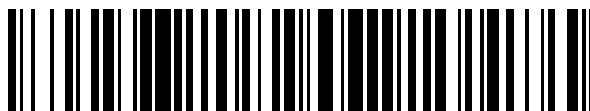


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 808**

51 Int. Cl.:

C07H 15/04 (2006.01)

A61K 31/7032 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011** **E 11157947 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015** **EP 2500349**

54 Título: **Miméticos sintéticos de LTA y uso de los mismos como componente de vacuna para la terapia y/o profilaxis de infecciones gram-positivas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.09.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (50.0%)
Hugstetter Strasse 49
79106 Freiburg, DE y
UNIVERSITEIT LEIDEN (50.0%)

72 Inventor/es:

HUEBNER, JOHANNES;
KROPEC-HUEBNER, ANDREA;
VAN DER MAREL, GIJSBERT ARIE;
HOGENDORF, WOUTER FREDERIK JOHAN y
CODÉE, JEROEN DIRK CORNELIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 544 808 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

Miméticos sintéticos de LTA y uso de los mismos como componente de vacuna para la terapia y/o profilaxis de infecciones gram-positivas

5 La presente invención se refiere a miméticos sintéticos del ácido lipoteicoico (LTA) que son útiles como componentes de vacunas para la terapia y/o profilaxis de la infección bacteriana.

Antecedentes de la invención

10 Los enterococos se encuentran entre los patógenos más importantes asociados con infecciones en pacientes hospitalizados. Especialmente la presencia de determinantes de resistencia a múltiples antibióticos en la mayoría de los aislados clínicamente relevantes insta al desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento alternativas para combatir estas infecciones a veces intratables. Los enterococos han desarrollado mecanismos específicos para adquirir y transmitir el ADN horizontalmente, y estos rasgos son los responsables de numerosos brotes en el ámbito hospitalario.

15 Existen al menos 15 especies de enterococos, pero sólo dos de ellas están comúnmente asociadas con la infección clínica, a saber, *Enterococcus faecalis*, que es responsable del 80% las infecciones causadas por enterococos y *Enterococcus faecium*. La bacteria Gram-positiva *Enterococcus faecalis* es un habitante natural del tracto gastrointestinal de los mamíferos, y se encuentra comúnmente en el suelo, las aguas residuales, el agua y los alimentos, con frecuencia a través de la contaminación fecal (Klare, I., Werner, G. y Witte, W. Contrib. Microbiol. 2001, 8, 108-22).

20 Cepas sensibles de estas bacterias pueden ser tratadas con ampicilina y vancomicina. No obstante, algunos enterococos son resistentes a antibióticos basados en β -lactama (intrínsecamente contra todas las cefalosporinas y, en algunos casos, adquiridos contra penicilinas a través de una beta-lactamasa), así como los aminoglucósidos (resistencia intrínseca de bajo nivel, resistencia de alto nivel adquirida). En las dos últimas décadas, cepas particularmente virulentas de *Enterococcus* que son resistentes a la vancomicina (*Enterococcus* resistentes a la vancomicina, o VRE) han surgido en las infecciones nosocomiales de pacientes hospitalizados, especialmente en los EE.UU., pero en menor medida también en países de todo el mundo. La creciente aparición de cepas de enterococos resistentes a múltiples antibióticos subraya la necesidad de mejorar la comprensión de la patogénesis de la infección (Murray, B.E.N. Engl. J. Med. 2000, 342, 710-721; Theilacker, C., Krueger, W. A., Kropec, A. y Huebner, J. Vaccine 2004, 22 Supl 1, S31-8).

30 Ácidos teicoicos se pueden encontrar en la pared celular de bacterias gram-positivas tales como estafilococos, estreptococos, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* y *Listeria*, y parecen sobresalir de la superficie de la capa de peptidoglicano. Ácidos teicoicos no se encuentran en bacterias gram-negativas. Pueden ser unidos covalentemente al ácido N-acetilmurámico de la capa de peptidoglicano (ácido teicoico de la pared, WTA), o unidos a través de un ancla de lípidos en la membrana citoplasmática (ácido lipoteicoico, LTA).

