien conocidos en la técnica. Según se apreciará, la respuesta *in vivo* de los linfocitos está influenciada, en parte, por el entorno celular durante la activación. Las respuestas inmunitarias T_H1 se caracterizan predominantemente por la liberación, por ejemplo, de IL-2, IFN- γ , IL-12 y TNF- α . En contraste, las citocinas de la T_H2 incluyen predominantemente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. La respuesta *in vivo* de los linfocitos NKT puede estar influenciada también por la concentración del antígeno o la exposición previa o repetida al antígeno. La activación puede tener lugar además a través de interacciones con moléculas coestimulantes en los linfocitos NKT y las APC, por ejemplo, interacciones CD40/CD40L.

15 **[0031]** Además de la secreción de citocinas, los linfocitos NKT activados son potencialmente citolíticos por medio de la liberación de perforina y granzimas, así como granzulina, y pueden contribuir directamente a la muerte de las células bacterianas y/o tumorales mediante la secreción de estas moléculas.

[0032] Por lo tanto la activación de los linfocitos NKT en un sujeto por la administración de una cantidad efectiva de un glucolípido bacteriano a un sujeto puede generar una respuesta inmunitaria antimicrobiana y, de este modo, proporciona un modo de tratar una infección en el sujeto. Por lo tanto, la presente invención se refiere a los glucolípidos elegidos entre PBS-49, PBS-45, PBS-30, PBS-29, PBS-62 y PBS-65 para uso en el tratamiento de trastornos infecciosos. La infección puede ser vírica, bacteriana o parasítica y la respuesta inmunitaria antimicrobiana puede ser suficiente para inhibir el crecimiento o destruir a un microorganismo, incluidos, por ejemplo, virus, bacterias o parásitos. La administración puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento empleado en la técnica, incluidas, entre otras, la absorción por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transcutánea, oral, nasofaríngea o a través de mucosas.

[0033] Los glucolípidos bacterianos de acuerdo con la invención pueden emplearse también en el tratamiento del cáncer o en la estimulación del rechazo tumoral mediante la inducción de una respuesta inmunitaria antihiperproliferativa en un mamífero. “Tratar” o el “tratamiento” del cáncer en un mamífero incluye uno o más de los siguientes aspectos: (1) la inhibición del crecimiento del cáncer, es decir, detener su desarrollo, (2) la prevención de la diseminación del cáncer, es decir, la prevención de las metástasis, (3) la mitigación del cáncer, es decir, causar la regresión del cáncer; (4) la prevención de la recurrencia del cáncer; (5) la paliación de los síntomas del cáncer y (6) la estimulación del rechazo de uno o más tumores sólidos.

[0034] En una realización concreta, los glucolípidos de acuerdo con la invención pueden administrarse como coadyuvante para mejorar la eficacia de una vacuna cuando se coadministran con la vacuna. Según se usa en este documento, los términos “coadministración” y “coadministrar” se refieren a la administración de al menos dos componentes de manera concurrente, es decir, simultáneamente en el tiempo, o secuencialmente, es decir la administración de un componente seguida de la administración del otro componente.

[0035] Los procedimientos de transferencia adoptiva se basan en la administración de células que se han puesto en contacto con glucolípidos bacterianos *ex vivo* para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunas realizaciones, las células pueden ser linfocitos NKT, que se activan *ex vivo* y se inyectan en un sujeto para proporcionar o potenciar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, a células cancerosas o a microorganismos. En algunas realizaciones, la administración de linfocitos NKT puede inducir una respuesta inmunitaria antihiperproliferativa para estimular el rechazo de tumores sólidos. En otras realizaciones, las células pueden ser células presentadoras de antígenos que se han puesto en contacto con glucolípidos bacterianos *ex vivo* para permitir la formación de complejos entre los glucolípidos bacterianos y las moléculas CD1d expresadas por la célula presentadora de antígenos, por ejemplo, una célula dendrítica. Las células presentadoras de antígenos pueden administrarse entonces al sujeto, por ejemplo, por inyección, para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada. Este procedimiento de administración permite la estimulación de la respuesta inmunitaria con una exposición mínima del sujeto o de las células del sujeto a los glucolípidos bacterianos.

55 **[0036]** La activación de los linfocitos NKT puede emplearse también en procedimientos para modular la autoinmunidad o inhibir la hipersensibilidad inducida por alérgenos. Para estos tratamientos concretos, se consideran tanto los procedimientos de administración directa de glucolípidos bacterianos como los procedimientos de transferencia adoptiva.

[0037] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a un mejor entendimiento de la invención. Los materiales y condiciones concretos empleados pretenden ilustrar la invención adicionalmente y no son limitantes del alcance razonable de la misma.

5

Ejemplo 1. Estimulación de linfocitos NKT *in vitro* con bacterias muertas por calor.

[0038] Las cepas bacterianas de *Sphingomonas capsulata* (ATCC 14666) y *Salmonella typhimurium* (R71) se cultivaron en agar de Mueller-Hinton. *Ehrlichia muris* se preparó según describen Ismail, N. y col., J. Immunol. 172, 1786-1800 (2004). Las bacterias se destruyeron por calor mediante la exposición a 74°C durante 2 horas y para la estimulación *in vitro* se usaron $2,5-5 \times 10^6$ equivalentes de UFC por pocillo.

[0039] Los ensayos de estimulación se llevaron a cabo con células esplénicas totales (5×10^5 por pocillo de 200 μ l) o con linfocitos T purificados y células presentadoras de antígenos. Las poblaciones de linfocitos T usadas en los ensayos comprendían células esplénicas de ratón CD1d- α Gal-Cer⁺ separadas (5×10^4 por pocillo de 200 μ l), linfocitos humanos de sangre periférica (PBL) (5×10^5 por pocillo de 200 μ l) (obtenidos después de la centrifugación con Ficoll de sangre heparinizada) o líneas de linfocitos NKT humanos ($2,5 \times 10^5$ por pocillo de 200 μ l). Los linfocitos NKT con V α 24 se derivaron de PBL estimulados con α Gal-Cer y se mantuvieron por tandas de estimulación repetidas con PHA e IL-2 en presencia de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) irradiadas y linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr (EBV) *in vitro*. Las células presentadoras de antígenos fueron células dendríticas derivadas de médula ósea, estimuladas con GMCSF/IL-4 (2 ng/ml y 5 ng/ml, Biosource) y cultivadas hasta $2,5 \times 10^5$ células por pocillo de 200 μ l para los ensayos con ratones y PBMC humanas alogénicas irradiadas, frescas o cultivadas durante cinco días con GMCSF recombinante humano/IL-4 (100 μ g/ml de cada citocina, R&D Systems) (2×10^5 por pocillo de 200 μ l) para los ensayos humanos. Las células se lavaron dos veces y se mantuvieron en inanición durante seis horas en medio solo, antes de su adición a los experimentos de estimulación.

