

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 127**

51 Int. Cl.:

A61K 31/35 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C07D 309/10 (2006.01)

C07H 5/06 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2008 E 08872320 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2231145**

54 Título: **Utilización de las glicosilceramidas para aumentar la respuesta inmunitaria a los antígenos**

30 Prioridad:

05.12.2007 US 992460 P

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

17.12.2014

73 Titular/es:

**ABIVAX (100.0%)
5 rue de la Baume
For all designated states, FR**

72 Inventor/es:

SERRA, VINCENT

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 525 127 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

Utilización de las glicosilceramidas para aumentar la respuesta inmunitaria a los antígenos

5 **Introducción**

El fin fundamental de una vacuna es proporcionar inmunidad duradera frente a una afección patológica. Idealmente, las vacunas proporcionan anticuerpos funcionalmente activos, provocan inmunidad mediada por células, y activan linfocitos T y B con reactividad altamente específica así como "memoria" para proporcionar protección frente a encuentros posteriores con el antígeno.

Los adyuvantes son aditivos de la vacuna que aumentan de forma no específica la respuesta inmunitaria. Los mecanismos mediante los cuales los adyuvantes aumentan el sistema inmunitario varían ampliamente. Los adyuvantes se pueden clasificar como sistemas "inmunomoduladores" o "de suministro de antígenos". Los adyuvantes inmunomoduladores sensibilizan al sistema inmunitario al regular la acción de células inmunitarias a través de la alteración de la producción de linfocina. Por otro lado, los sistemas de suministro de antígenos funcionan suministrando el antígeno a las células inmunitarias apropiadas. Además, los adyuvantes pueden aumentar la velocidad o duración de una respuesta inmunitaria, modular la avidéz del anticuerpo, especificidad, distribución de isotipos o subclases, estimular la inmunidad mediada por células, promover la inmunidad mucosal, o aumentar las respuestas inmunitarias en individuos inmunológicamente inmaduros o senescentes. Los adyuvantes pueden afectar a la respuesta inmunitaria innata, humoral o mediada por células, o una combinación de las mismas.

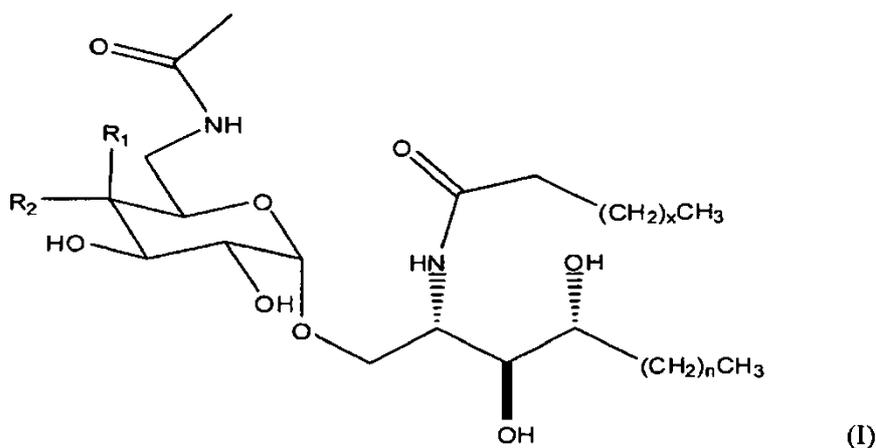
El documento WO 2007/118234 describe ciertos compuestos derivados de galactosilceramidas. Este documento también describe métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprenden administrar estos compuestos, opcionalmente en combinación con un antígeno. Sin embargo, en este documento no se especifica la inducción del tipo diferente de respuesta.

Long et al. (2007, Nature Biology, 3:559-564) describen la síntesis de otros derivados de galactosilceramidas, y muestran que pueden inducir activación de células NKT *in vitro*.

Liu et al. (2006, Journal of Immunological methods, 312:34-39) muestran que dos derivados de galactosilceramidas, PBS-57 y KRN 7000, son desigualmente eficientes estimulando células NKT *in vitro* e induciendo la liberación de citocinas *in vivo*.

35 **Sumario de la invención**

Se ha descubierto que un glicolípido sintético de una clase particular, cuando se usa en combinación con una preparación de vacuna, es capaz de activar respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares cuando se administra a un sujeto. En consecuencia, la invención proporciona composiciones que comprenden compuestos de fórmula I, en el que la fórmula I se muestra a continuación:



en la que R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de H o OH , x es un número entero de 18 a 26, y n es un número entero de 10 a 15. También se proporcionan composiciones que incluyen el compuesto de fórmula I y un antígeno.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto frente a un antígeno al administrar una composición que incluye el compuesto de fórmula I y un antígeno. La respuesta inmunitaria aumentada puede ser una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta de linfocitos T CD4+, una

respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8+, o activación de células presentadoras de antígeno (APCs). La respuesta inmunitaria del sujeto está aumentada con respecto a un control apropiado.

En un aspecto adicional, las composiciones de la invención se administran intramuscularmente.

5

Breve descripción de las figuras

10

La figura 1 es una gráfica que representa el porcentaje de lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados intravenosamente (IV) con PBS-96, PBS-14 o PBS-11, con o sin Ova.

15

La figura 2 es una gráfica que representa el porcentaje de lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados IV con α GalCer, PBS-57, PBS-96 o PBS-14, con o sin Ova.

20

La figura 3 es una gráfica que representa la lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados intramuscularmente (IM) con α GalCer, PBS-57, PBS-96 o PBS-14, con o sin Ova.

25

La figura 4A es una gráfica que representa la acumulación de IFN γ en sueros de ratones 24 horas tras la inoculación con concentraciones variables de PBS-57. La figura 4B es una gráfica que representa la acumulación de IFN γ en sueros de ratones 24 horas tras la inoculación con concentraciones variables de PBS-14. La figura 4C es una gráfica que representa la acumulación de IFN γ en sueros de ratones 24 horas tras la inoculación con concentraciones variables de PBS-96. La figura 4D es una gráfica que representa la acumulación de IFN γ en sueros de ratones 24 horas tras la inoculación con concentraciones variables de α GalCer.

30

La figura 5 es una gráfica que compara la acumulación de IFN γ en los sueros de ratones 24 horas tras la inoculación con 100 ng de PBS-57, PBS-96, PBS-14 o PBS-11.

35

La figura 6 es una gráfica que representa la lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados IV con PBS-11, PBS-57, PBS-96 o PBS-14, con o sin Ova.

40

La figura 7 es una gráfica que muestra la lisis específica de células diana específicas de OVA en ratones inyectados IM con 100 ng del adyuvante indicado, con o sin OVA.

45

La figura 8 es una gráfica que muestra la lisis específica de células diana específicas de OVA en ratones inyectados IM con 10 ng del adyuvante indicado, con o sin OVA.

50

La figura 9 es una gráfica que muestra porcentajes de linfocitos T CD8+ sensibles al pentámero SIINFEKL en ratones inyectados IM con 1 μ g del adyuvante indicado, con o sin OVA.

55

La figura 10 es una gráfica que muestra porcentajes de linfocitos T CD8+ sensibles al pentámero SIINFEKL en ratones inyectados IM con 100 ng del adyuvante indicado, con o sin OVA.

60

La figura 11 es una gráfica que muestra títulos de IgG1 en la sangre de ratones inyectados IM con 100 ng del adyuvante indicado, con o sin OVA.

65

La figura 12 es una gráfica que muestra títulos de IgG2a en la sangre de ratones inyectados IM con 100 ng del adyuvante indicado, con o sin OVA.

La figura 13 representa fórmulas estructurales para PBS-14, PBS-96, PBS-11, PBS-57 y α GalCer.

Descripción detallada de varias formas de realización

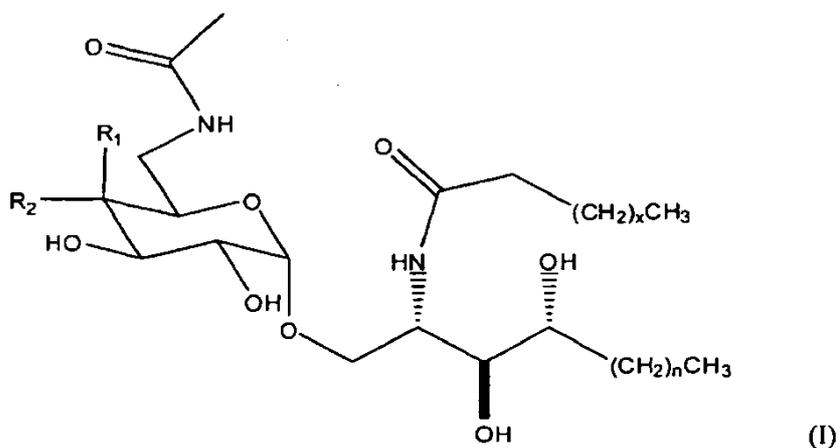
Los adyuvantes aumentan la inmunogenicidad de antígenos en preparaciones de vacuna de distintas maneras. Un adyuvante eficaz también sería útil para la combinación con una amplia variedad de antígenos para aumentar la respuesta inmunitaria provocada por la administración del antígeno. Por ejemplo, en el caso de toxinas, se requiere una buena respuesta inmunitaria humoral. En el caso de bacterias intracelulares, es importante una respuesta mediada por células, mediada principalmente por linfocitos T citotóxicos y células Th1. En el caso de infecciones víricas, las respuestas tanto humorales como celulares son fundamentales para controlar la infección. La capacidad de un adyuvante para aumentar no sólo la respuesta inmunitaria humoral sino también la respuesta inmunitaria mediada por células incrementa la probabilidad de desarrollar inmunidad de larga duración.

Se han investigado especies lipídicas en busca de propiedades adyuvantes. Un número de moléculas lipídicas naturales y sintéticas son procesadas por células presentadoras de antígeno y presentadas por moléculas CD1 a células NKT. El compuesto prototípico usado para estudiar la activación de células NKT *in vitro* e *in vivo* es KRN7000, una α -galactosilceramida (" α GalCer") derivada de la esponja marina *Agelas mauritanus*. Los compuestos

adicionales recientemente identificados incluyen isoglobotrihexosilceramida ("IGB3"), que es un glicolípido endógeno, y 6"amino6"desoxigalactosilceramidas modificadas, como se describe en la Solicitud PCT PCT/US07/66250. Estos compuestos activan células NKT y aumentan las respuestas de citocinas *in vitro*. Sin embargo, en el contexto de vacunaciones *in vivo*, poco se conoce con respecto a la eficacia de la capacidad adyuvante de lípidos para estos compuestos.

Se ha descubierto que los glicosfingolípidos de fórmula I, que contienen un grupo amino y una cadena de ácido graso saturada, presenta inesperadamente la capacidad para estimular tanto una respuesta inmunitaria mediada por células como una respuesta inmunitaria humoral *in vivo*. Además, los compuestos de fórmula I pueden estimular una respuesta inmunitaria frente a un antígeno nominal débil para producir anticuerpos y proporcionar simultáneamente una lisis mediada por células de células que expresan antígenos de superficie específicos. Se mostró que dos compuestos de fórmula I, denominados PBS-96 y PBS-14, estimulan tanto respuestas inmunitarias mediadas por células como humorales *in vivo*. Estos compuestos también estimularon una respuesta inmunitaria frente a un antígeno nominal débil para producir anticuerpos y provocar una respuesta mediada por células. Además, se descubrió que estos compuestos estimulan una respuesta más potente cuando se inyectaron intramuscularmente o a dosis más bajas en comparación con otros glucoesfingolípidos tales como PBS-57 y α GalCer.

En una forma de realización, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula I, en el que la fórmula I es:



en la que R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de $-H$ o $-OH$, x es un número entero de 18 a 26, y n es un número entero de 10 a 15. Los compuestos de fórmula I presentan adecuadamente un grupo amida en la posición C6 de la molécula de galactosa o de glucosa, y una cadena acílica saturada en la porción cerámica del compuesto. La composición puede incluir además un vehículo fisiológico aceptable. Un vehículo "fisiológicamente aceptable" es cualquier vehículo que es adecuado para la administración *in vivo* (por ejemplo, administración oral, transdérmica o parenteral) o uso *in vitro*, es decir, cultivo celular. Los vehículos fisiológicamente aceptables adecuados para administración *in vivo* incluyen agua, disoluciones tamponadas y disoluciones de glucosa, entre otras. Los componentes adicionales de las composiciones pueden incluir excipientes tales como estabilizantes, conservantes, diluyentes, emulsionantes o lubricantes, además del vehículo fisiológicamente aceptable. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, Tween 20, DMSO, sacarosa, L-histadina, polisorbato 20 y suero. Adecuadamente, el compuesto de fórmula I se formula en un liposoma. Adecuadamente, el liposoma es un tipo SUV compuesto de fosfatidilcolina (PC)/fosfatidilglicerol (PG)/colesterol en una relación de 8 μ moles/2 μ moles/5 μ moles/1 mg. Los expertos en la materia apreciarán que el compuesto de fórmula I se puede formular de muchas maneras para la administración a un sujeto.

En otra forma de realización, la invención proporciona métodos para aumentar una respuesta inmunitaria frente a un antígeno en un sujeto administrando una composición que contiene el compuesto de fórmula I y el antígeno. Como se usa en la presente memoria, un "sujeto" es un mamífero, por ejemplo un ratón, o más adecuadamente un ser humano. "Aumentar la respuesta inmunitaria" se refiere a la capacidad del compuesto para aumentar la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células de un sujeto frente al antígeno en relación con un control adecuado. La activación incrementada de células presentadoras de antígeno también está incluida como una respuesta inmunitaria aumentada del sujeto. Con el fin de determinar si la respuesta inmunitaria está aumentada con respecto a un control, una comparación cuantitativa de la señal en una muestra procedente de un sujeto vacunado con antígeno y el compuesto se puede comparar con la señal en una muestra procedente de un sujeto vacunado con antígeno solo. La respuesta inmunitaria frente al antígeno se puede medir de muchas maneras, que resultarán evidentes para el experto en la materia. En los ejemplos, la respuesta inmunitaria se mide por medio de un ensayo de lisis de células específicas citotóxicas, un ensayo de unión a pentámero, o un ensayo ELISA, que resultan evidentes para los expertos en la materia.