35 La función principal de los ácidos teicoicos consiste en proporcionar rigidez a la pared celular mediante la atracción de cationes tales como magnesio y sodio. Ácidos teicoicos están habitualmente, pero no siempre, sustituidos con residuos de éster de D-alanina, dando las propiedades de moléculas de iones híbridos. Estos ácidos teicoicos de iones híbridos son sospechosos ligandos para los receptores de tipo Toll 2 y 4. Los ácidos teicoicos también ayudan en la regulación del crecimiento celular mediante la limitación de la capacidad de las autolisinas de romper el enlace $\beta(1-4)$ entre la N-acetil glucosamina y el ácido N-acetilmurámico. Los ácidos teicoicos sirven como un sitio de unión para algunos parásitos. La destrucción de las bacterias y la liberación del ácido teicoico en el torrente sanguíneo pueden causar fiebre, dilatación de los vasos sanguíneos y, posiblemente, choque y muerte subsiguiente. El ácido teicoico también puede ser utilizado por las bacterias para adherirse a las membranas de las mucosas.

45 LTA enterococal es una molécula compleja que consiste en un anclaje de glicolípido y una cadena de fosfato de poliglicerol sustituida de forma no estequiométrica con alanina, kojibiosa, y kojibiosa alaninada (Theilacker, Kaczynski et al. 2006). LTA es un componente integral de la pared celular gram-positiva, y anticuerpos contra este antígeno han demostrado ser protectores contra las infecciones por enterococos (Huebner, Wang et al 1999; Huebner, Quaas et al 2000; Theilacker, Kaczynski et al. 2006). Sin embargo, el componente antigénico que constituye el epítipo protector no se ha definido hasta el momento. Estructuralmente existen moléculas similares en otras bacterias gram-positivas clínicamente relevantes (tales como estreptococos, estafilococos, listeria, etc.) y sueros inmunes de conejo generados contra un LTA de *Enterococcus faecalis* han demostrado ser protectores también contra *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* (Huebner et al., observación no publicada).

55 Ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos se han considerado fuertes pirógenos exógenos, es decir, pertenecen a las sustancias que pueden conducir a una reacción febril en un ser humano después de una infección bacteriana por bacterias gram-positivas. Son muy probablemente reconocidos por el receptor TLR-2 de tipo Toll, que se expresa en monocitos y células dendríticas, linfocitos B y T y macrófagos. Además de ello, conducen a la excreción de

citoquinas y, por lo tanto, son uno de los factores para la reacción inflamatoria después de una infección de este tipo.

Debido a sus propiedades antigénicas, también han sido propuestos como candidatos interesantes para el desarrollo de vacunas sintéticas.

5 El documento US 7.011.826 describe una vacuna para la prevención de la acidosis láctica en un vertebrado, comprendiendo dicha vacuna al menos un microorganismo aislado, o fragmento o fragmentos del mismo, en donde dicho microorganismo es capaz de producir ácido láctico en el intestino de dicho vertebrado, y en donde dicho microorganismo se selecciona del grupo consistente en: especies tipo *Clostridium*, especies tipo *Prevotella*, especies tipo *Bacteroides*, especies tipo *Enterococcus* y especies de *Selenomonas*.

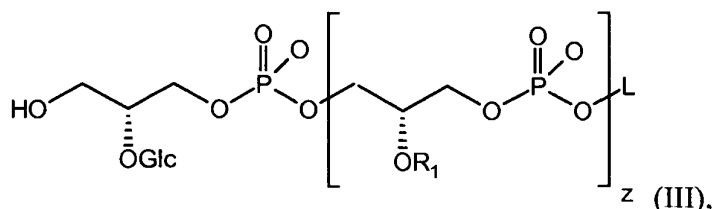
10 Utilizando la información estructural derivada de los estudios anteriormente mencionados, Hogendorf y colegas recientemente sintetizaron miméticos de la columna vertebral Enterococcus glycerophosphate (Hogendorf, Bos et al. 2010).