[0040] Los linfocitos NKT se estimularon con bacterias muertas por calor según se indica anteriormente durante 48 horas en placas de 96 pocillos de fondo redondo en medio RPMI 1640 (Biofluids) enriquecido con glutamina, antibióticos, 2-ME 5×10^{-5} M y suero bovino fetal al 10% (estudios con ratones) o suero AB al 5% (estudios con humanos). Las concentraciones de IFN- γ de ratón y humano en el sobrenadante se midieron a las 48 horas con los respectivos kits ELISA (BD Bioscience, límite de detección inferior de 12,5 μ g/ml).

[0041] Las células esplénicas totales se estimularon durante seis días con 5×10^6 bacterias muertas por calor o 100 ng/ml de α Gal-Cer y la frecuencia de linfocitos NKT CD1d- α Gal-Cer⁺ se determinó en el momento de la estimulación y dos, cuatro y seis días después de la estimulación.

[0042] A los seis días después de la estimulación se llevaron a cabo los procedimientos de marcado y tinción con CD1d- α Gal-Cer, CFSE y α B220 (BD Pharmingen) y las células se analizaron por citometría de flujo (FACS). Para generar tetrámeros de CD1d- α Gal-Cer se incubó una mezcla de 5 μ l de α Gal-Cer (a partir de una disolución madre de DMSO de 1 mg/ml), 10 μ l de Tween 20 al 0,5% en PBS, 10 μ l de CD1d biotinilado (1 mg/ml) y 75 μ l de PBS a 37°C durante una hora y las moléculas CD1d cargadas con lípidos se purificaron por diálisis por centrifugación y se complejaron con estreptavidina-APC. Benlagha, K. y col., J. Exp. Med. 191, 1895-1903 (2000). Las células se analizaron en un aparato FACSCalibur (BD Biosciences) con el programa CellQuest.

[0043] Los resultados se presentan en las figuras 1A-C. Los linfocitos NKT de ratón separados mediante tetrámeros de CD1d y cocultivados con DC CD1^{+/-} o CD1^{-/-} frescas derivadas de médula ósea secretaron IFN- γ de manera dependiente de CD1d tras la estimulación con *Sphingomonas* y *Ehrlichia* muertas por calor, así como por *Salmonella* y α Gal-Cer como control (figura 1A, izquierda). De manera similar, los linfocitos NKT humanos cocultivados con DC derivadas de PBMC secretaron IFN- γ de manera dependiente de CD1d tras la estimulación, en que la dependencia de CD1d se ilustró mediante bloqueo con 1 μ g/ml de anticuerpos dirigidos contra CD1d o IgG1 como control (figura 1A, derecha). Las suspensiones de células esplénicas totales cultivadas en presencia de bacterias muertas por calor durante seis días mostraron una marcada expansión y proliferación de linfocitos NKT, solo ligeramente inferior a la inducción con α Gal-Cer pura (figura 1B-C).

55 Ejemplo 2. Requerimientos diferenciales para la respuesta de IFN- γ a *Sphingomonas* y *Ehrlichia* con respecto a *Salmonella*.

[0044] Se estimularon células esplénicas totales cocultivadas con DC del genotipo *MyD88*^{-/-}, *Trif*^{ps2/ps2} y *MyD88*^{-/-}*Trif*^{ps2/ps2} (sin uno o ninguno de los dos adaptadores MyD88 y TRIF para la señalización TLR) o CD1^{-/-}

durante 48 horas con 5×10^6 células muertas por calor de *Salmonella*, *Sphingomonas* o *Ehrlichia*. Las concentraciones de IFN- γ humano y de ratón en el sobrenadante se midieron a las 48 horas con los respectivos kits ELISA (BD Bioscience, límite de detección inferior de 12,5 $\mu\text{g/ml}$).

- 5 **[0045]** Se sometieron DC a un pulso de bacterias muertas por calor preparadas según se describe en el ejemplo 1 y se añadieron a preparaciones de linfocitos NKT humanos en presencia de IB4 (isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia*) (Vector Laboratories) que se une al disacárido terminal de iGb3, pero no se une a $\alpha\text{Gal-Cer}$. La producción de IFN- γ se midió a las 48 horas.
- 10 **[0046]** Se sometieron DC *Hexb*^{-/-}, que no pueden generar iGb3 en los lisosomas porque carecen de la β -hexosaminidasa que se necesita para eliminar la GalNAc terminal de iGb4, el precursor de iGb3, a un pulso de bacterias muertas por calor según se describe anteriormente y se añadieron a cultivos de linfocitos NKT. La producción de IFN- γ se midió a las 48 horas.
- 15 **[0047]** Los resultados se presentan en las figuras 2A-C. En el ensayo con el cultivo de células esplénicas totales, la inducción de IFN- γ por *Salmonella* se redujo notablemente al 2-15% del control, como media, en ausencia de uno o de los dos adaptadores de TLR (figura 2A). En marcado contraste, la respuesta esplénica de IFN- γ a *Ehrlichia* y *Sphingomonas*, que no contienen LPS, fue en gran medida independiente de MyD88 y TRIF. Las células esplénicas CD1d^{-/-} sin linfocitos NKT no respondieron a *Sphingomonas* ni a *Ehrlichia*, mientras que la respuesta a
- 20 *Salmonella* solo se redujo marginalmente (figura 2A, izquierda). Igualmente, los linfocitos NKT naturales cocultivados con DC deficientes en MyD88 respondieron a *Sphingomonas* y *Ehrlichia*, pero no a *Salmonella* (figura 2A, derecha). En conjunto, estos resultados sugieren que en células esplénicas totales expuestas a *Salmonella* muerta por calor, la producción de IFN- γ se inició después de la señalización TLR de las células presentadoras de antígenos y el subsiguiente reclutamiento de linfocitos NKT, así como de otros tipos de linfocitos como los linfocitos NK. En
- 25 contraste, la estimulación de IFN- γ por *Ehrlichia* y *Sphingomonas* fue dependiente principalmente de los linfocitos NKT y de CD1d, con una mínima contribución de TLR.