En las formas de realización particulares, la respuesta inmunitaria está aumentada al menos 25%, al menos 30%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 150%, al menos 200%, al menos 400%, al menos 500%, al menos 750% o al menos 1000%, con respecto a un control adecuado. Un control adecuado es un sujeto al que se le ha administrado un antígeno pero no una composición de la invención. El porcentaje de aumento se puede calcular usando la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{\text{valor que representa la respuesta inmunitaria del sujeto tras el tratamiento con composición que contiene el compuesto de fórmula I} - \text{valor que representa la respuesta inmunitaria de control}}{\text{valor que representa la respuesta inmunitaria del sujeto tras el tratamiento con composición que contiene el compuesto de fórmula I}} \right] \times 100.$$

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “administración”, “coadministración” y “coadministrar” se refieren a la administración del adyuvante y el antígeno concurrentemente, es decir, simultáneamente en el tiempo, o secuencialmente, es decir, la administración del adyuvante seguido de la administración del antígeno, o la administración del antígeno seguido de la administración del adyuvante. Tras la administración del adyuvante o del antígeno, el otro componente se puede administrar sustancialmente de forma inmediata después o tras un período de tiempo eficaz posteriormente; el período de tiempo eficaz es la cantidad de tiempo dada para la obtención del máximo beneficio a partir de la administración de los componentes. Alternativamente, el adyuvante y el antígeno se pueden coformular.

El antígeno puede ser un polipéptido, polinucleótido, o resto de hidrato de carbono, o sus combinaciones, por ejemplo una glicoproteína. El antígeno deriva adecuadamente de un agente infeccioso (por ejemplo, un microorganismo patógeno), un tumor, una molécula endógena (por ejemplo, una molécula “propia”), o, para los fines de estudio, un antígeno nominal, tal como ovoalbúmina (denominada en la presente memoria “OVA”). Adecuadamente, el antígeno está comprendido en una vacuna. Las composiciones de vacuna se formulan adecuadamente para incluir la composición de fórmula I. “Vacuna” se refiere a una composición que, cuando se administra a un sujeto, induce respuestas inmunitarias celulares o humorales. Las composiciones farmacéuticas usadas en conjunción con la invención incluyen adecuadamente el compuesto de fórmula I y una vacuna. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas usadas en conjunción con la invención incluyen adecuadamente PBS-96 y un antígeno, o PBS-14 y un antígeno. Las estructuras de PBS-96 y PBS-14 se muestran en la figura 13. PBS-96 y PBS-14 activan células NKT *in vitro* e *in vivo*. Tanto PBS-96 como PBS-14 contienen un grupo amida en la posición C6 de la galactosa, y una cadena acílica saturada en la porción cerámica del compuesto. PBS-96 y PBS-14 aumentan la respuesta de linfocitos T CD8+ frente a un antígeno, y PBS-96 y PBS-14 inducen la liberación de IFN γ *in vivo*. Además, PBS-96 y PBS-14 son inesperadamente superiores a otros glicoesfingolípidos cuando se usan a menores concentraciones, y también cuando se inyectan intramuscularmente.

Las composiciones que incluyen compuestos de fórmula I se pueden formular usando una variedad de métodos preparativos e ingredientes inactivos conocidos por los expertos en la materia. (Remington’s Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (2000), que se incorpora en la presente memoria como referencia). Las composiciones de la invención también pueden contener un sistema de suministro de antígeno adecuado para dirigir al antígeno hacia células inmunitarias. Los sistemas de suministro de antígeno son conocidos en la técnica, pero incluyen de manera no limitativa MVA (virus de ankara modificado), adenovirus, lentivirus, subunidad translocada de la toxina de pertussis o shiga, o antígeno encapsulado en liposomas. Las dosis eficaces del compuesto de fórmula I en una composición de vacuna se pueden determinar por los expertos en la materia, pero típicamente oscilan de aproximadamente 1 nanogramo a aproximadamente 10.000 microgramos por kilogramo de peso corporal, aunque típicamente son de aproximadamente 1.000 microgramos o menos por kilogramo de peso corporal. En algunas formas de realización, la dosis eficaz oscila de aproximadamente 10 nanogramos a aproximadamente 1.000 microgramos por kilogramo de peso corporal. En otra forma de realización, la dosis eficaz oscila de aproximadamente 100 nanogramos a aproximadamente 500 microgramos por kilogramo de peso corporal. En otra forma de realización, la dosis eficaz oscila de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 250 microgramos por kilogramo de peso corporal. Para los fines del estudio, una dosis adecuada para un ratón es de 1 ng a 1 μ g de compuesto de fórmula I por 100 μ l de dosis, dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, una dosis de aproximadamente 100 ng es adecuada para inyección intravenosa en un ratón, y se ha demostrado que una dosis tan pequeña como 10 ng es eficaz para la inyección intramuscular. La composición que comprende el compuesto de fórmula I se puede administrar en una única dosis, o se puede dividir en múltiples dosis a lo largo de un período de semanas o meses.

En las composiciones se pueden incluir uno o más antígenos, o se pueden formular independientemente. Como se utiliza en la presente memoria, un “antígeno” se refiere a una molécula que estimula una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se ha administrado. Se apreciará que la dosis de antígeno dependerá del antígeno específico, y de la edad y estado inmunitario del sujeto, así como de otros factores relevantes que se pueden determinar por los expertos en la materia.

Como antígenos se pueden utilizar microorganismos completos o sus porciones (por ejemplo, restos de membranas; preparaciones de membrana brutas, lisados y otras preparaciones y microorganismos). Adecuadamente, los

antígenos derivan de agentes infecciosos atenuados o muertos. Los agentes infecciosos adecuados a partir de los que se puede obtener un antígeno comprenden de manera no limitativa patógenos y microorganismos tales como bacterias, parásitos y virus. En algunos contextos, los antígenos adecuados se obtienen o derivan de un patógeno vírico que está asociado con una enfermedad humana, incluyendo de manera no limitativa VIH/SIDA (*Retroviridae*, por ejemplo moléculas gp120 para aislados de HIV-1 y HIV-2, HTLV-I, HTLV-11), virus de la gripe (*Orthomyxoviridae*, 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 (*Reoviridae*), infecciones respiratorias (virus de la parainfluenza y virus sincitial respiratorio), poliomielitis (*Picornaviridae*, por ejemplo poliovirus, rinovirus), sarampión y paperas (*Paramyxoviridae*), rubéola (*Togaviridae*, por ejemplo virus de la rubéola), hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis tipos A, B, C, D, E y/o G), citomegalovirus (por ejemplo gB y gH), gastroenteritis (*Caliciviridae*), fiebre amarilla y fiebre del Nilo occidental (*Flaviviridae*), rabia (*Rhabdoviridae*), fiebre hemorrágica coreana (*Bunyaviridae*), fiebre venezolana (*Arenaviridae*), verrugas (Papilomavirus), virus de la inmunodeficiencia del simio, virus de la encefalitis, virus de la varicela zóster, virus de Epstein-Barr, y otras familias de virus, incluyendo *Coronaviridae*, *Birnaviridae* y *Filoviridae*.

Los antígenos bacterianos y parasitarios adecuados también se pueden obtener o derivar de agentes conocidos que provocan una enfermedad, y se pueden usar en composiciones para vacunar frente a enfermedades que incluyen de manera no limitativa difteria, pertussis, tétano, tuberculosis, neumonía bacteriana o fúngica, otitis media, gonorrea, cólera, tifus, meningitis, mononucleosis, plaga, sigelosis o salmonelosis, legionelosis, enfermedad de Lyme, lepra, malaria, elmintosis, oncocercosis, esquistosomiasis, tripanosomiasis, leishmaniasis, giardiasis, amebiasis, filariasis, *Borrelia*, y triquinosis. Unos antígenos todavía adicionales se pueden obtener o derivar de patógenos no convencionales, tales como los agentes etiológicos de kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), encefalopatía esponjiforme ovina, encefalopatía transmisible del visón, y enfermedades de desgaste crónico, o de partículas infecciosas proteínicas tales como priones, que están asociados con la enfermedad de las vacas locas.

Los patógenos específicos adicionales de los que se pueden derivar los 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*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A y B), neumococo, meningococo, *Haemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, *Moraxella catarrhalis*, donovanosis, y actinomycosis; los patógenos fúngicos incluyen candidiasis y aspergilosis; los patógenos parasitarios incluyen *Taenia*, trematodos, ascárides, amebiasis, giardiasis, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, tricomonosis y tricinosis. La presente invención también se puede usar para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada frente a numerosas enfermedades veterinarias, tales como glosopeda, coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter*, *Strongylus vulgaris*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, y *Bordetella pertussis*, *parapertussis* y *brochiseptica*.

En otras formas de realización, los antígenos para su inclusión en composiciones que se pueden usar en conjunción con la presente invención son antígenos derivados de tumores o células tumorales completas autólogas o alogeneicas. Adecuadamente, el antígeno tumoral es un antígeno específico del tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). En la técnica se conocen varios antígenos tumorales y sus patrones de expresión, y se pueden seleccionar basándose en el tipo tumoral que se debe tratar. Los ejemplos no limitativos de antígenos tumorales incluyen cdk4 (melanoma), β -catenina (melanoma), caspasa-8 (carcinoma de células escamosas), MAGE-1 y MAGE-3 (melanoma, mama, glioma), tirosinasa (melanoma), idiotipo Ig de superficie (por ejemplo, BCR) (linfoma), Her-2/neu (mama, ovárico), MUC-1 (mama, pancreático) y HPV E6 y E7 (carcinoma de cuello uterino). Los antígenos tumorales adecuados adicionales incluyen antígeno específico de la próstata (PSA), sialil Tn (STn), proteínas de choque térmico y péptidos tumorales asociados (por ejemplo, gp96), moléculas gangliosídicas (por ejemplo, GM2, GD2, y GD3), antígeno carcinoembrionario (CEA) y MART-1.

Como apreciarán los expertos en la materia, las composiciones farmacéuticas se formulan adecuadamente para que sean compatibles con la vía pretendida de administración. Los ejemplos de vías de administración adecuadas incluyen la administración parenteral, por ejemplo intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, oral (por ejemplo, inhalación), entérica, transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. Como se muestra en los ejemplos, se descubrió que los compuestos de fórmula I proporcionan un aumento inesperadamente potente de la respuesta inmunitaria tras la administración intramuscular.

Otra forma de realización de la invención es un método para estimular una respuesta inmunitaria humoral frente a un antígeno. El método incluye coadministrar un compuesto de fórmula I y un antígeno a un sujeto, como se describe anteriormente. Como se usa en la presente memoria, una "respuesta inmunitaria humoral" se refiere a la producción de anticuerpos por linfocitos B, y al proceso accesorio que la acompaña, incluyendo de manera no limitativa por ejemplo activación de Th2 y producción de citocinas, formación de centros germinales e intercambio de isotipos, producción de maduración por afinidad y generación de células de memoria. Con el fin de determinar si una respuesta inmunitaria humoral está activada, se puede realizar una comparación cuantitativa de la señal en una muestra procedente de un sujeto al que se le ha administrado un antígeno y un compuesto de fórmula I con una muestra procedente de un sujeto al que se le ha administrado antígeno solo. La respuesta inmunitaria humoral se puede evaluar midiendo las funciones efectoras de anticuerpos, incluyendo neutralización de patógenos o toxinas,

activación clásica del complemento, y promoción mediante oxoninas de la fagocitosis y eliminación de patógenos. Los anticuerpos producidos en respuesta a la coadministración del compuesto de fórmula I y un antígeno pueden ser de cualquier tipo, por ejemplo IgM, IgA, o IgG (tales como IgG1 o IgG2). La respuesta inmunitaria humoral se puede evaluar por cualquier método cuantitativo conocido en la técnica, por ejemplo ELISA, ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID), inmunoensayo enzimático (EIA), o ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI).

Una forma de realización adicional de la invención es un método para activar linfocitos T CD4+ en un sujeto. Como se aprecia en la técnica, los linfocitos T CD4+, o "células auxiliares T", son células que reconocen antígenos presentados por el marcador de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase II sobre la superficie de células que presentan antígeno, y segregan linfocinas para estimular las ramas tanto mediada por células como mediada por anticuerpos del sistema inmunitario. La activación de linfocitos T CD4+ promueve la secreción de linfocinas, el cambio de isotipos de inmunoglobulinas, la maduración por afinidad de la respuesta de anticuerpos, la activación de macrófagos y un aumento de la actividad de células asesinas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos (CTL). Las linfocinas son proteínas segregadas por linfocitos que afectan a su propia actividad y/o a la actividad de otras células. Las linfocinas incluyen de manera limitativa interleucinas y citocinas, por ejemplo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, o IFN γ . Con el fin de determinar si los linfocitos T CD4+ están activados, se puede realizar una comparación cuantitativa de la señal en una muestra procedente de un sujeto vacunado con antígeno y un compuesto de fórmula I con una muestra procedente de un sujeto vacunado con antígeno solo. En la técnica se conocen métodos para evaluar la activación de linfocitos T CD4+.

Otra forma de realización de la invención es un método para activar linfocitos T CD8+ en un sujeto. Los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos presentados por moléculas del MHC de Clase I (presentes en todas las células nucleadas). El acoplamiento del complejo de péptido con MHC clase I da como resultado el suministro de gránulos líticos a la célula diana, provocando la lisis de la célula diana. Los métodos usados para evaluar la activación de linfocitos T CD8+ son conocidos en la técnica, e incluyen de manera no limitativa ELISPOT, ELISA, análisis de FACS para la unión a tetrámeros/pentámeros, y ensayos de citotoxicidad. Alternativamente, se puede usar un modelo de ratón para monitorizar la activación de linfocitos T CD8+ usando un ensayo fluorescente para medir la citotoxicidad mediada por células, como se describe en Hermans et al, 2004, Journal of Immunologic Methods, 285:25-40, incorporado como referencia en su totalidad. En este ensayo, los ratones se inmunizan en el día 0 con la vacuna con o sin el compuesto de ensayo. Se crean células diana singeneicas aislando esplenocitos de un segundo conjunto de ratones y marcando las células con dos colorantes fluorescentes marcadores de células distintos, o concentraciones altas y bajas de un único colorante fluorescente, por ejemplo CFSE o CMTMR. Un conjunto de células diana se carga con péptidos específicos del antígeno, mientras que un segundo conjunto de células diana se carga con un péptido irrelevante. Las dos poblaciones de células diana se mezclan en cantidades iguales y se inyectan en ratones inmunizados. Después de 24, los ratones son sacrificados, y se obtienen los esplenocitos y muestras de sangre. Los niveles de cada conjunto de células diana se analizan mediante citometría de flujo. La activación de linfocitos CD8+ se determina comparando el número de células diana en una muestra vacunada con antígeno y compuesto de ensayo con el número de células diana en una muestra procedente de un sujeto vacunado con antígeno solo.