15 Morath et al. (en Morath et al. Synthetic lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus is a potent stimulus of cytokine release. J Exp Med. 17 de junio de 2002; 195(12): 1635-1640) describen la síntesis de una molécula de LTA completa con seis unidades de glicerofosfato que portan cuatro sustituyentes alanina más un sustituyente de *N*-acetil-glucosamina, que exhibía la misma potencia para activar monocitos tal como LTA nativo. Sin embargo, se requirieron concentraciones 100-1.000 veces más altas del anclaje lipídico para la inducción de citoquinas. Se ha de señalar que esta molécula sintética no se desarrolló como agentes terapéuticos, sino para demostrar la hipótesis de que el LTA tiene actividad proinflamatoria. Además de ello, la complejidad de las etapas sintéticas implicadas en la producción de su LTA sintético impide el uso de este material como una vacuna.

20 Deiningner S et al. (en Deiningner et al., Use of synthetic derivatives to determine the minimal active structure of cytokine-inducing lipoteichoic acid. Clin Vaccine Immunol. diciembre de 2007; 14(12):1629-1633. Epub 10 de octubre de 2007) describen que la síntesis química de LTA demostró sus propiedades inmunoestimulantes. Para determinar la estructura activa mínima de LTA, redujeron LTA sintético en un cierto número de etapas hacia el anclaje sintético y emplearon estas moléculas para estimular la liberación de interleucina-8 (IL-8) en sangre entera humana. Para inducir la liberación de IL-8 se requerían diez veces más de las estructuras sintéticas con cuatro a seis unidades de poliglicerofosfato (50 nM) sustituido con d-alanina que de la preparación de LTA nativo. Una reducción adicional a tres unidades de la cadena principal con dos residuos de d-alanina o sin ellos dio lugar a la inducción de citoquinas sólo a partir de 500 nM. Cuando se utilizaron los derivados de LTA a 500 nM, éstos indujeron niveles crecientes de IL-8 y factor de necrosis tumoral alfa con un alargamiento creciente de la cadena principal. Una dependencia de TLR2 pudo únicamente observarse con células de ratones deficientes en TLR2 para las dos estructuras sintéticas más grandes. Esto se confirmó mediante el uso de células HEK 293 transfectadas con TLR2. Tomados en conjunto, estos datos indican que aunque el anclaje sintético (que, a diferencia del anclaje nativo, contiene sólo ácido mirístico) no puede inducir la liberación de citoquinas, la adición de tres unidades de la cadena principal, incluso sin sustituyentes de d-alanina, confiere esta capacidad. El alargamiento de la cadena con unidades de la cadena principal sustituidas con d-alanina resultó en una potencia inductora de citoquinas incrementada y una respuesta más sensible.

40 En la elucidación del modo de acción molecular de LTAs en la ejecución de una respuesta inmune, fragmentos puros y bien definidos serían valiosas herramientas. Además de ello, una síntesis eficaz también permitiría producir cantidades suficientes de material según fuese necesario. Es, por tanto, un objeto de la presente invención proporcionar fragmentos sintéticos (miméticos) eficaces, puros y bien definidos de LTA, en particular con el fin de desarrollar una nueva vacuna prometedora para una inmunoterapia activa o pasiva de bacterias, y en particular enterococos. Además de ello, se han de proporcionar métodos mejorados para una síntesis automatizada.

La presente invención satisface estas necesidades proporcionando un mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) que tiene la siguiente fórmula general (III)



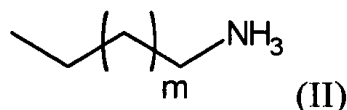
45 en donde z es un número entero seleccionado de 1 a 40, y preferiblemente seleccionado de 4 a 6, en donde R₁ se selecciona de H o un resto carbohidrato, y L es un resto enlazador para conectar dicho mimético a una proteína de soporte adecuada,

o sales o solvatos del mismo.