[0048] De manera similar, la unión de la lectina IB4 no perjudicó la estimulación de los linfocitos NKT por DC sometidas a un pulso de *Ehrlichia* o *Sphingomonas* muertas por calor, lo que es consistente con el reconocimiento

30 directo de un antígeno microbiano distinto. Sin embargo, las lectinas bloquearon fácilmente la estimulación por *Salmonella* (figura 2B), lo que sugiere que la iGb3 endógena es el probable ligando para la respuesta de los linfocitos NKT a *Salmonella*.

[0049] Las DC *Hexb*^{-/-} sometidas a un pulso de *Ehrlichia* o *Sphingomonas* muertas por calor estimularon a los

35 linfocitos NKT al igual que las DC naturales (figura 2C). Por el contrario, las DC *Hexb*^{-/-} sometidas a un pulso de *Salmonella* no estimularon a los linfocitos NKT.

[0050] En conjunto, los resultados identifican el ligando endógeno iGb3, más que un antígeno microbiano, como la diana de los linfocitos NKT en su respuesta a la infección con *Salmonella*.

40

Ejemplo 3. Respuesta estimulante de los linfocitos NKT a antígenos glucolipídicos sintéticos.

[0051] Se sintetizaron α -glucuronosilceramida (PBS-30) y α -galacturonosilceramida (PBS-59), derivadas de antígenos conocidos de la membrana celular de *Sphingomonadaceae*, según se describe en el ejemplo 5. PBS-50,

45 una β -glucuronosilceramida se usó como compuesto de control. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la figura 3A.

[0052] Se midieron las propiedades inmunológicas de los compuestos anteriores en linfocitos NKT. Se cocultivaron linfocitos NKT humanos con V α 24-J α 18 y linfocitos NKT de ratón recién purificados con DC sometidas

50 a un pulso de $\alpha\text{Gal-Cer}$ o un glucolípido sintético a concentraciones en el intervalo de 0,001 a 1.000 ng/ml. La producción de IFN- γ se midió a las 48 horas según se describe anteriormente.

[0053] Se prepararon tetrámeros de CD1d según se describe en el ejemplo 1 con los glucolípidos sintéticos PBS-30, PBS-59 y PBS-50 y $\alpha\text{Gal-Cer}$ y se usaron para teñir linfocitos NKT humanos y células esplénicas de ratón.

55

[0054] Los resultados se muestran en las figuras 3B-C. La α -glucuronosilceramida (PBS-30) y, en menor grado, la α -galacturonosilceramida (PBS-59) activaron fuertemente la proliferación de linfocitos NKT humanos y de ratón, así como la secreción de IFN- γ , mientras que la β -glucuronosilceramida de control (PBS-50) no mostró activación (figura 3B). Los tetrámeros de CD1d- α -glucuronosilceramida (PBS-30) teñieron todos los linfocitos NKT

humanos y aproximadamente el 25% de los linfocitos NKT de ratón (figura 3C). Por lo tanto, estos resultados revelan que los lípidos que sustituyen a los LPS en la pared celular de algunas especies de bacterias gramnegativas pueden ser reconocidos directamente por los TCR conservados de los linfocitos NKT de tipo innato.

5 Ejemplo 4. Papel de los linfocitos NKT *in vivo* durante la infección microbiana.

10 [0055] Los ratones CD1d^{-/-} se generaron en la Universidad de Chicago (EE. UU.), los ratones Jα18^{-/-} se obtuvieron del Dr. Taniguchi, Universidad de Chiba (Japón) y los ratones *Hexb*^{-/-} se obtuvieron de R. Proia, Institutos Nacionales de la Salud (EE. UU.). Todos los ratones tenían el fondo genético C57/BL6. En todos los casos, las crías de la misma camada obtenidas de apareamientos heterocigotos se genotipificaron por PCR y se usaron para el análisis comparativo. Todos los ratones se criaron en un entorno sin patógenos en la Universidad de Chicago, de acuerdo con las directrices del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales.

15 [0056] Se inocularon por vía intravenosa 100 μl de *Sphingomonas* (1 x 10⁷), *Ehrlichia* (1 x 10⁸) o *Salmonella* (1 x 10⁶) suspendidas en PBS en ratones C57/BL6 de seis a siete semanas de edad. A las 24 horas después de la infección, los linfocitos NKT seleccionados como tetramero⁺/B220⁻ se analizaron por FACS con respecto al CD69 superficial (antígeno de activación temprana de linfocitos T) y el IFN-γ intracelular. Los resultados, mostrados en la figura 4A, confirman que los linfocitos NKT se activan y secretan IFN-γ dentro de un plazo de 24 horas después de la infección *in vivo*.

20 [0057] Para determinar si se requiere *hexb* para el procesamiento antigénico en respuesta a una infección con *Salmonella* y *Sphingomonas in vivo*, se expusieron crías de la misma camada *Hexb*^{+/-} y *Hexb*^{-/-} por vía intraperitoneal a 5 x 10⁶ células de *Sphingomonas* o *Salmonella*. Dos horas después de la exposición se inyectaron por vía intraesplénica 5 x 10⁶ timocitos transgénicos para Vα14 marcados con CFSE en un volumen de 50 μl (Bendelac, A. y col., J. Exp. Med. 184, 1285-12293 (1996)). A las 24 horas después de la exposición, se llevó a cabo una tinción intracelular del IFN-γ. Los resultados se muestran en la figura 4B. La diferencia entre *Hexb*^{+/-} y *Hexb*^{-/-} solo fue estadísticamente significativa para los ratones expuestos a *Salmonella*, lo que demuestra que la producción de IFN-γ por los linfocitos NKT en respuesta a la infección de *Salmonella* requiere iGb3 lisosómica, mientras que la respuesta de los linfocitos NKT a *Sphingomonas* no requiere iGb3 lisosómica.