Otros aspectos de la invención se pondrán de manifiesto a partir de los siguientes ejemplos no limitativos y las figuras adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo para determinar el aumento de la respuesta de linfocitos T CD8+ por PBS-96, PBS-14 y PBS-11 inyectados intravenosamente en un modelo de ratón

Se usó un modelo de ratón para evaluar *in vivo* la respuesta a linfocitos T citotóxicos específica (CD8+) provocada por compuestos adyuvantes de ensayo en combinación con antígeno cuando se administra intravenosamente. Se inmunizaron ocho grupos de 3 ratones en el día 0 con antígeno (Ovoalbúmina, Ova, grado VII, Sigma, St. Louis, MO) con o sin adyuvante, adyuvante solo, o vehículo solo (control) en un total de 100 μ l de PBS intravenosamente (vena de la cola lateral). Los compuestos adyuvantes de ensayo fueron 1 μ g de PBS-96, 1 μ g de PBS-14, 1 μ g de PBS-11 con o sin 50 μ g de antígeno de Ovoalbúmina (OVA).

Se prepararon células diana singeneicas aislando esplenocitos de un segundo conjunto de ratones hembra C57B1/6J CD45.2, y marcando las células con concentración baja (0,6 μ M durante 8 minutos a 37°C) o concentración alta (6 μ M durante 8 minutos a 37°C) de CFSE (colorante fluorescente). La población marcada con concentración alta de CFSE se cargó previamente con 5 μ M de péptido SIINFEKL (péptido específico de Ova, NeoMPS, Inc, San Diego, CA) durante 60 minutos a 37°C. La población marcada con baja concentración de CFSE se cargó previamente con 5 μ l de péptido LCMV gp33-41 (péptido no-Ova, NeoMPS, Inc, San Diego, CA) durante 60 minutos a 37°C. Las células diana se mezclaron con una relación final de 47/53 de células cargadas con concentración baja de CFSE a células cargadas con concentración alta de CFSE (2 x 10⁷ células totales por 100 μ l), y se inyectaron intravenosamente en cada uno de los ratones inmunizados en el día 10. Los ratones se sacrificaron en el día 11, y se recogieron esplenocitos y muestras de sangre del seno orbital. El porcentaje de supervivencia

medio de las células diana pulsadas con péptidos (concentración elevada marcada con CFSE) se calculó con respecto a la población de control mediante análisis citométrico de flujo. La actividad citotóxica se expresó como porcentaje de lisis específica (100 menos el porcentaje medio de supervivencia de dianas pulsadas con péptidos). La figura 1 representa el porcentaje de lisis específica de células diana en la sangre de ratones inmunizados. Sólo la administración de las combinaciones de Ova y PBS-96 o PBS-14 dio como resultado lisis citotóxica de células diana específicas de Ova. Por el contrario, la administración de PBS-11 no dio como resultado lisis específica de células.

Ejemplo 2: Comparación del aumento de la respuesta de linfocitos T CD8+ por PBS-96, PBS-14, PBS-11, PBS-57 y α GalCer cuando se inyectaron intravenosa e intramuscularmente en un modelo de ratón

Para determinar la capacidad de los compuestos adyuvantes de ensayo para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos específica *in vivo* (CD8+) cuando se administran en combinación con antígeno, los compuestos adyuvantes de ensayo se evaluaron adicionalmente usando el método descrito en el Ejemplo 1. Se inmunizaron dieciocho grupos de ratones en el día 0 ya sea intravenosamente (IV) (grupos 1-9 de 3 ratones por grupo) o intramuscularmente (grupos 10-18 de 6 ratones por grupo) según lo siguiente:

- Grupo 1: 400 μ g de Ova en 100 μ l de PBS mediante IV;
- Grupo 2: 1 μ g de α GalCer en 100 μ l de PBS mediante IV;
- Grupo 3: 1 μ g de PBS-57 en 100 μ l de PBS mediante IV;
- Grupo 4: 1 μ g de PBS-14 en 100 μ l de PBS mediante IV;
- Grupo 5: 1 μ g de PBS-96 en 100 μ l de PBS mediante IV;
- Grupo 6: 400 μ g de Ova + 1 μ g de α GalCer en 100 μ l de PBS mediante IV;
- Grupo 7: 400 μ g de Ova + 1 μ g de PBS-57 en 100 μ l de PBS mediante IV;
- Grupo 8: 400 μ g de Ova + 1 μ g de PBS-14 en 100 μ l de PBS mediante IV;
- Grupo 9: 400 μ g de Ova + 1 μ g de PBS-96 en 100 μ l de PBS mediante IV;
- Grupo 10: 400 μ g de Ova en 50 μ l de PBS mediante IM;
- Grupo 11: 1 μ g de α GalCer en 50 μ l de PBS mediante IM;
- Grupo 12: 1 μ g de PBS-57 en 50 μ l de PBS mediante IM;
- Grupo 13: 1 μ g de PBS-14 en 50 μ l de PBS mediante IM;
- Grupo 14: 1 μ g de PBS-96 en 50 μ l de PBS mediante IM;
- Grupo 15: 400 μ g de Ova + 1 μ g de α GalCer en 50 μ l de PBS mediante IM;
- Grupo 16: 400 μ g de Ova + 1 μ g de PBS-57 en 50 μ l de PBS mediante IM;
- Grupo 17: 400 μ g de Ova + 1 μ g de PBS-14 en 50 μ l de PBS mediante IM;
- Grupo 18: 400 μ g de Ova + 1 μ g de PBS-96 en 50 μ l de PBS mediante IM.

Las células diana se mezclaron con una relación final de 50/50 de células cargadas con CFSE de baja concentración a células cargadas con CFSE de alta concentración (1×10^7 células de cada concentración, 2×10^7 células totales por 100 μ l) y se inyectaron intravenosamente en cada uno de los ratones inmunizados en el día 10. En el día 11, los ratones se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre del seno orbital. La lisis celular de las células diana específicas de OVA se monitorizó mediante citometría de flujo de las células de sangre periférica. La lisis celular específica se determinó como se describe anteriormente.

La figura 2 muestra los resultados para ratones inyectados intravenosamente. La respuesta citotóxica específica de Ova promedio en ratones tratados con Ova sola fue $11,8 \pm 14,4\%$, con Ova y α GalCer fue $79,9 \pm 0,8\%$, en ratones tratados con Ova y PBS-57 fue $88,1 \pm 6,2\%$, en ratones tratados con Ova y PBS-14 fue $83,3 \pm 6,1\%$, y en ratones tratados con Ova y PBS-96 fue $89,2 \pm 10,3\%$. Los resultados mostraron que PBS-14 y PBS-96 fueron tan eficaces como PBS-57 induciendo respuestas citotóxicas específicas de OVA *in vivo*.

La figura 3 muestra los resultados para ratones inyectados intramuscularmente. La respuesta citotóxica específica de Ova promedio en ratones tratados con Ova sola fue $1,60 \pm 14,33\%$, en ratones tratados con Ova y α GalCer fue $5,85 \pm 11,01\%$, en ratones tratados con Ova y PBS-57 fue $56,11 \pm 13,34\%$, en ratones tratados con Ova y PBS-14 fue $52,07 \pm 29,56\%$, y en ratones tratados con Ova y PBS-96 fue $50,29 \pm 42,6\%$. Estos resultados demuestran que PBS-96 y PBS-14 provocan ambos una respuesta inmunitaria tan eficaz como PBS-57 tanto intravenosa como intramuscularmente, y que PBS-14, PBS-96 y PBS-57 son más eficaces que α GalCer tras la inyección intramuscular.

10 **Ejemplo 3: Estimulación *in vivo* de IFN γ mediante compuestos adyuvantes de ensayo**

Para evaluar la capacidad de los compuestos de ensayo adyuvantes para estimular la liberación de citocinas *in vivo*, a ratones C57BL/6 se les administraron los compuestos a diferentes concentraciones intravenosamente, y se midió la producción de IFN γ en sueros 24 horas más tarde mediante ELISA. Grupos de 3 ratones se inocularon intravenosamente (vena de la cola) en el día 0 según lo siguiente:

- Grupo 1: 100 μ l de PBS sola
- Grupo 2: 1 μ g de μ GalCer en 100 μ l de PBS
- 20 – Grupo 3: 100 ng de α GalCer en 100 μ l de PBS
- Grupo 4: 1 ng de α GalCer en 100 μ l de PBS
- 25 – Grupo 5: 0,1 ng de α GalCer en 100 μ l de PBS
- Grupo 6: 100 ng de α GalCer y 400 μ g de Ova en 100 μ l de PBS
- Grupo 7: 1 μ g de PBS-57 en 100 μ l de PBS
- 30 – Grupo 8: 100 ng de PBS-57 en 100 μ l de PBS
- Grupo 9: 1 ng de PBS-57 en 100 μ l de PBS
- 35 – Grupo 10: 0,1 ng de PBS-57 en 100 μ l de PBS
- Grupo 11: 100 ng de PBS-57 y 400 μ g de Ova en 100 μ l de PBS
- Grupo 12: 1 μ g de PBS-14 en 100 μ l de PBS
- 40 – Grupo 13: 100 ng de PBS-14 en 100 μ l de PBS
- Grupo 14: 1 ng de PBS-14 en 100 μ l de PBS
- 45 – Grupo 15: 0,1 ng de PBS-14 en 100 μ l de PBS
- Grupo 16: 100 ng de PBS-14 y 400 μ g de Ova en 100 μ l de PBS
- Grupo 17: 1 μ g de PBS-96 en 100 μ l de PBS
- 50 – Grupo 18: 100 ng de PBS-96 en 100 μ l de PBS
- Grupo 19: 1 ng de PBS-96 en 100 μ l de PBS
- 55 – Grupo 20: 0,1 ng de PBS-96 en 100 μ l de PBS
- Grupo 21: 100 ng de PBS-96 y 400 μ g de Ova en 100 μ l de PBS.

60 Tras 24 horas de la inoculación, se recogieron muestras de sangre de los ratones y se detectaron los niveles de IFN γ mediante el kit de ELISA. Se usaron dos kits de ELISA, se usó IFN γ de ratón Quantikine (RD systems) para ensayar todas las muestras, y se usó mIFN γ de ELISA (Diacclone) para ensayar los grupos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 18 y 21. Todos los sueros se diluyeron antes del uso en ELISA según lo siguiente:

- Grupo 1:1/1

Grupo 2:1/50

Grupo 3: 1/50

ES 2 525 127 T3

- Grupo 4: 1/20	Grupo 5: 1/10	Grupo 6: 1/50
- Grupo 7: 1/50	Grupo 8: 1/50	Grupo 9: 1/20
- Grupo 10: 1/10	Grupo 11: 1/50	Grupo 12: 1/50
- Grupo 13: 1/50	Grupo 814: 1/20	Grupo 15: 1/10
- Grupo 16: 1/50	Grupo 17: 1/50	Grupo 18: 1/50
- Grupo 19: 1/20	Grupo 20: 1/10	Grupo 21: 1/50

Los resultados se expresan como concentración de IFN γ (pg/ml) en sueros, y tienen en cuenta el factor de dilución. La figura 4 representa los resultados usando el kit de IFN γ de ratón Quantikine por RD systems. La figura 4A representa resultados de niveles de IFN γ para ratones inmunizados con PBS-57, la figura 4B representa resultados de niveles de IFN γ para ratones inmunizados con PBS-14, la figura 4C representa resultados de niveles de IFN γ para ratones inmunizados con PBS-96, y la figura 4D representa resultados de niveles de IFN γ para ratones inmunizados con α GalCer. A 0,1 ng, todos los candidatos adyuvantes inducen liberación de citocinas, pero los ratones inmunizados con α GalCer produjeron tres o cuatro veces menos IFN γ que los ratones inmunizados con PBS-57, PBS-14 o PBS-96 (1540,57 \pm 397,53 pg/ml, 4398,05 \pm 880,86 pg/ml, 6669,31 \pm 1231,82 pg/ml, 5823,33 \pm 720,69 pg/ml respectivamente). A 1 ng de compuesto adyuvante de ensayo, PBS-57, PBS-14 y PBS-96 (11425,98 \pm 833,04 pg/ml, 7481,15 \pm 3454,03 μ g/ml y 6271,95 \pm 3737,53 pg/ml, promediadas, respectivamente) mostraron una respuesta más grande que α GalCer (promedio de 3802,99 \pm 586,02 pg/ml). A 100 ng de compuesto adyuvante de ensayo, PBS-57, PBS-96 y PBS-14 produjeron todos niveles de IFN γ mayores que α GalCer (21432,76 \pm 4312,76 pg/ml para PBS-57, 19679,89 \pm 1443,48 pg/ml para PBS-96, 19582,18 \pm 3421,20 pg/ml para PBS-14, y 7714,37 \pm 3529,07 pg/ml para α GalCer, promediados). A 1 μ g de compuesto de ensayo, PBS-57 mostró una respuesta más débil (3353,45 \pm 867,57 pg/ml) en comparación con la dosis de 100 ng (21432,76 \pm 4312,76 pg/ml), mientras que PBS-14 o PBS-96 todavía mostraron una respuesta menor pero todavía potente (16392,53 \pm 5957,70 pg/ml y 17720,11 \pm 2869,97 pg/ml respectivamente) que a la dosis de 100 ng (19582,18 \pm 3421,20 pg/ml y 19679,89 \pm 1443,48 pg/ml respectivamente).

Se usó otro conjunto de ratones para comparar la capacidad de los compuestos adyuvantes para estimular la liberación de citocinas *in vivo* mediante el método descrito anteriormente. A cinco grupos de ratones C57BL/6 se les administraron 100 ng de PBS-57, PBS-14, PBS-96, o PBS-11 en 100 μ l de PBS, o 100 μ l de PBS sola, intravenosamente. La producción de IFN γ en los sueros se midió 24 horas más tarde mediante ELISA. La figura 5 representa resultados para ratones inmunizados con 100 ng de PBS-11, PBS-96, PBS-14 y PBS-57.

Globalmente, la administración de PBS-14 y PBS-96 dan una respuesta de IFN γ similar a PBS-57, y una respuesta inesperadamente mayor que la administración de PBS-11.

30 **Ejemplo 4: Comparación del aumento de la respuesta de linfocitos T CD8+ por PBS-96, PBS-14, PBS-11, y PBS-57**

Para determinar la capacidad de los compuestos adyuvantes de ensayo para inducir respuesta de linfocitos T citotóxicos específica (CD8+) *in vivo* en combinación con antígeno, se evaluaron los compuestos de ensayo mediante el método descrito en el Ejemplo 1. Se inmunizaron nueve grupos de ratones en el día 0 intravenosamente (IV) según lo siguiente:

- Grupo 1: 400 μ g de Ova en 100 μ l de PBS;
- 40 - Grupo 2: 1 μ g de PBS-11 en 100 μ l de PBS;
- Grupo 3: 1 μ g de nueva formulación de PBS-57 en 100 μ l de PBS;
- 45 - Grupo 4: 1 μ g de PBS-14 en 100 μ l de PBS;
- Grupo 5: 1 μ g de PBS-96 en 100 μ l de PBS;
- Grupo 6: 400 μ g de Ova + 1 μ g de PBS-11 en 100 μ l de PBS;
- 50 - Grupo 7: 400 μ g de Ova + 1 μ g de nueva formulación de PBS-57 en 100 μ l de PBS;
- Grupo 8: 400 μ g de Ova + 1 μ g de PBS-14 en 100 μ l de PBS;

- Grupo 9: 400 µg de Ova + 1 µg de PBS-96 en 100 µl de PBS.