Este mimético sintético de LTA de la pared celular proporciona una diana antigénica nueva y eficaz para el desarrollo de estrategias más eficientes para tratar con eficacia y/o prevenir la infección en los vertebrados provocada, al menos en parte, por enterococos u otras bacterias gram-positivas, permite mejorar estrategias de vacunación y permite el desarrollo y la producción de vacunas respectivas tales como vacunas de glicoconjugados.

Los autores de la invención se propusieron desarrollar una metodología sintética para ensamblar de manera eficiente tipos LTA de glicopolímeros. A este respecto, es de interés señalar que estudios de la estructura y actividad de derivados sintéticos de fragmentos de ácido lipoteicoico (LTA) de *Staphylococcus aureus* condujeron al descubrimiento de ligandos para el receptor TLR-2 humano (véase, por ejemplo, Morath et al. y Deininger S et al. como se cita anteriormente). Los autores de la invención dirigieron su atención primero al TA de *Enterococcus faecalis*, que está constituido por 1,3-poli(glicerolfosfato) decorado al azar en las posiciones C-2 con D-alanina, kojibiosa (α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2)- α -D-glucosa) o 6,6'-di-alanil- α -kojibiosa.

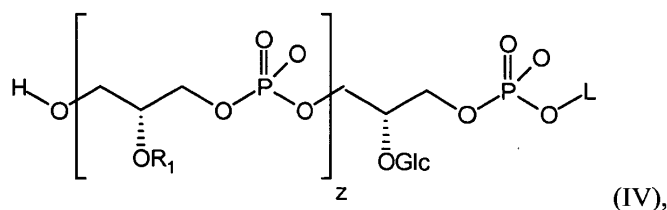
Los compuestos anteriores incluyen un grupo enlazador L con el fin de ser acoplado a o conjugado con otras entidades químicas. Estos grupos enlazadores son conocidos en el estado de la técnica, y habitualmente son inmunológicamente inactivo, es decir, no interfieren con las propiedades inmunológicas del mimético sintético de LTA. Enlazadores preferidos incluyen, pero no se limitan a enlazadores alquil C₁ a C₁₂-amino, que están opcionalmente sustituidos con otros grupos, o enlazadores peptídicos. Otras modificaciones incluyen la adición de restos químicos al mimético de LTA (también incluido en "L") con el fin de portar una etiqueta detectable tal como grupos quelantes o grupos enzimáticos. Además de ello, se pueden añadir péptido (p. ej., His) u otros "marcadores" o "etiquetas" con el fin de poder purificar y/o utilizar el mimético sintético LTA, por ejemplo, en ensayos de diagnóstico. Por lo tanto, se prefiere un mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, en donde L se selecciona de un grupo alquilamino que tiene la fórmula general (II)



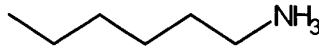
en donde m es un número entero seleccionado de 1 a 20.

El mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención incluye, además, restos carbohidratos tales como, por ejemplo, un resto glucosilo (Glc). Preferiblemente, estas unidades de restos carbohidratos se seleccionan de unidades de monosacáridos o disacáridos según se encuentran en enterococos o estafilococos tales como glucosa (Glu), glucosamina, N-acetil glucosamina, galactosa, ramnosa, gentiobiosa o kojibiosa.

También se prefiere adicionalmente un mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, que tiene la siguiente fórmula general (IV)



en donde z es un número entero seleccionado de 1 a 40, y preferiblemente seleccionado de 4 a 6.

En ambas de estas realizaciones, L es preferiblemente . No obstante, por supuesto, este grupo también se puede utilizar con los otros miméticos sintéticos de ácido lipoteicoico (LTA) de la presente invención. Más preferidos son compuestos WH6 y WH7 según se describe en esta memoria (véanse las Figuras).