30 [0058] Para caracterizar el papel de los linfocitos NKT en el control de la infección *in vivo* se inyectaron 5 x 10⁶ o 1 x 10⁶ células de *Sphingomonas* por vía intravenosa en ratones Jα18^{-/-} y CD1^{-/-} y en los controles de la misma camada. La carga bacteriana en los pulmones se evaluó en los intervalos indicados en la figura 4C. Se llevaron a cabo recuentos de bacterias después de la homogeneización del tejido en Triton X-100 al 0,5% y se cultivaron para la formación de colonias. Los resultados demuestran que tanto los ratones Jα18^{-/-} como los ratones CD1^{-/-} mostraban una eliminación de las bacterias retrasada en comparación con los controles heterocigotos de la misma camada, con una carga bacteriana en el pulmón de hasta 12-24 veces mayor en los puntos de tiempo tempranos.

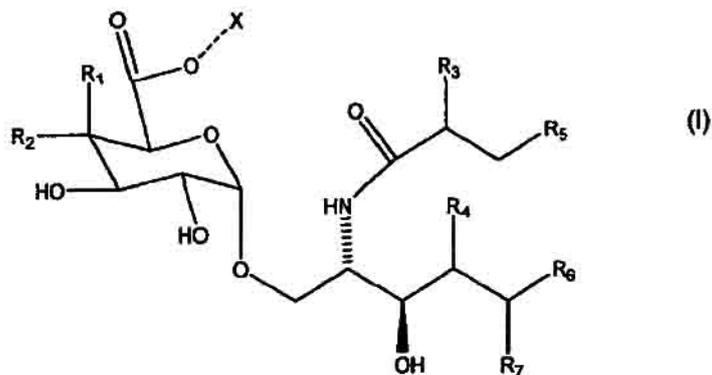
40 [0059] Para los experimentos de supervivencia, se inyectó una alta dosis de 5 x 10⁸ células de *Sphingomonas* por vía intravenosa en ratones Jα18^{-/-} y CD1^{-/-} y en los controles de la misma camada. Cada dos a cuatro horas después de la infección se registraron los ratones muertos o moribundos (sacrificados). Los resultados, mostrados en la figura 4D, demuestran que la infección con una alta dosis de *Sphingomonas* fue rápidamente letal en ratones naturales, mientras que la mayoría de los ratones deficientes en linfocitos NKT sobrevivieron.

45 [0060] Para comprobar si la letalidad estaba asociada con la liberación de citocinas se inyectó *Sphingomonas* (1 x 10⁷) por vía intravenosa en ratones Jα18^{-/-} y CD1^{-/-} y en los controles de la misma camada. A los intervalos especificados en la figura 4E se midieron los niveles de IFN-γ e IL-12 p40 en el suero. Los resultados indican que el resultado letal en los ratones naturales estaba asociado con la liberación explosiva de IFN-γ e IL-12 p40 en el suero, mientras que los ratones deficientes en linfocitos NKT produjeron significativamente menos citocinas.

50 [0061] Para los experimentos de infección con *Ehrlichia*, los ratones se infectaron por vía intraperitoneal con 500 μl de una dilución 10⁻¹ de una suspensión madre de *Ehrlichia muris*. La carga de *Ehrlichia* en los pulmones, el hígado y el bazo de los ratones CD1d^{-/-} y de los controles de la misma camada se determinó por PCR en tiempo real del gen *dsb* de *Ehrlichia* (Ismail, N. y col., J. Immunol. 172, 1786-1800 (2004)) a los dos y siete días después de la infección. Los resultados, presentados en la figura 4F, demuestran que los ratones deficientes en linfocitos NKT se mostraron incapaces de eliminar *Ehrlichia*.

REIVINDICACIONES

1. Un glucolípido de la fórmula (I):



5

en que el glucolípido se selecciona entre los compuestos siguientes:

- PBS-49, en el que X es metilo; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₁₁; R₆ es alquilo C₁₃; y R₇ es -H;
- PBS-45, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₁₁; R₆ es alquilo C₁₃; y R₇ es -H;
- PBS-30, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₁₆; R₆ es alquilo C₁₅; y R₇ es -H;
- PBS-29, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -H; R₄ es -OH; R₅ es alquilo C₂₃; R₆ es alquilo C₁₃; y R₇ es -H;
- PBS-62, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₂₃; R₆ es alquilo C₁₅ que comprende un enlace doble; y R₇ es -H; y
- PBS-65, en el que X es H; R₁ es -H; R₂ es -OH; R₃ es -OH; R₄ es -H; R₅ es alquilo C₁₁; R₆ es alquilo C₁₃ que comprende un grupo ciclopropilo; y R₇ es -H;

para uso en el tratamiento de trastornos infecciosos.

- 2. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, por activación de un linfocito NKT por la puesta en contacto del linfocito NKT con dicho glucolípido complejoado con una molécula CD1d.
- 3. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en que la molécula CD1d es expresada por una célula.
- 4. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en que la célula es una célula presentadora de antígenos.
- 5. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en que la célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.
- 6. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en que la molécula CD1d comprende un tetrámero.
- 7. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, por estimulación de una respuesta inmunitaria.

8. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, por estimulación de una respuesta inmunitaria por linfocitos NKT activados por dicho glucolípido de acuerdo con la reivindicación 2.
- 5 9. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, por estimulación de una respuesta inmunitaria por células presentadoras de antígenos CD1d⁺ puestas en contacto con dicho glucolípido.
10. El glucolípido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en que la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria antimicrobiana.
- 10 11. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en que la respuesta antimicrobiana es eficaz para inhibir el crecimiento de un micorganismo.
12. El glucolípido para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en que el microorganismo se selecciona
15 del grupo que consta de un virus, una bacteria y un parásito.
13. Una composición de vacuna que comprende una vacuna y un coadyuvante, en que el coadyuvante comprende un glucolípido de la fórmula (I), según se define en la reivindicación 1, o una combinación de un glucolípido de la fórmula (I), según se define en la reivindicación 1, y una cantidad eficaz de linfocitos NKT activados
20 de acuerdo con la reivindicación 2.