5 Se mezclaron células diana con una relación final de 50/50 de células cargadas con CFSE de baja concentración a células cargadas con CFSE de concentración alta (1×10^7 células cada concentración, 2×10^7 células totales por 100 µl), y se inyectaron intravenosamente en cada uno de los ratones inmunizados en el día 10. En el día 11, los ratones se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre del seno orbital. La lisis celular específica de las células diana específicas de Ova se monitorizó mediante citometría de flujo de las células de sangre periférica. La lisis celular específica se determinó como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 6. La lisis celular específica de Ova promedio fue $11,8 \pm 14,4\%$ para ratones tratados con Ova sola, $32,3 \pm 2,5\%$ para ratones tratados con Ova y PBS-11, $88,1 \pm 6,2\%$ en ratones tratados con Ova y PBS-57, $83,3 \pm 6,1\%$ para ratones tratados con Ova y PBS-14, y $89,2 \pm 10,3\%$ en ratones tratados con Ova y PBS-96. Estos resultados demuestran que PBS-14 y PBS-96 son tan eficaces como PBS-57 induciendo una respuesta citotóxica *in vivo* tras la administración intravenosa en combinación con antígeno.

15 **Ejemplo 5. Comparación del aumento de la respuesta a linfocitos T CD8+ mediante cantidades decrecientes de adyuvante tras la inyección intramuscular**

20 Para determinar la capacidad relativa de los compuestos adyuvantes de ensayo para aumentar la respuesta inmunitaria, se llevó a cabo un experimento similar al descrito en el Ejemplo 2. En este experimento, se inyectó intravenosamente a ratones con cantidades decrecientes de adyuvante (100 ng y 10 ng, respectivamente) en combinación con 50 µg de antígeno OVA en el día 0 según lo siguiente:

25 Experimento A:

- Grupo 1: 50 µg de Ova en 100 µl de PBS
- Grupo 2: 100 ng de αGalCer;
- 30 Grupo 3: 100 ng de PBS-11
- Grupo 4: 100 ng de PBS-14
- Grupo 5: 100 ng de PBS-57
- 35 Grupo 6: 100 ng de PBS-96
- Grupo 7: 50 µg de Ova con 100 ng de αGalCer;
- 40 Grupo 8: 50 µg de Ova con 100 ng de PBS-11
- Grupo 9: 50 µg de Ova con 100 ng de PBS-14
- Grupo 10: 50 µg de Ova con 100 ng de PBS-57
- 45 Grupo 11: 50 µg de Ova con 100 ng de PBS-96

Experimento B:

- 50 Grupo 1: 50 µg de Ova en 100 µl de PBS
- Grupo 2: 10 ng de αGalCer;
- Grupo 3: 10 ng de PBS-11
- 55 Grupo 4: 10 ng de PBS-14
- Grupo 5: 10 ng de PBS-57
- 60 Grupo 6: 10 ng de PBS-96
- Grupo 7: 50 µg de Ova con 10 ng de αGalCer;
- 65 Grupo 8: 50 µg de Ova con 10 ng de PBS-11

Grupo 9: 50 µg de Ova con 10 ng de PBS-14

Grupo 10: 50 µg de Ova con 10 ng de PBS-57

5 Grupo 11: 50 µg de Ova con 10 ng de PBS-96

Se administraron células diana en el día 10 del experimento, y se recogió sangre en el día 11. Los resultados para el Experimento A que usa 100 ng de cada adyuvante se muestran en la figura 7, y los resultados para el Experimento B se muestran en la figura 8. Las figuras 7 y 8 demuestran que PBS-14 y PBS-96 son inesperadamente mejores que otros adyuvantes aumentando la respuesta de linfocitos T CD8+ frente a un antígeno a dosis bajas cuando se administran intramuscularmente. De hecho, tras la administración de OVA y solamente 10 ng de PBS-14 o PBS-96 intramuscularmente, el porcentaje de lisis específica de las células diana por linfocitos T CD8+ es todavía de aproximadamente 60%, mientras que el porcentaje de lisis específica de células diana tras la administración de OVA y la misma cantidad de PBS-57, PBS-11 o αGalCer fue indistinguible de los controles.

Ejemplo 6. Comparación del aumento de la respuesta de linfocitos T CD8+ mediante cantidades decrecientes de adyuvante tras la inyección intramuscular

Para verificar los resultados obtenidos usando el ensayo de citotoxicidad *in vivo* descrito en los Ejemplos anteriores, se llevaron a cabo experimentos similares y se determinó la activación de linfocitos T CD8+ midiendo el porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos de OVA usando un ensayo de pentámeros. De forma breve, a los ratones se les inyectó intramuscularmente con las cantidades indicadas de OVA y compuesto adyuvante de ensayo a 1 µg o 10 ng por ratón, respectivamente en el día 0 según lo siguiente:

Experimento A:

Grupo 1: 100 µl de PBS;

Grupo 2: 50 µg de Ova en 100 µl de PBS;

Grupo 3: 50 µg de Ova con 1 µg de αGalCer;

Grupo 4: 50 µg de Ova con 1 µg de PBS-11

Grupo 5: 50 µg de Ova con 1 µg de PBS-14

Grupo 6: 50 µg de Ova con 1 µg de PBS-57

Grupo 7: 50 µg de Ova con 1 µg de PBS-96

Experimento B:

Grupo 1: 100 µl de PBS;

Grupo 2: 50 µg de Ova en 100 µl de PBS;

Grupo 3: 50 µg de Ova con 100 ng de αGalCer;

Grupo 4: 50 µg de Ova con 100 ng de PBS-11

Grupo 5: 50 µg de Ova con 100 ng de PBS-14

Grupo 6: 50 µg de Ova con 100 ng de PBS-57

Grupo 7: 50 µg de Ova con 100 ng de PBS-96

Se administró una segunda inyección a los ratones en el día 14 y se recogió sangre de los ratones en el día 21. Los linfocitos se recogieron y se analizaron mediante análisis de FACS usando el pentámero H-2K^b SIINFEKL y anticuerpo anti-CD8 para detectar linfocitos T CD8+ sensibles a OVA. Los resultados del Experimento A se muestran en la figura 9, y los resultados del Experimento B se muestran en la figura 10. La figura 9 demuestra que, cuando se administran a 1 µg, PBS-14, PBS-96 y PBS-57 aumentaron el porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos de OVA tras la vacunación, mientras que PBS-11 y αGalCer no fueron tan eficaces. La figura 10 demuestra que, a la menor dosis de 100 ng, PBS-14 y PBS-96 fueron sorprendentemente mucho mejores aumentando la respuesta de linfocitos T CD8+ frente a un antígeno en comparación con PBS-57, PBS-11 y αGalCer.

Ejemplo 7. Comparación del aumento de la respuesta humoral tras la inmunización intramuscular con adyuvante y antígeno

5 Para evaluar si las respuestas inmunitarias humorales y de células auxiliares T CD4+ también se aumentaron por la administración de los adyuvantes de ensayo con antígeno, se midieron las respuestas de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones vacunados con OVA con o sin los adyuvantes de ensayo. Se inyectaron intramuscularmente a ratones (6 por grupo) con 50 µg de OVA ya sea sola o en combinación con 100 ng de los adyuvantes indicados (como control positivo, se usó el adyuvante de Freund) según lo siguiente:

10

Grupo 1: 500 µg de Ova con CFA/IFA (Control positivo)

Grupo 2: 50 µg de Ova

15

Grupo 3: 50 µg de Ova y 100 ng de αGalCer

Grupo 4: 50 µg de Ova y 100 ng de PBS-11

20

Grupo 5: 50 µg de Ova y 100 ng de PBS-14

Grupo 6: 50 µg de Ova y 100 ng de PBS-57

Grupo 7: 50 µg de Ova y 100 ng de PBS-96

25

A los 14 días después de la inyección, se recogieron muestras de sangre y se realizaron los ELISAs para IgG1 e IgG2a usando anticuerpos monoclonales de ratón específicos para los isotipos de OVA IgG1 o IgG2a. Los resultados se muestran como el título del anticuerpo en sangre periférica en ng/ml. Los resultados para IgG1 se representan en la figura 11, y aquellos para IgG2a se representan en la figura 12. Como se muestra en la figura 11, PBS-14, PBS-96 y PBS-57 fueron todos ellos capaces de provocar un título de IgG1 robusto y aumentaron el título de IgG1 específico de OVA en comparación con la vacunación con OVA sola u OVA en combinación con PBS-11 o αGalCer. Sorprendentemente, PBS-14 y PBS-96 aumentaron el título de IgG2a específico de OVA aproximadamente tan bien como el adyuvante de Freund, y mucho mejor que PBS-57.

30

35

Aunque las composiciones y métodos de la presente invención se han descrito en términos de formas de realización ejemplificativas, resultará evidente para los expertos en la materia que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas de los métodos descritos en la presente memoria sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, resultará evidente que ciertos agentes, que están tanto química como fisiológicamente relacionados, se pueden sustituir por los agentes descritos en la presente memoria mientras que se obtendrían los mismos resultados o resultados similares.

40

Como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen referentes plurales excepto que el contenido indique claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene “un polinucleótido” incluye una mezcla de dos o más polinucleótidos. Se debería observar que el término “o” se utiliza generalmente en el sentido de incluir “y/o” excepto que el contenido dicte claramente otra cosa.

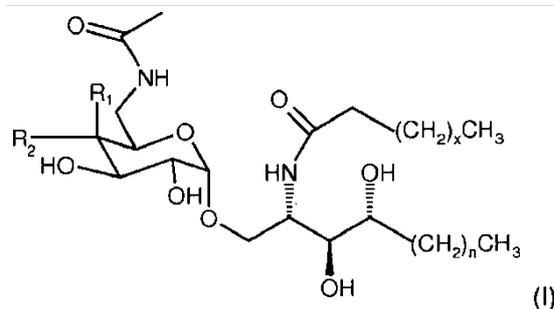
45

50

También se entiende específicamente que cualquier valor numérico mencionado en la presente memoria incluye todos los valores desde el valor inferior hasta el valor superior, es decir, todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el nivel más bajo y el nivel más elevado enumerados se han de considerar como señalados expresamente en la presente solicitud.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un compuesto de fórmula I:



5

en la que R_1 es H o $-OH$, R_2 es $-H$ o $-OH$, x es un número entero de 18 a 26, y n es un número entero de 10 a 15.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que x es 23.

10

3. Composición según la reivindicación 1, en la que x es 21.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que n es 13.

15

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un antígeno.

6. Composición farmacéutica que comprende la composición según la reivindicación 1 y un antígeno.

20

7. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización como una vacuna, en la que el compuesto de fórmula (I) aumenta una respuesta inmunitaria de un sujeto al antígeno, en la que la respuesta inmunitaria del sujeto al antígeno está aumentada con respecto a una respuesta inmunitaria de un control al antígeno.

25

8. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización como una vacuna, en la que el compuesto de fórmula (I) aumenta una respuesta inmunitaria de un sujeto al antígeno, en la que el antígeno y la composición según la reivindicación 1 se administran intramuscularmente, y en la que la respuesta inmunitaria del sujeto al antígeno está aumentada con respecto a una respuesta inmunitaria de un control al antígeno.

30

9. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización según la reivindicación 7 u 8, en la que el antígeno y la composición según la reivindicación 1 se administran concurrentemente.

35

10. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización como una vacuna, en la que el compuesto de fórmula (I) aumenta una respuesta inmunitaria humoral de un sujeto al antígeno, en la que la respuesta inmunitaria humoral del sujeto al antígeno está aumentada con respecto a una respuesta inmunitaria de un control al antígeno.

40

11. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización según la reivindicación 10, en la que la respuesta inmunitaria humoral comprende la producción de anticuerpos IgG o anticuerpos IgA.

45

12. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización como una vacuna, en la que el compuesto de fórmula (I) aumenta una respuesta de linfocitos T CD4+ de un sujeto al antígeno, en la que la respuesta inmunitaria del sujeto al antígeno está aumentada con respecto a la respuesta de linfocitos T CD4+ de un control al antígeno.

50

13. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización según la reivindicación 12, en la que la respuesta de linfocitos T CD4+ aumentada comprende la activación de los linfocitos T CD4+.

50

14. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización según la reivindicación 12, en la que la activación de los linfocitos T CD4+ comprende un incremento en una respuesta inmunitaria de Th1 y/o Th2.

15. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización como una vacuna, en la que el compuesto de fórmula (I) aumenta una respuesta de linfocitos T CD8+ de un sujeto al antígeno, en la que la respuesta inmunitaria del sujeto al antígeno está aumentada con respecto a una respuesta de linfocitos T CD8+ de un control al antígeno.
- 5
16. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización según la reivindicación 15, en la que la activación de los linfocitos T CD8+ comprende un incremento en la respuesta citotóxica.
- 10
17. Composición según la reivindicación 1 en combinación con un antígeno para su utilización como una vacuna, en la que el compuesto de fórmula (I) aumenta la activación de las células presentadoras de antígeno de un sujeto al antígeno, en la que la respuesta inmunitaria del sujeto al antígeno está aumentada con respecto a la activación de las células presentadoras de antígeno de un control al antígeno.