En general, el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención incluye 2 a 40 unidades repetitivas de fosfato de poliglicerol tales como, por ejemplo, 3, 4, 5 ó 6, o 10 a 20. Aunque se especula que la actividad inmunológica de dicha molécula aumenta con su longitud de unidades de fosfato de poliglicerol, los autores de la presente invención pudieron demostrar que moléculas más cortas ya pueden ser bastante eficaces en su respuesta inmune (tales como, por ejemplo, hexámeros, véanse los ejemplos). Debido al hecho de que estas

moléculas son más fáciles de sintetizar, una molécula en donde n o z es 5 ó 6 es la más preferida.

Otro aspecto de la invención se refiere entonces a una composición farmacéutica, que comprende al menos uno del mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención y/o al menos un anticuerpo de acuerdo con la presente invención tal como se describe más adelante, junto con al menos soporte, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Particularmente preferida es una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicha composición comprende un mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) según se describe en esta memoria.

Se prefiere adicionalmente una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicha composición se formula como una vacuna, en particular contra las infecciones causadas por enterococos, en particular enterococos resistentes a antibióticos tales como cepas de VRE, preferiblemente de *E. faecalis* o *E. faecium*. La más preferida es una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicho mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención está presente en una vacuna de glicoconjugado.

El mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención (presente como el antígeno solo o en un extracto bacteriano o fracción de la pared celular) se utiliza preferiblemente para un enterococo, estafilococo o vacuna neumocócica, ya sea para la inmunización activa o pasiva.

Por lo tanto, la invención proporciona, además, una composición farmacéutica, y en particular una vacuna, para la prevención de infecciones por enterococos en un vertebrado, comprendiendo dicha composición farmacéutica al menos un mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, opcionalmente junto con un soporte, adyuvantes y/o diluyente farmacéuticamente aceptables. Soportes preferidos incluyen, pero no se limitan a CRM (CRM197), hemocianina de *Tachypleus tridentatus* (TTH), hemocianina de *Limulus polyphemus* (LPH), toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), albúmina de suero bovino (BSA) y la proteína ExoU.

Típicamente, la vacuna puede comprender, además, células intactas vivas o muertas de al menos una cepa de enterococos, de preferencia de *E. faecalis*, junto con el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de la invención. Más típicamente, la vacuna comprende lisado de células a partir de al menos una cepa de enterococos. La más preferida es una vacuna de glicoconjugado que comprende el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención. Los métodos para la purificación de las fracciones bacterianas seleccionadas que contienen antígenos de enterococos son conocidos por la persona experta. Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica o vacuna, en donde el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) tal como se ha incluido, se ha producido, al menos en parte, a través de síntesis química.

Típicamente, el vertebrado es un animal monogástrico herbívoro o rumiante o un sujeto humano. Incluso más típicamente, el vertebrado se selecciona del grupo que consiste en ser humano, primate no humano, murino, bovino, ovino, equino, porcino, caprino, leporino, aviar, felino y canino. Más típicamente, el vertebrado se selecciona del grupo que consiste en humano, ovino, camélidos, porcino, bovino, equino o canino.

La composición farmacéutica se puede formular para la administración por vía intramuscular, subcutánea, tópica u otra vía parenteral. En general, los microorganismos de la presente invención son comensales en la naturaleza. Por lo tanto, la administración oral no es generalmente una vía eficaz de vacunación y, como consecuencia, se prefiere una administración a través de una vía intramuscular, subcutánea tópica u otra vía parenteral. Preferiblemente, la vacuna se formula para administración por vía intramuscular, subcutánea, o por inhalación. La vacuna también puede incluir citoquinas, tales como: G-CSF, GM-CSF, interleucinas o factor de necrosis tumoral alfa, utilizados solos o en combinación.

La composición farmacéutica también puede incluir un adyuvante. Más típicamente, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en Adyuvante Completo/Incompleto de Freund, Adyuvante Montenide Macrol, solución salina tamponada con fosfato y emulsiones de aceite Mannan, saponinas (QuiLA) dextrano (sulfato de dextrano, DEAE-dextrano), compuestos de aluminio (Imject Alum), N-acetilglucosamiiil-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (adyuvante Gerbu). Más típicamente, el adyuvante se selecciona entre el grupo según se describe en Vaccine 1995, vol. 13, página 1203; 1993 vol. 11 página 293; y 1992 vol. 10 página 427, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia.