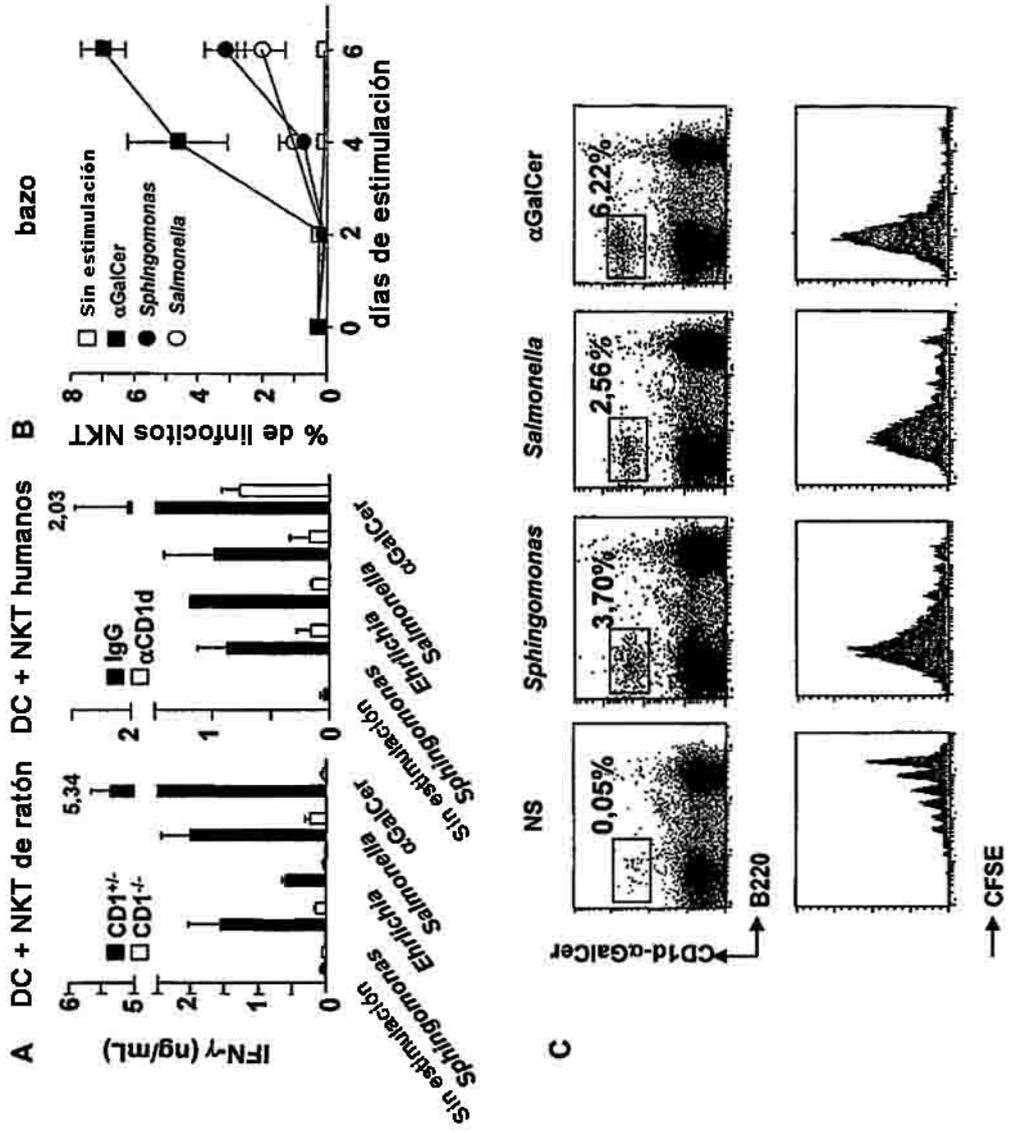
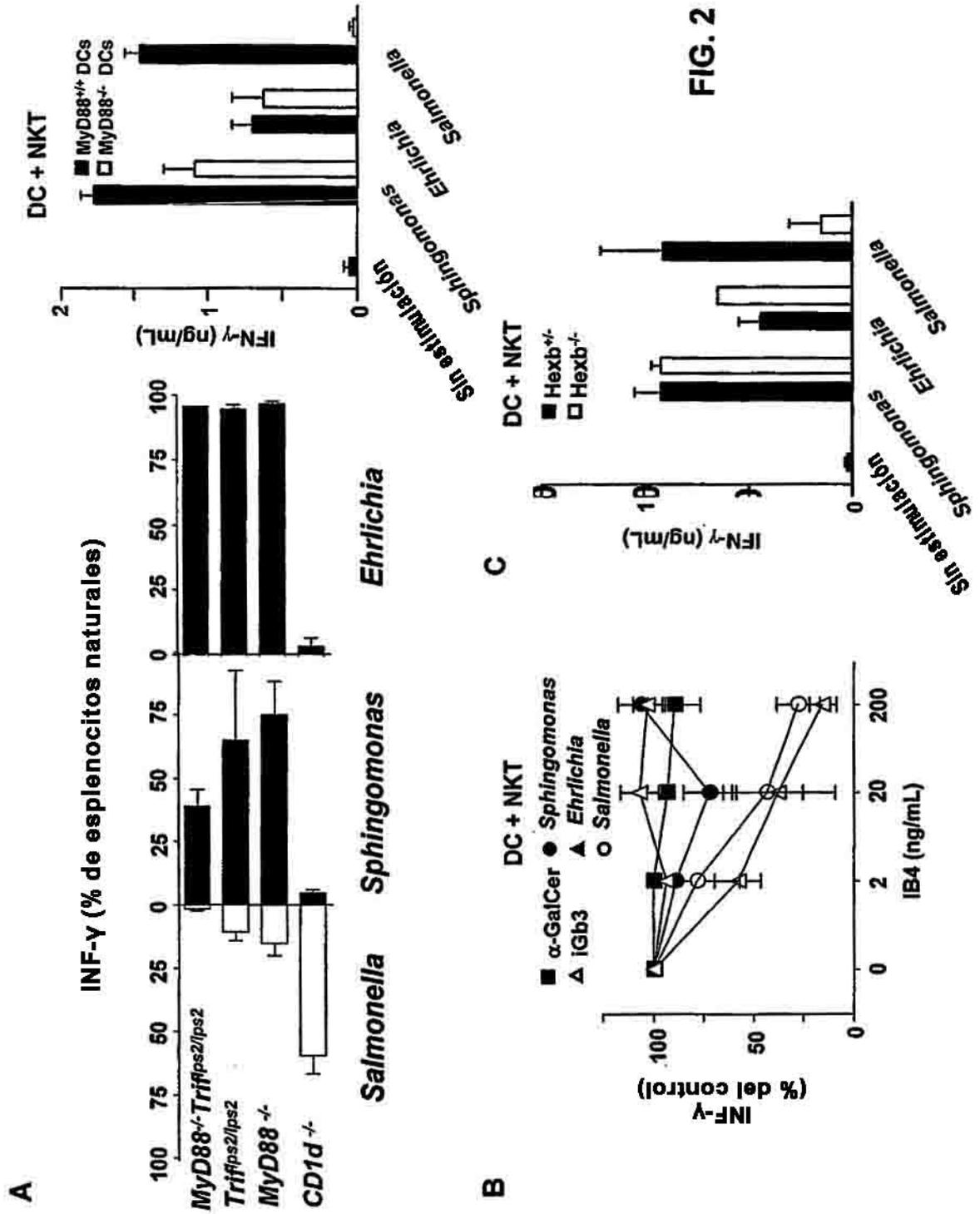
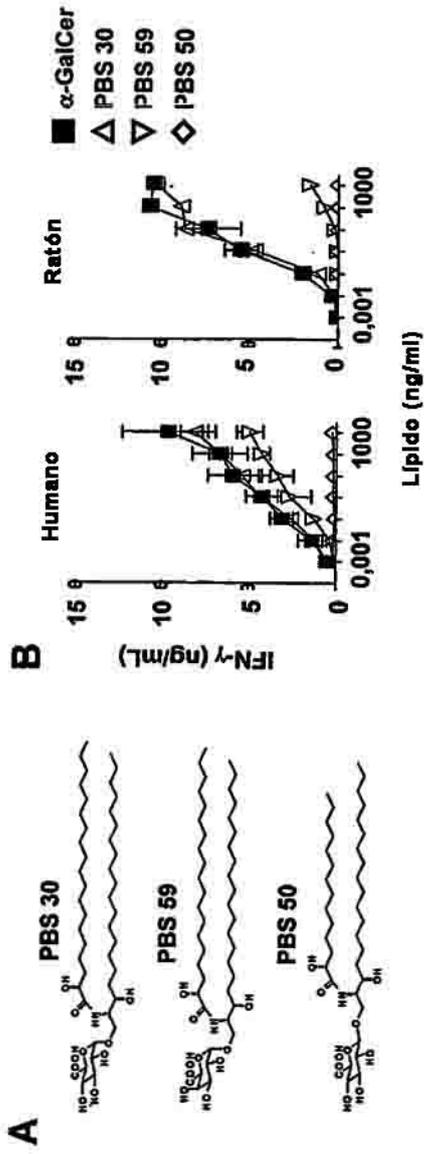