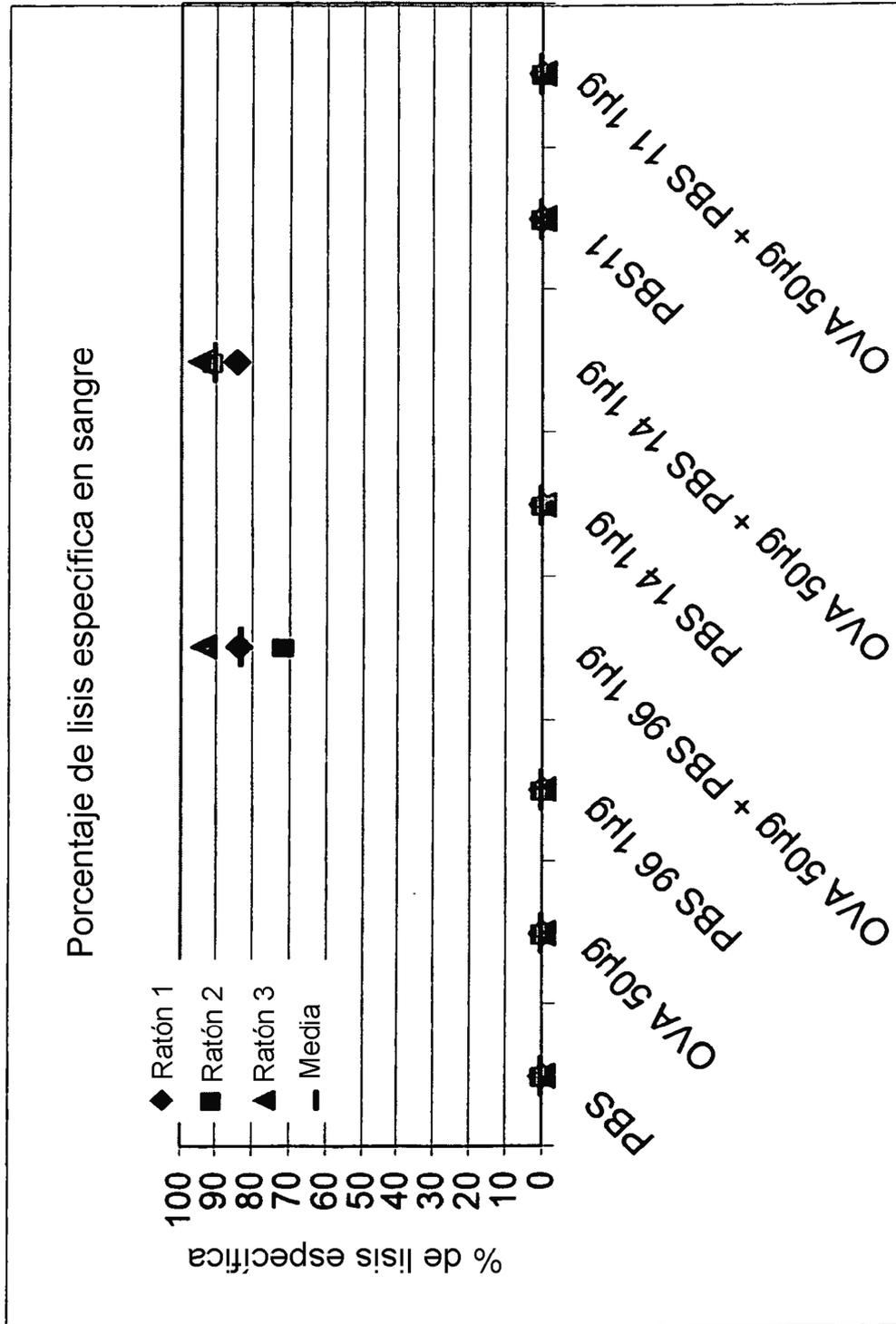


FIG. 1

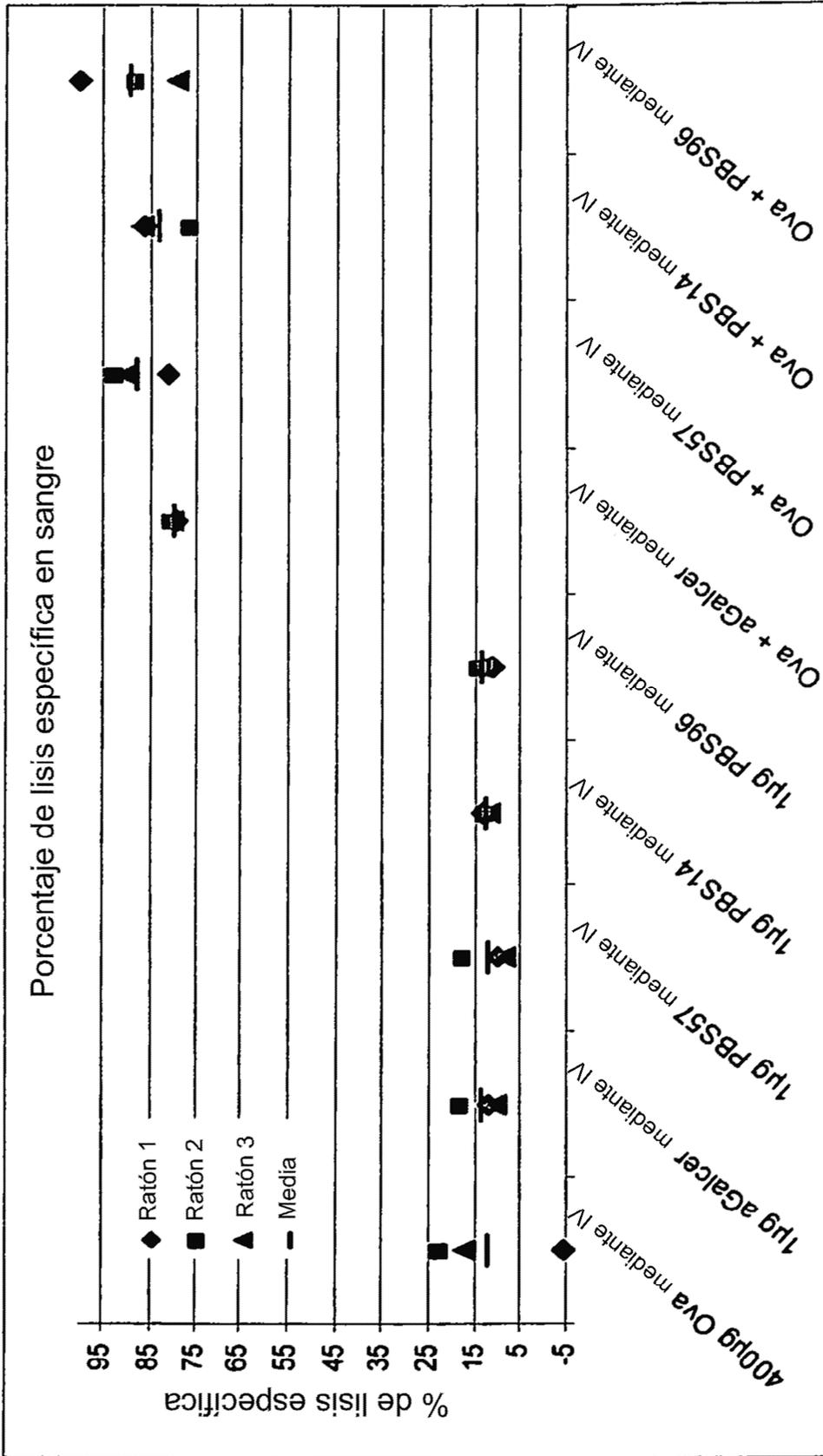


FIG. 2

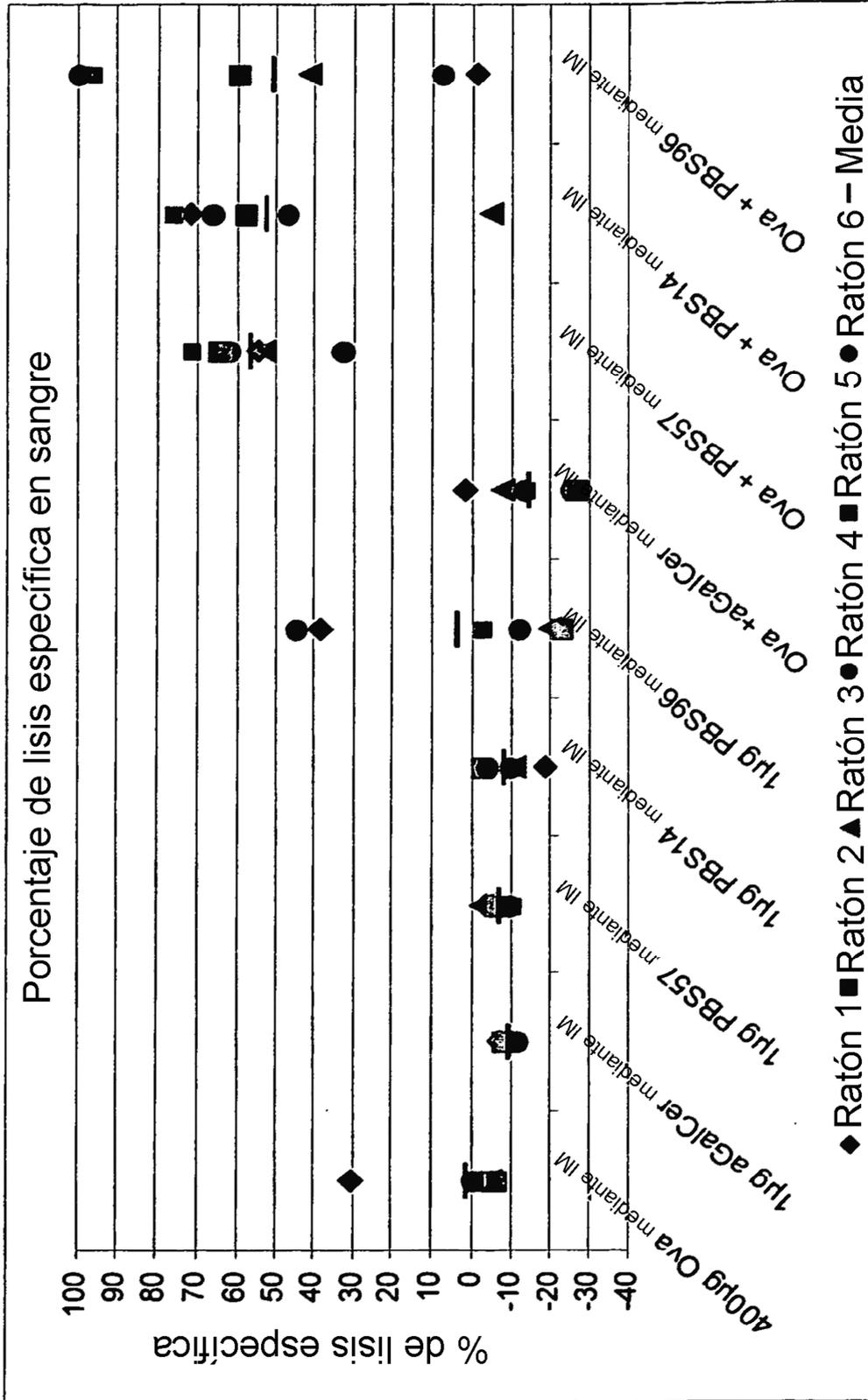


FIG. 3

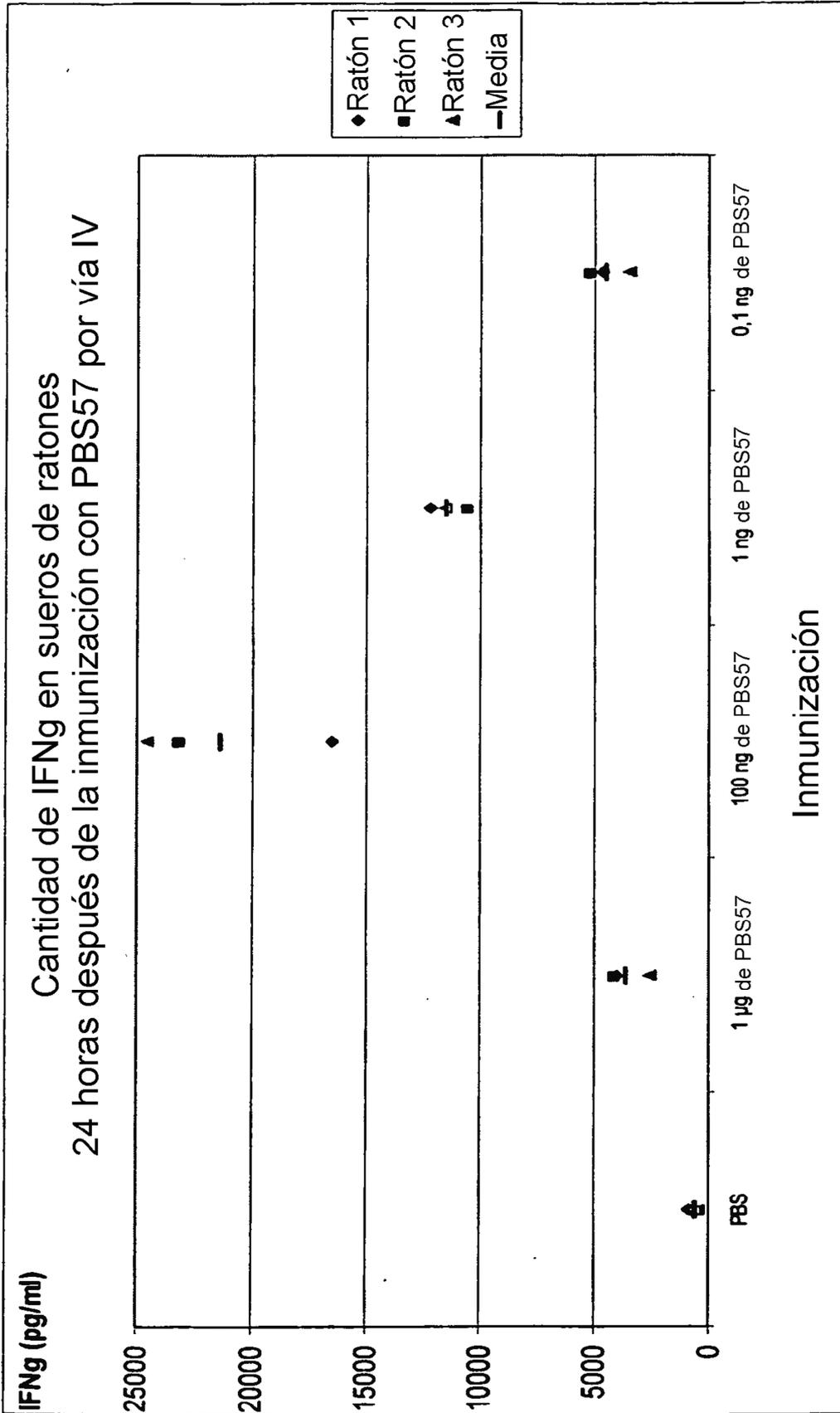


FIG. 4A

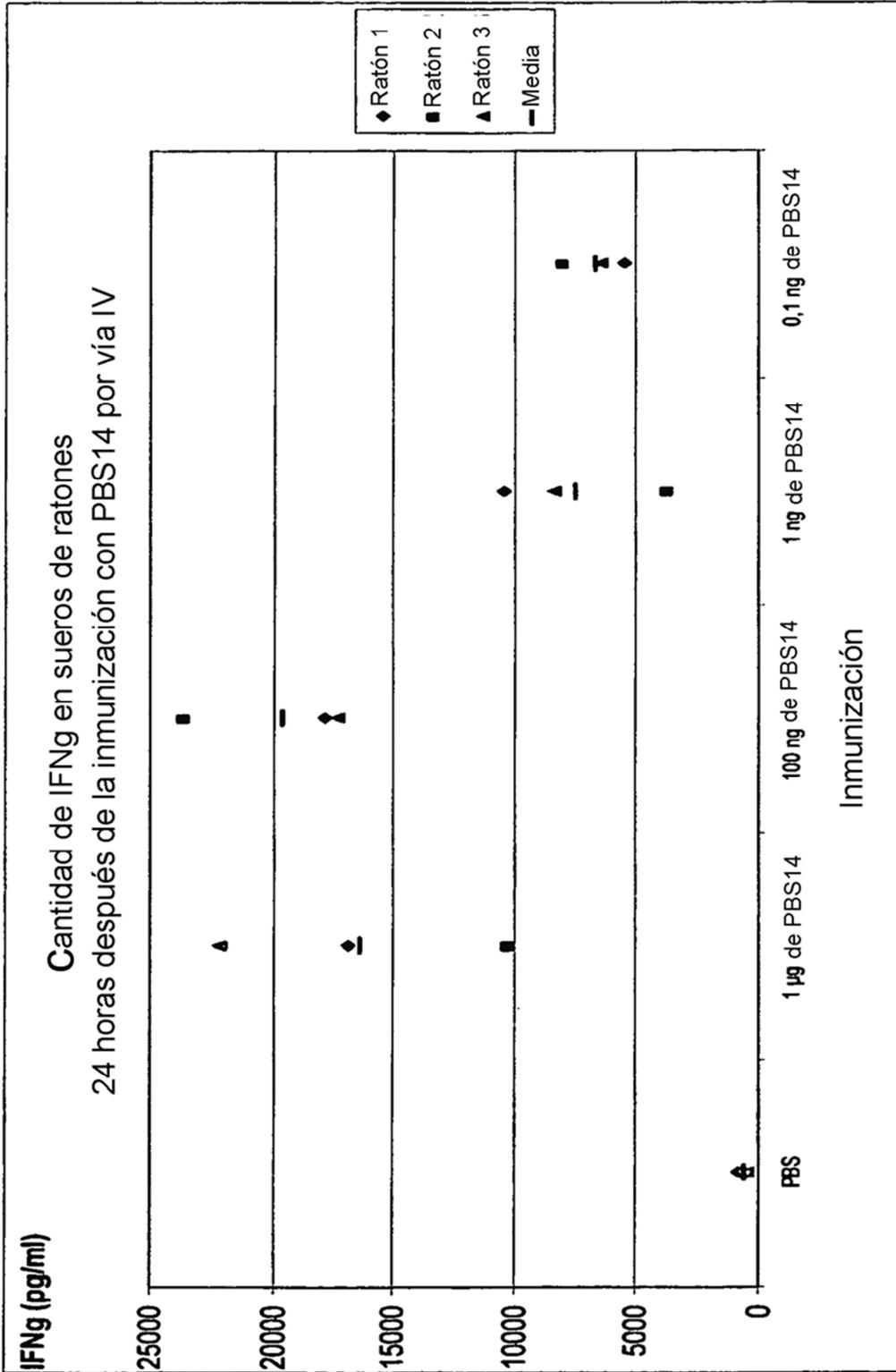


FIG. 4B

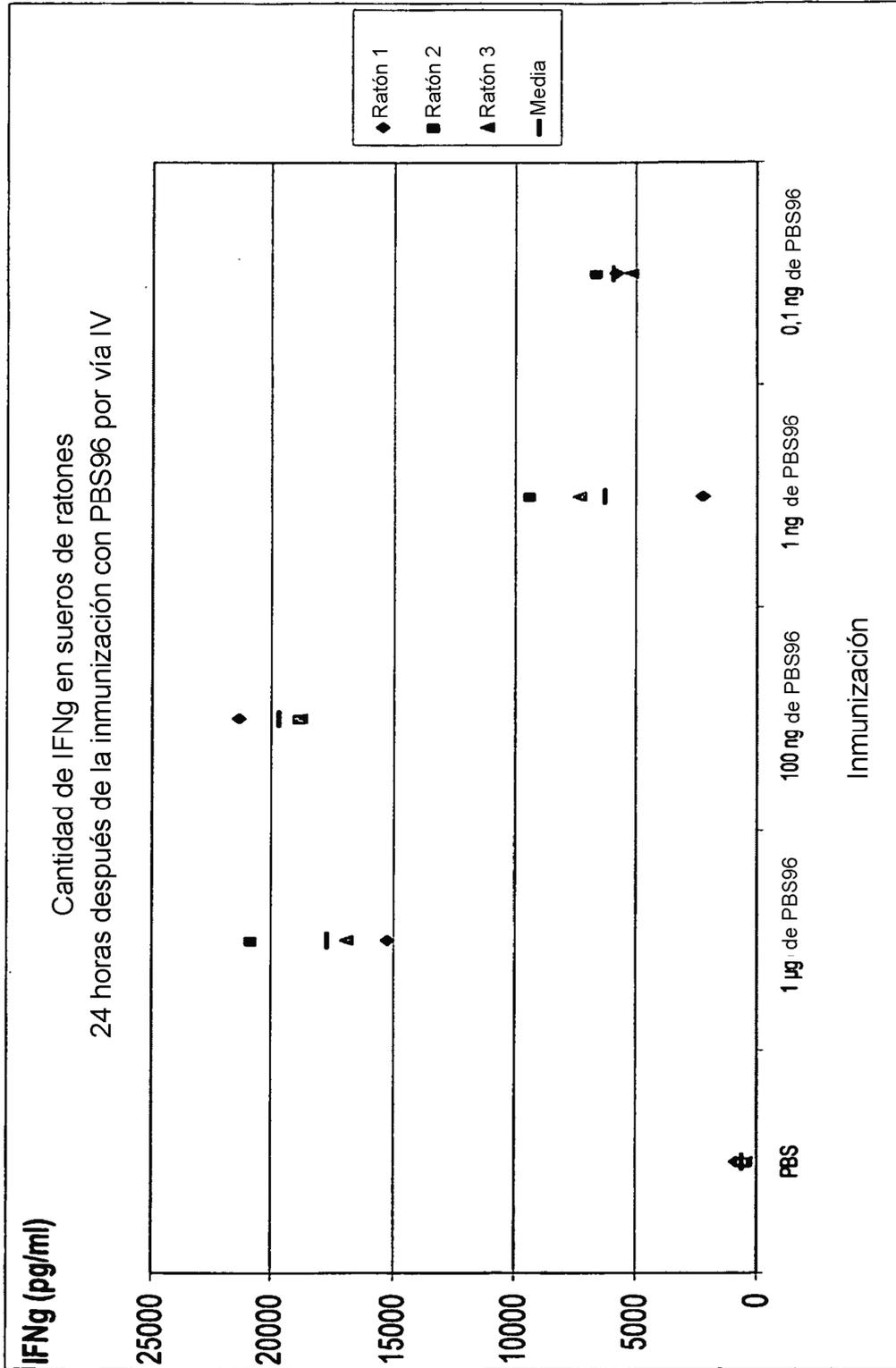


FIG. 4C

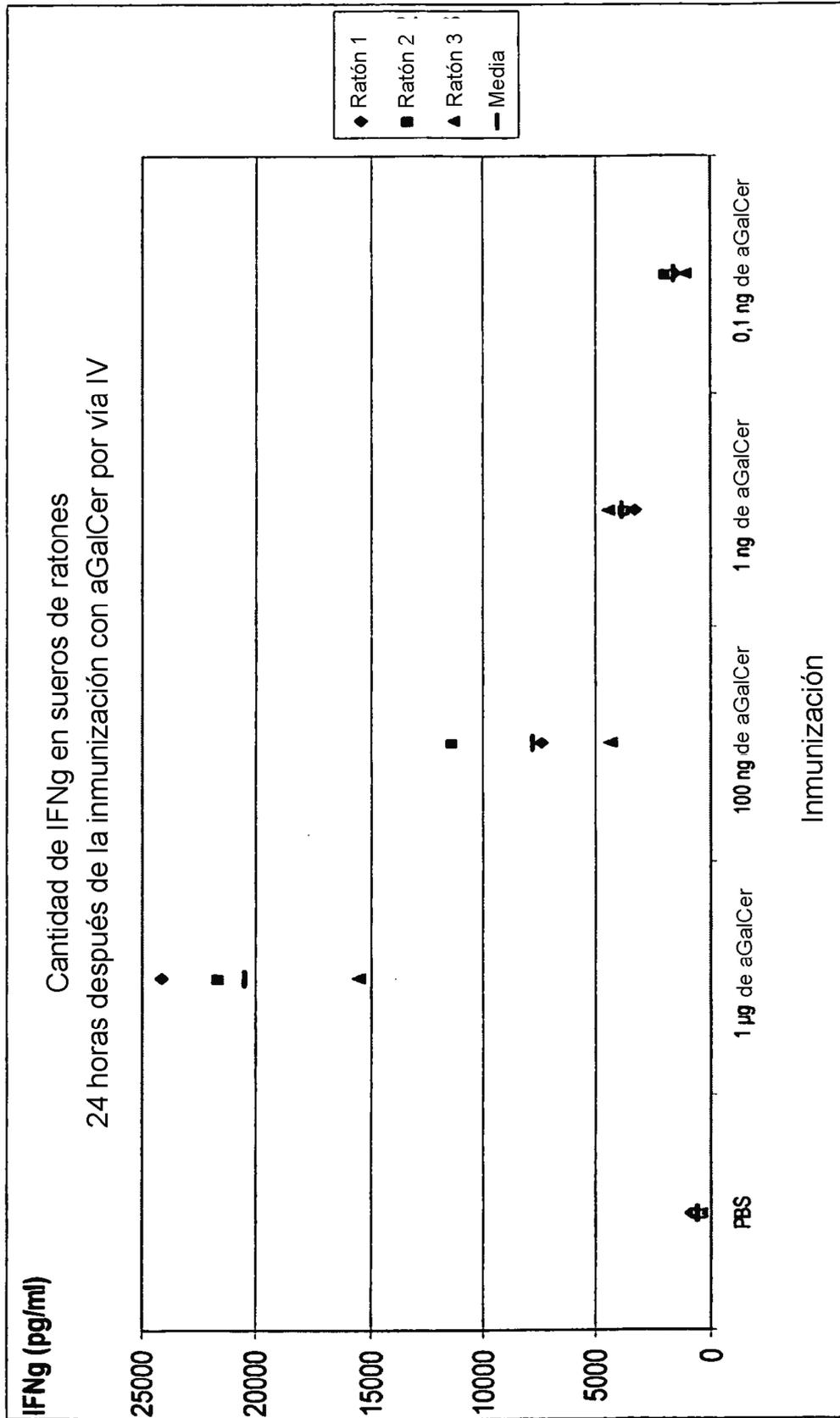


FIG. 4D

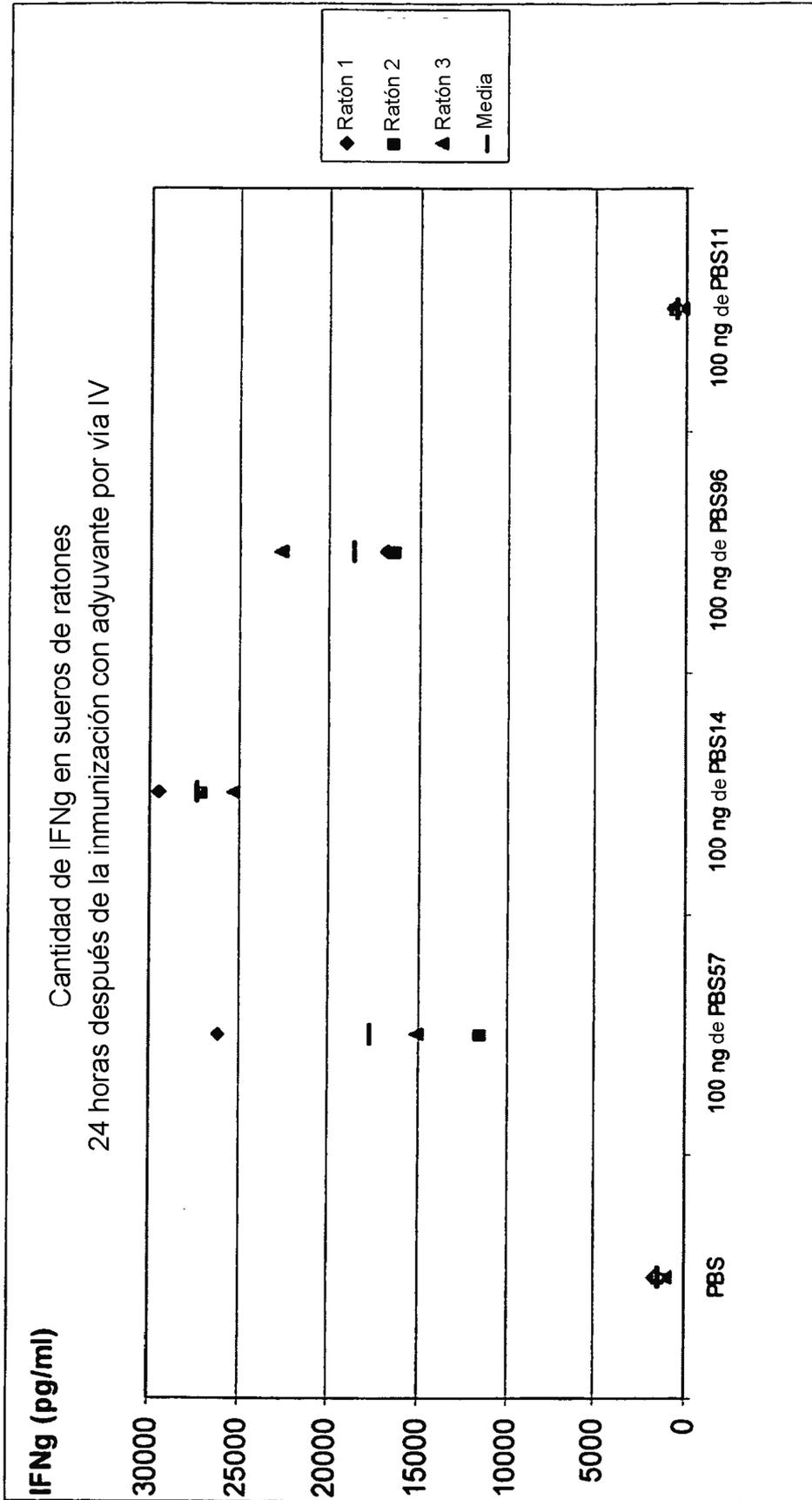


FIG. 5

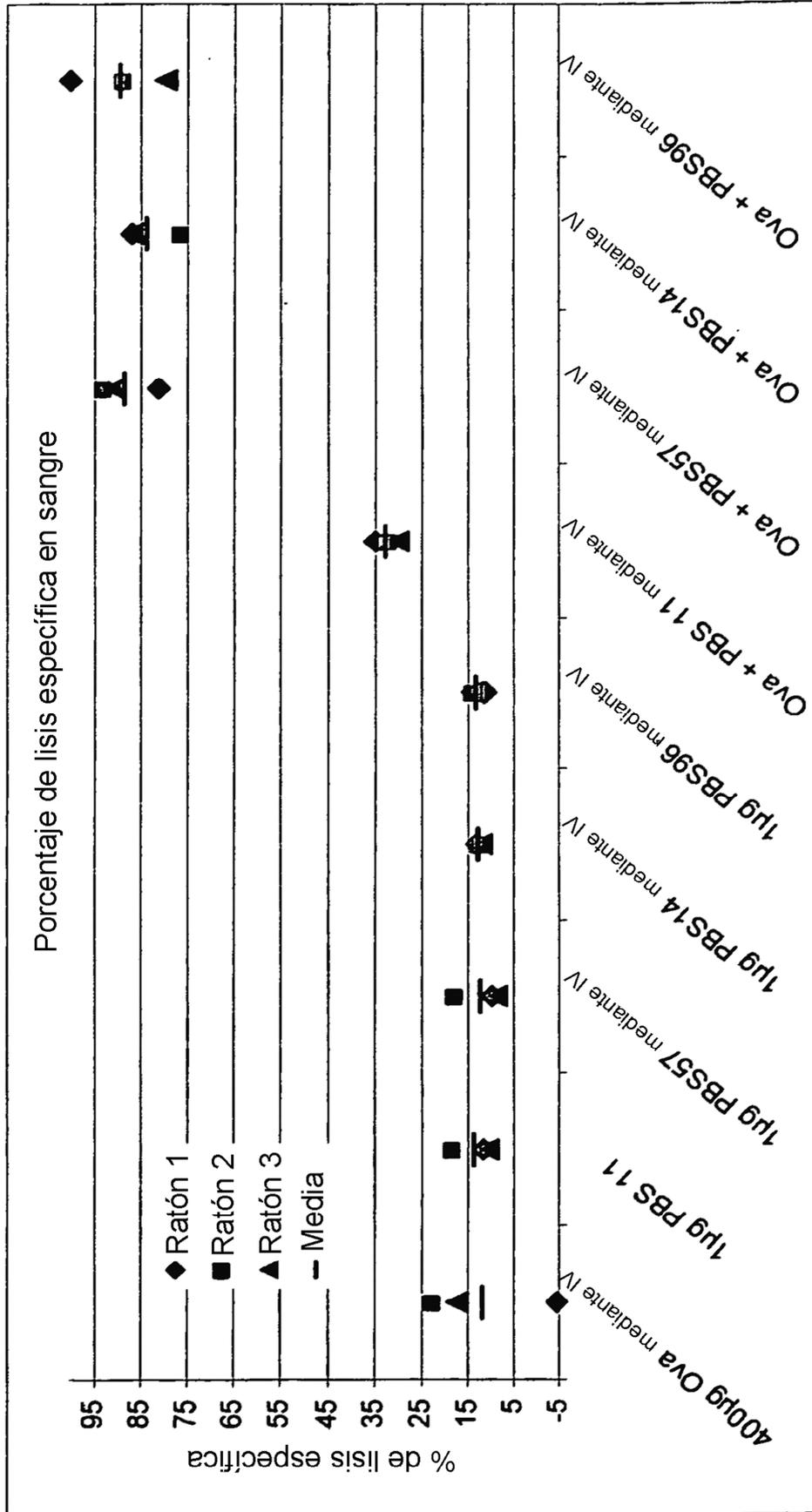


FIG. 6

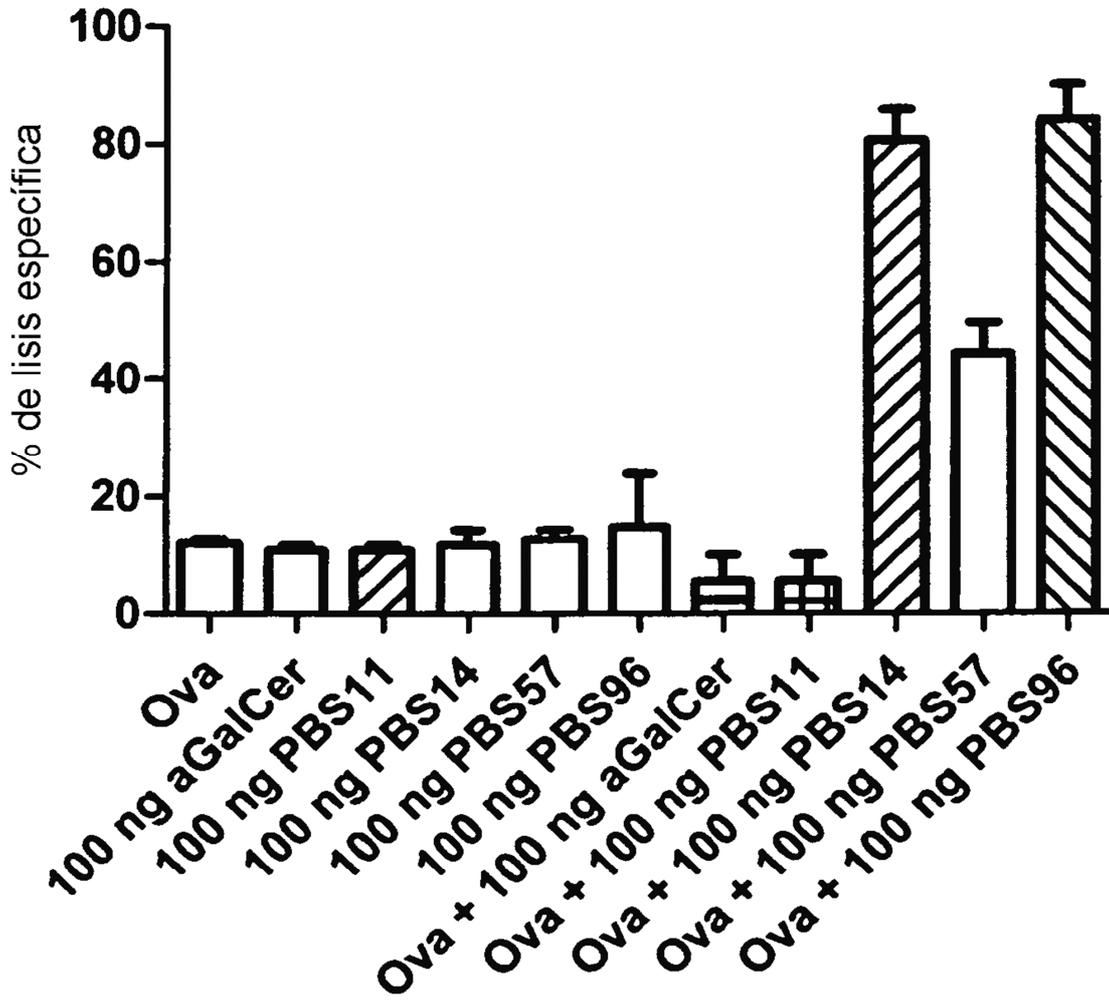