FIG. 1





C

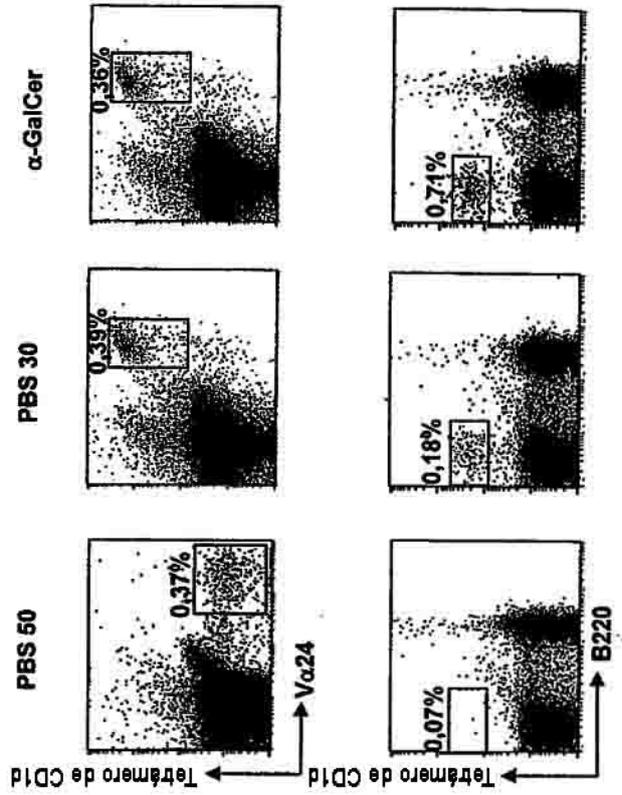


FIG. 3

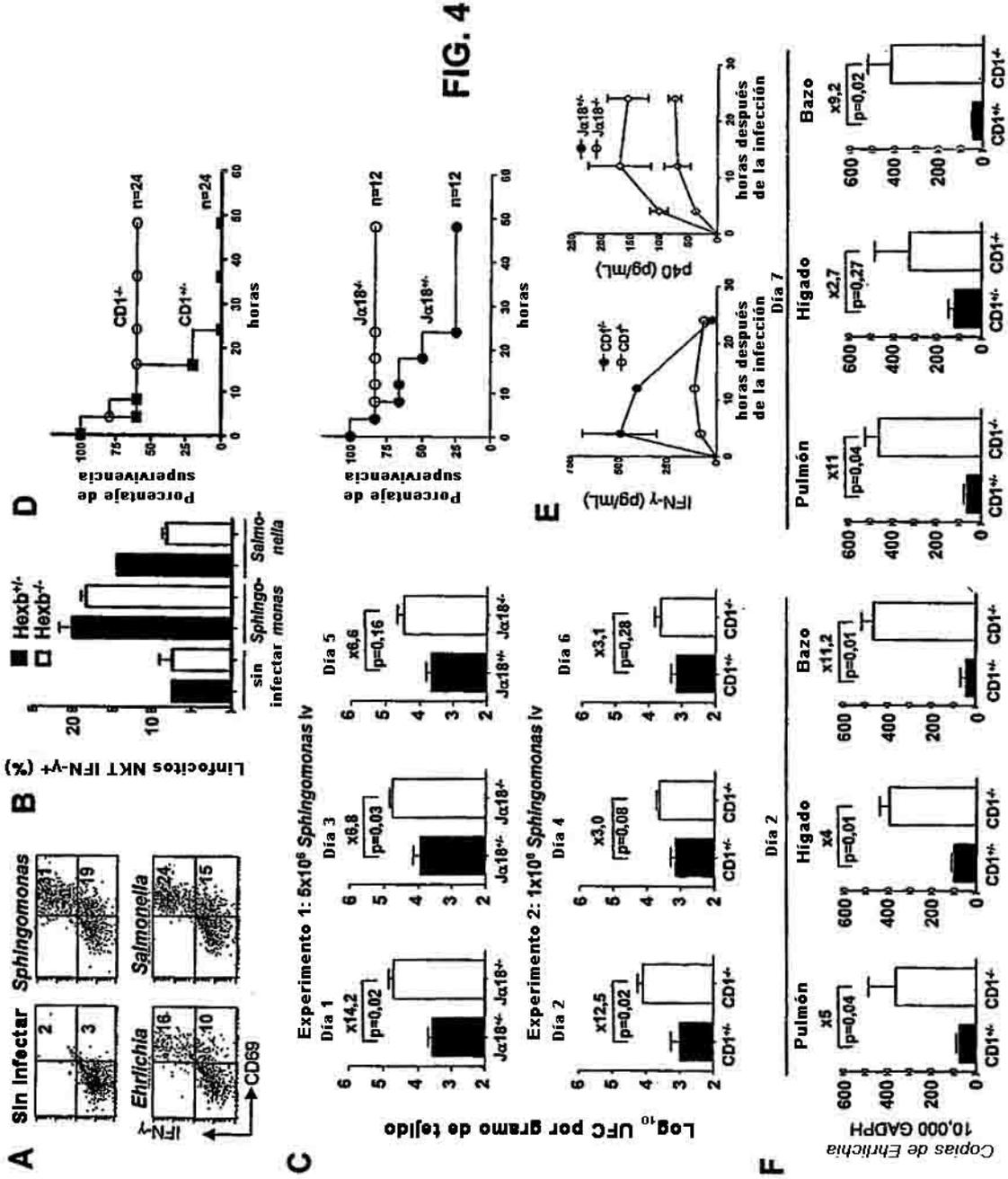


FIG. 4

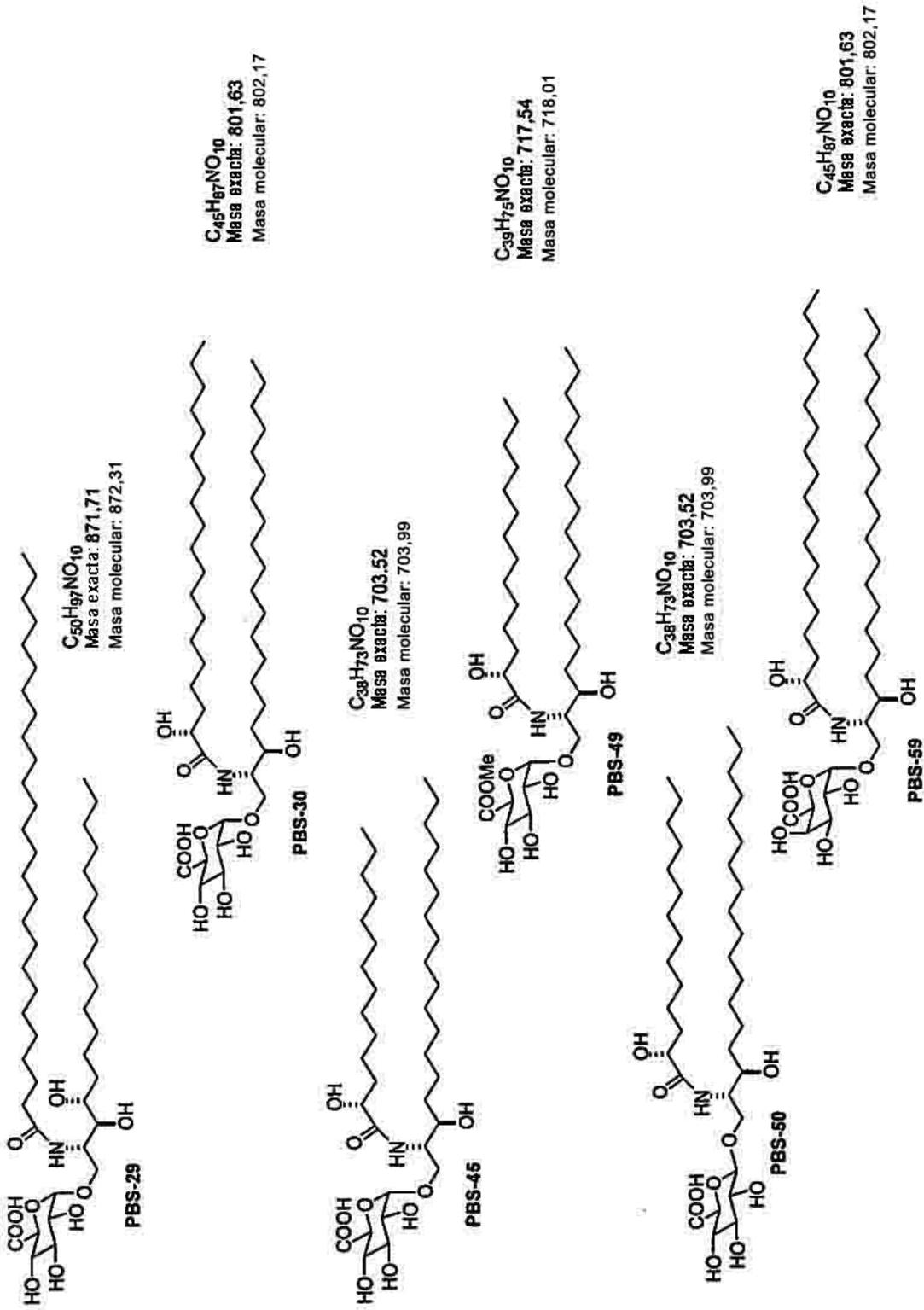


FIG. 5

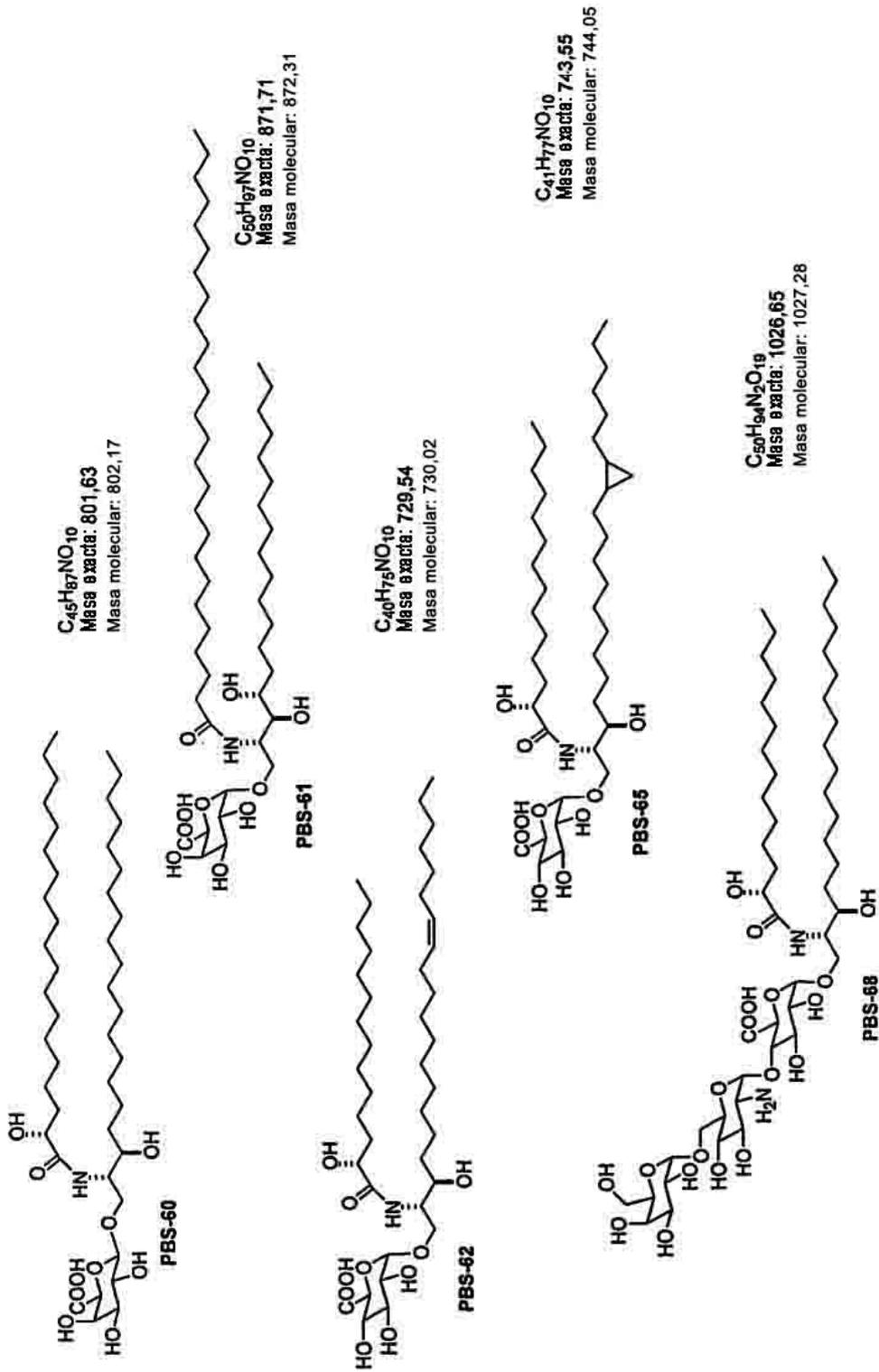
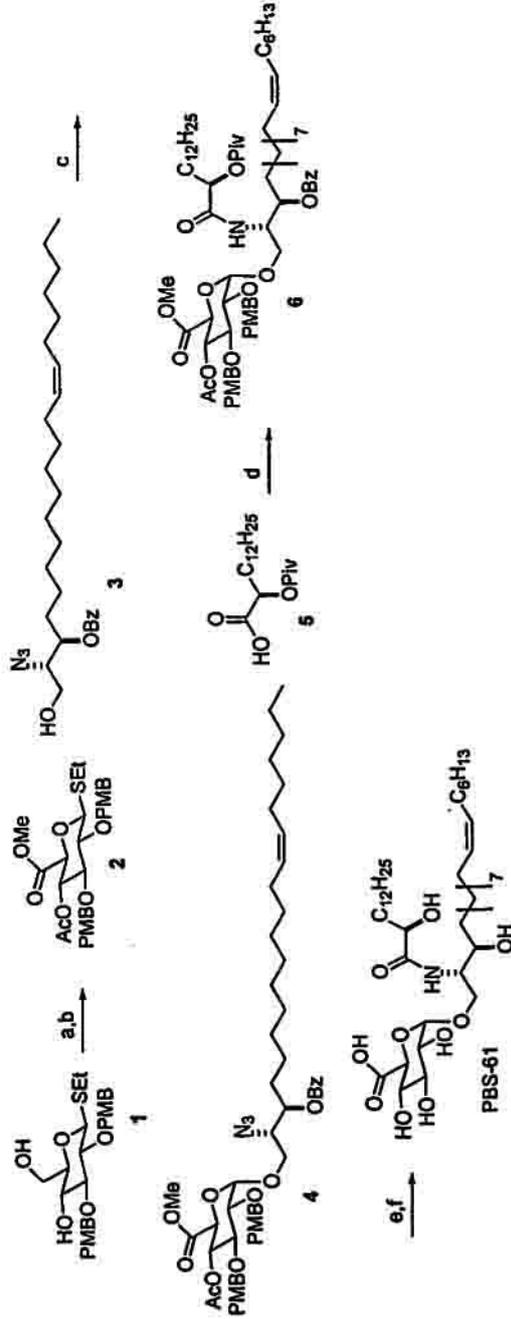


FIG. 5 (cont.)



Reactivos (rendimientos entre paréntesis): (a) 1) diacetato de yodobenceno (BAIB), resto 2, 2, 6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO), CH₂Cl₂, H₂O, 2) CH₂N₂, CH₂Cl₂ (39%); (b) Ac₂O, Et₃N, dimetilaminopiridina (DMAP), CH₂Cl₂ (87%); (c) trifluorometanosulfonato de dimetil(metilio)sulfonio (DMTST), 2,6-di-terc-butil-4-metilpiridina, tolueno (20%); (d) 1) H₂S, piridina, H₂O, 2) 5-diciclohexilcarbodiimida (DCC), DMAP, CH₂Cl₂ (28%); (e) ácido trifluoroacético (TFA), tetrahidrofurano (THF), H₂O (rendimiento del 56%); (f) NaOMe, THF, MeOH, H₂O (87%).
 Abreviaturas: PMB = p-metoxibenzoato, Piv = pivaloilo, Bz = benzoilo.

FIG. 6