FIG. 7

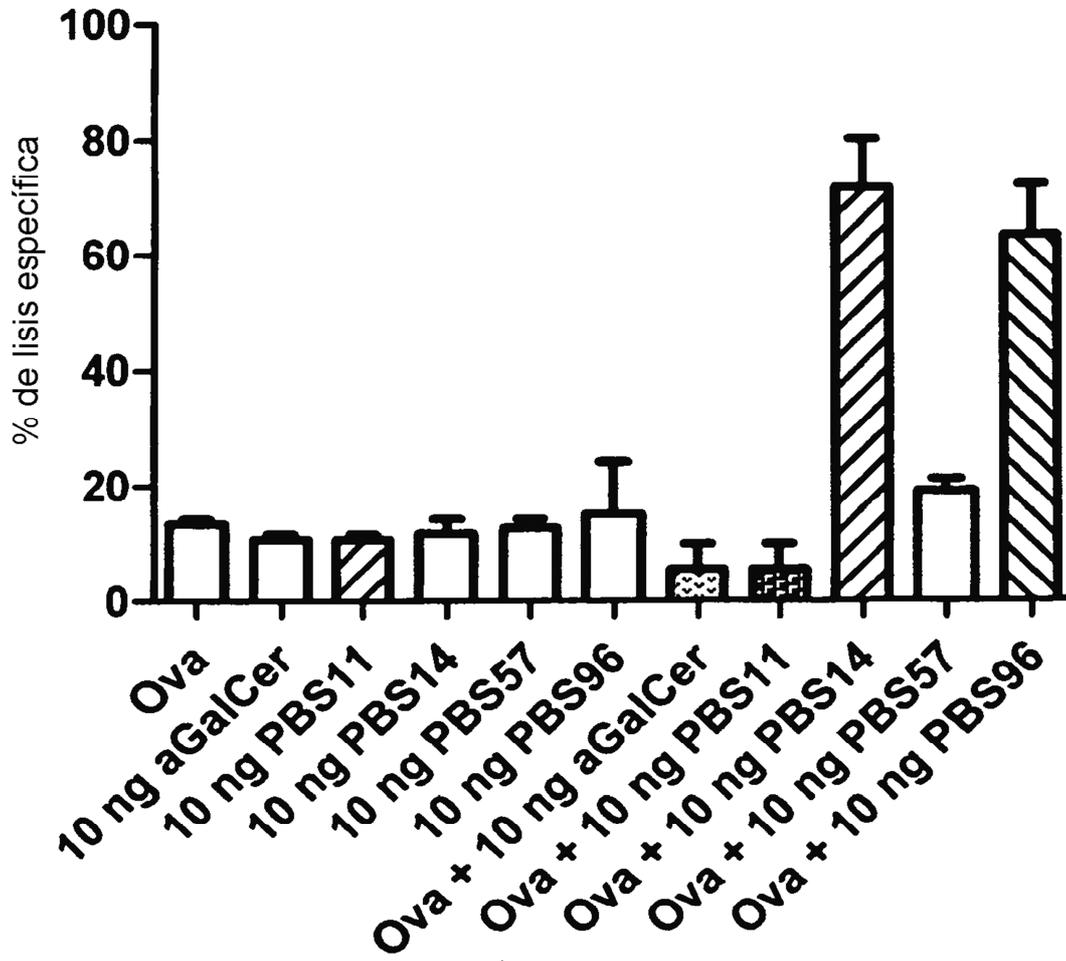


FIG. 8

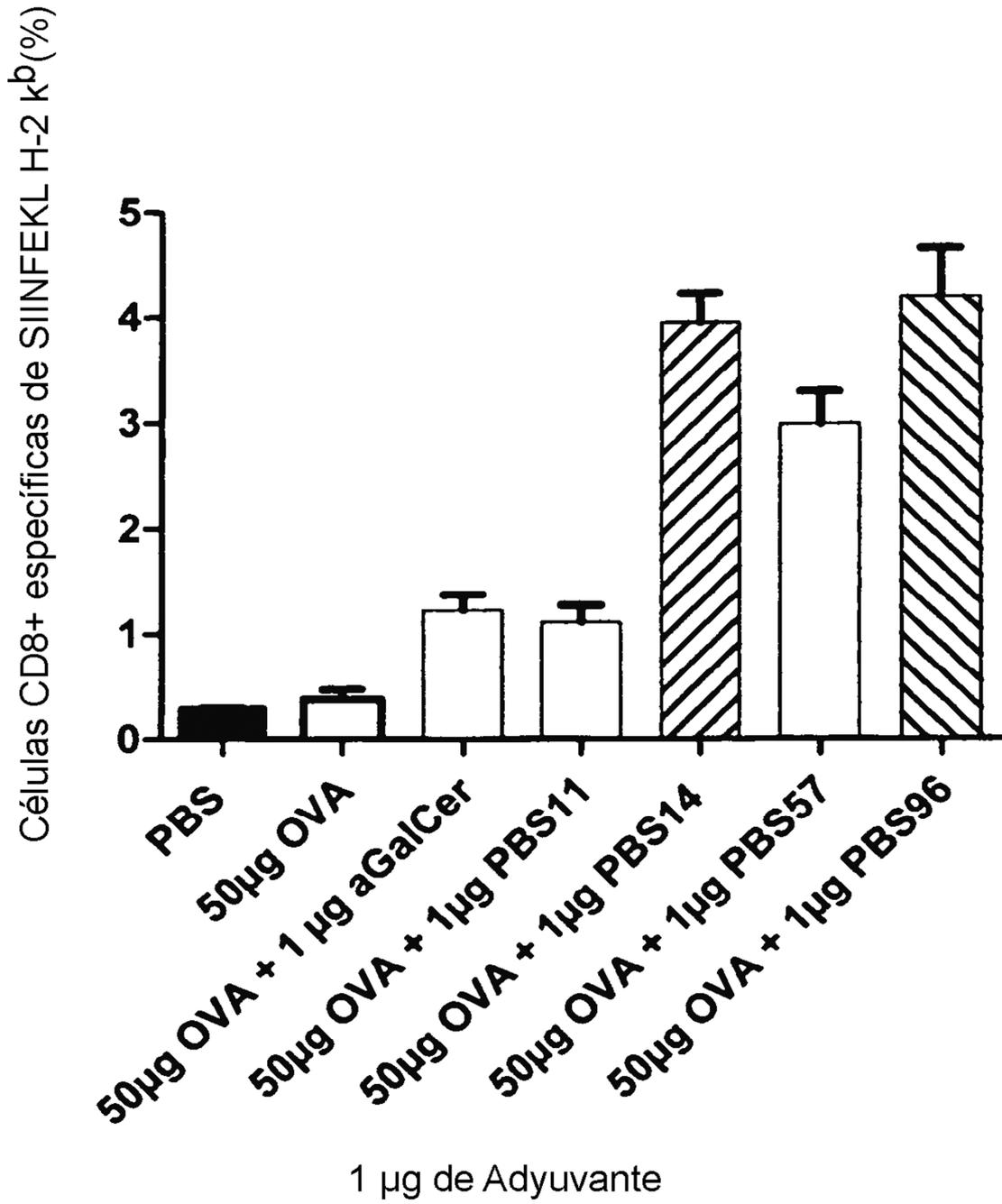


FIG. 9

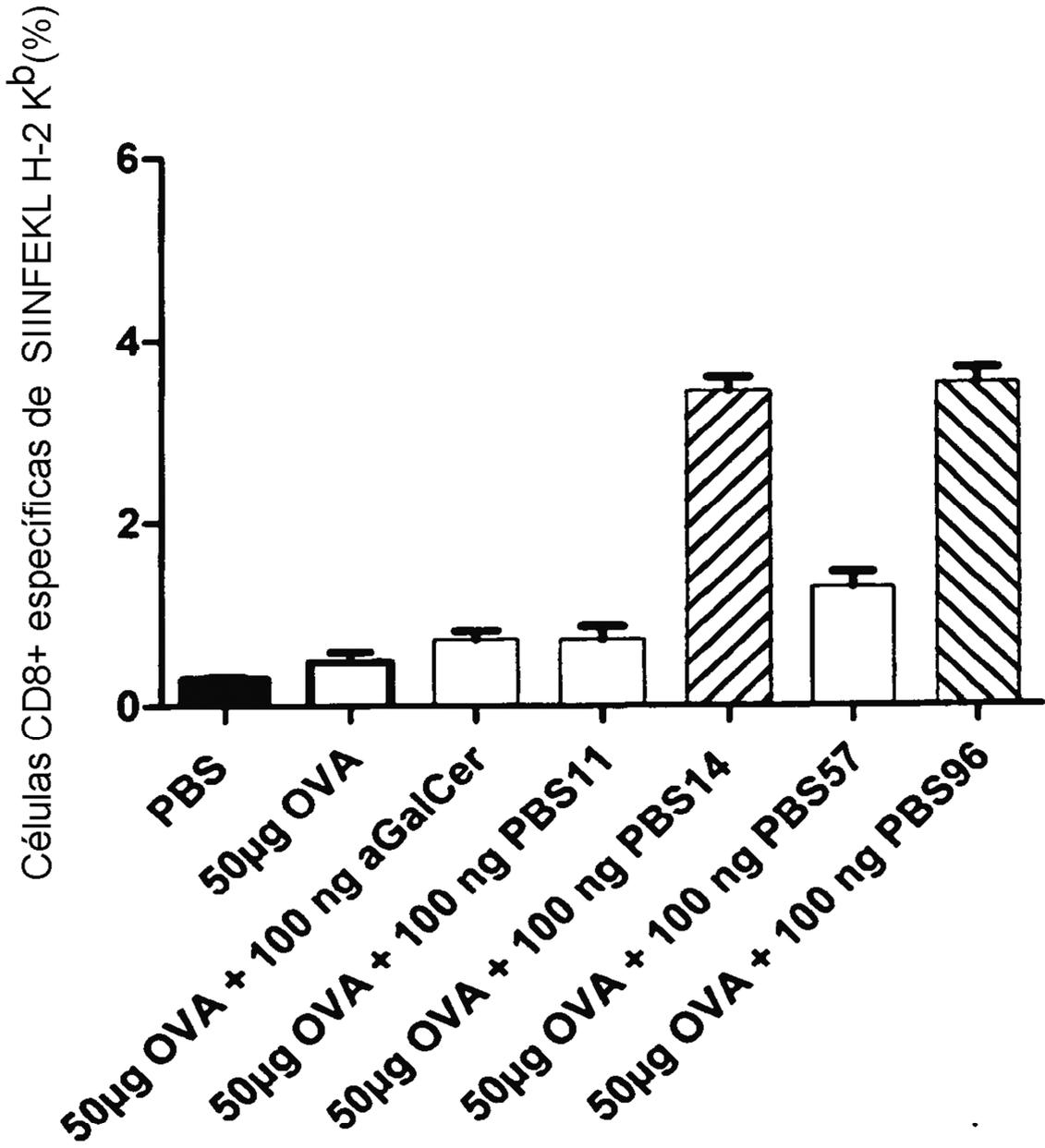


FIG. 10

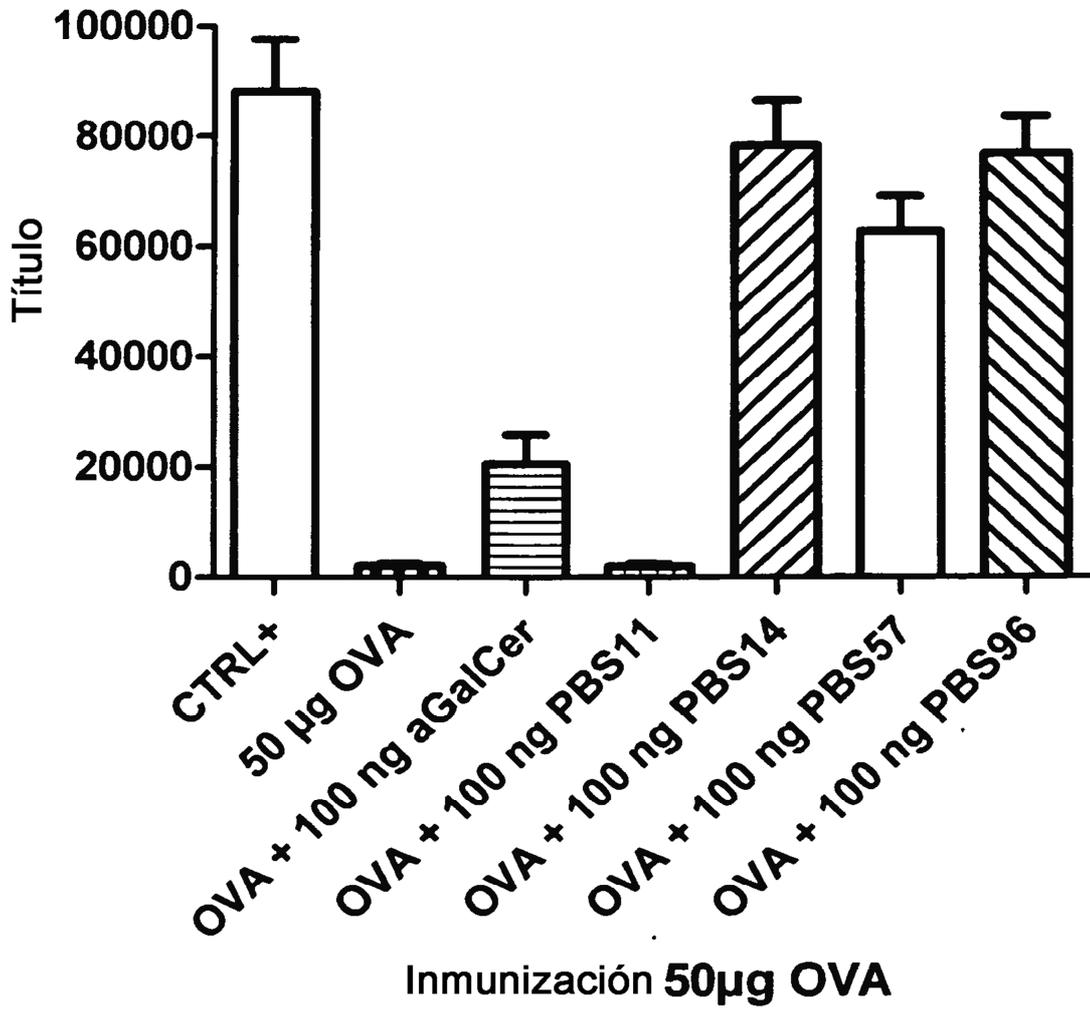


FIG. 11

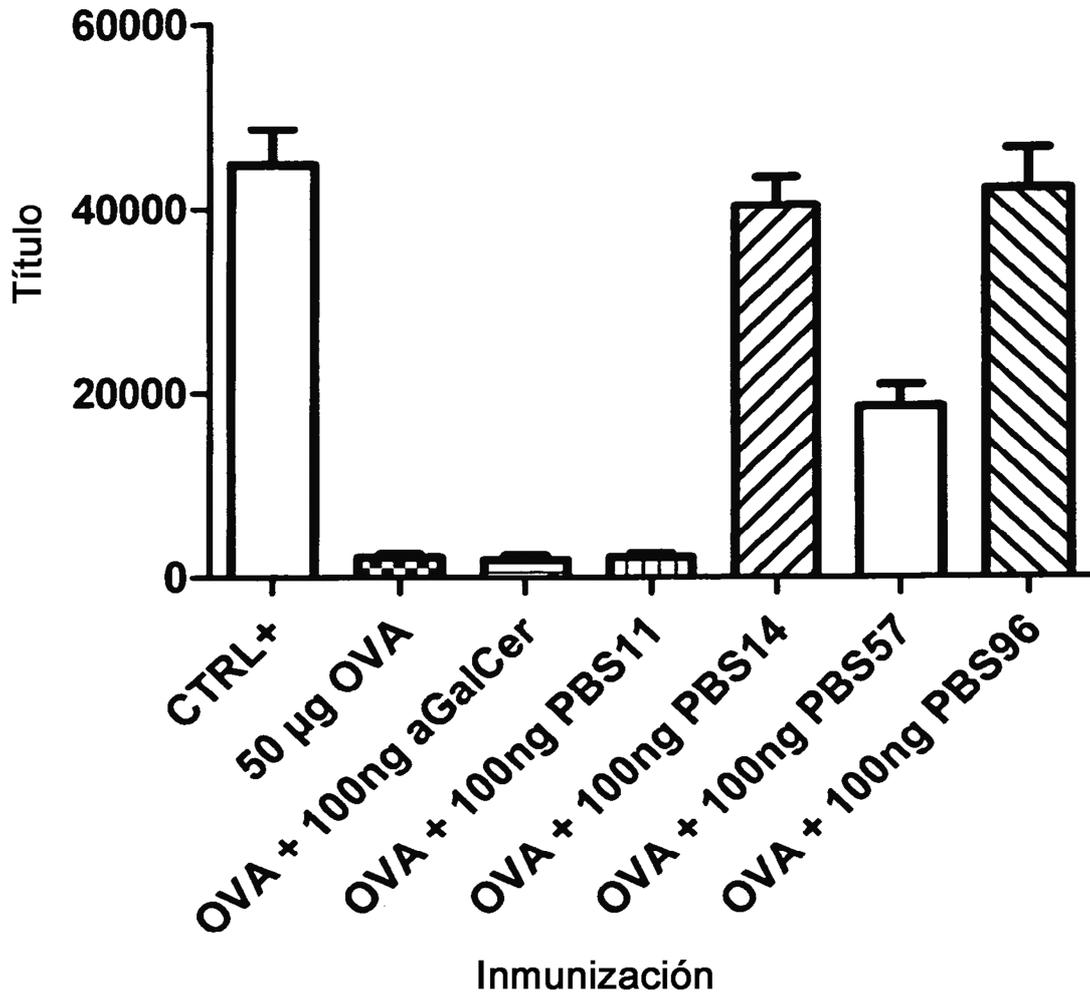


FIG. 12

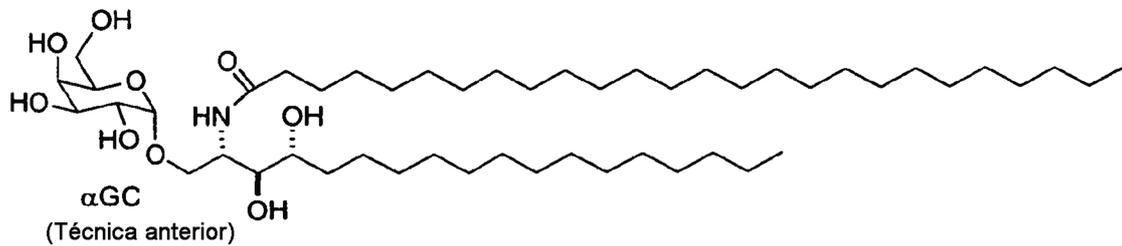
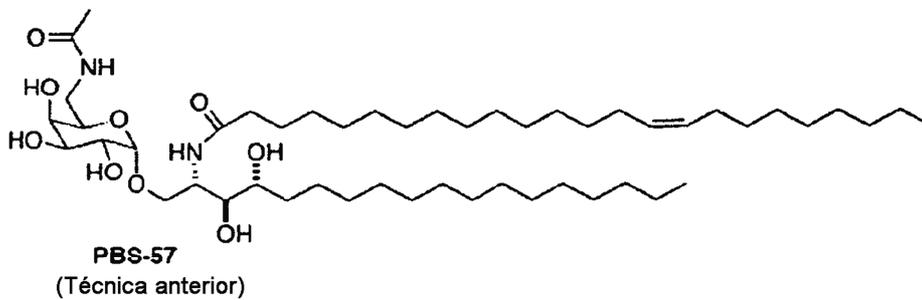
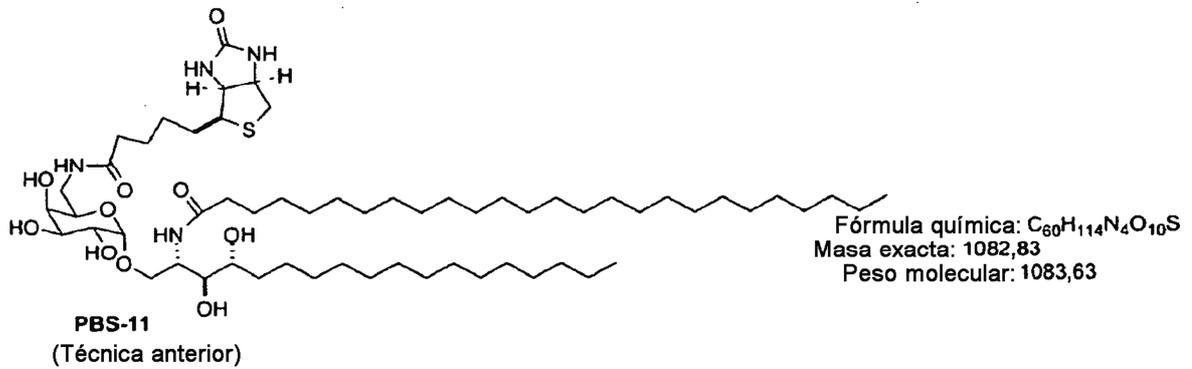
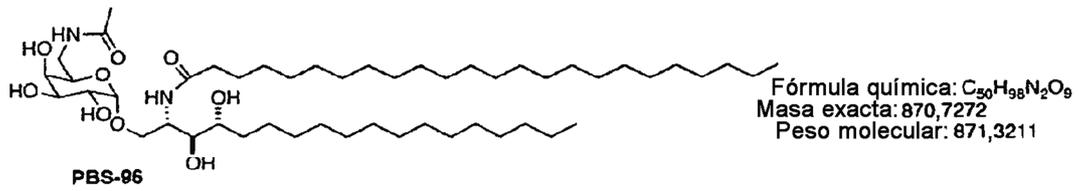
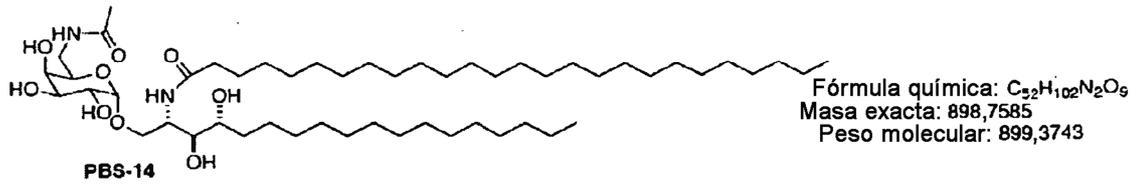


FIG. 13