Aún otro aspecto importante de la presente invención se refiere entonces al mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, al anticuerpo de acuerdo con la presente invención o a la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de enfermedades tales como infecciones bacterianas, en particular por una bacteria Gram-positiva tal como, por ejemplo, la infección bacteriana, la infección por enterococos, infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis, endocarditis bacteriana, peritonitis, infecciones de heridas y de tejidos blandos y meningitis o neumonía e infecciones por cuerpos extraños. Dicha bacteria Gram-positiva se puede seleccionar preferiblemente de enterococos, estafilococos o estreptococos tal como, por ejemplo, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos o *S. pyogenes* y, en

particular, cepas resistentes a antibióticos de los mismos.

Otro aspecto de la invención se refiere entonces a un método para producir el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de la invención, en el que dicho método comprende sintetizar dicho mimético a través de síntesis química, que comprende, por ejemplo, química en fase de solución y/o en fase sólida. En el contexto de los experimentos de la presente invención, fosforamidita-kojibiosil-glicerol en combinación con una glicerolfosforoamidita, una aminohexil-fosforoamidita y dibencilglicerol se acoplaron a un hexámero de glicerol TA totalmente protegido, utilizando la química que puede ser modificada para la síntesis automatizada. La desprotección global proporcionó el hexámero deseado.

Se prefiere un método para producir el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, que comprende sintetizar dicha molécula sobre un material de fase sólida. Los métodos de la presente invención son más preferiblemente en un formato de síntesis en fase sólida automatizada. Dicho formato ha sido desarrollado por los autores de la invención y se ha utilizado para construir WH6 (Fig. 1) y WH7 (Fig. 2), empleando equipos de la síntesis de ADN/ARN automatizados comercialmente disponibles en combinación con bloques de construcción de glicerolfosforamidita hechos a medida.

Otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o fragmento antigénico del mismo, que reconoce específicamente el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención. El término "anticuerpo" incluirá anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos, tales como Fab y similares, así como anticuerpos humanos o humanizados.

Otro aspecto de la invención se refiere entonces a un método para producir el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, que comprende inmunizar a un mamífero, preferiblemente un conejo, con el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, o una con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención o, preferiblemente, la vacuna de acuerdo con la presente invención, y, opcionalmente aislar dicho anticuerpo de dicho animal. Métodos respectivos son conocidos por la persona experta y se describen en el estado de la técnica.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere entonces a un método para producir un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención que es específico para el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, que comprende generar células de hibridoma que producen dicho anticuerpo monoclonal como un anticuerpo, o que comprende una producción recombinante de dicho anticuerpo en una célula huésped. Métodos respectivos son conocidos para la persona experta, y se describen en el estado de la técnica.

Todavía otro aspecto importante de la presente invención se refiere entonces al uso del mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención como un antígeno en la producción de anticuerpos que son específicos para dicho antígeno.

Aún otro aspecto importante de la presente invención a continuación se refiere al mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, al anticuerpo de acuerdo con la presente invención o a la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento contra infecciones bacterianas o al uso del mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, del anticuerpo de acuerdo con la presente invención o de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para la producción de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad o afección provocada por infecciones bacterianas, en particular la infección por enterococos tal como la infección nosocomial, bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, peritonitis, infecciones de heridas y tejidos blandos, meningitis, neumonía e infecciones de cuerpos extraños, en particular provocadas por enterococos resistentes a antibióticos tales como cepas de VRE tales como *E. faecalis*, así como estafilococos y estreptococos. Preferiblemente, dicho medicamento es una vacuna tal como se describe en esta memoria.

También se describe un método para inducir una respuesta inmune contra al menos una cepa bacteriana Gram-positiva tal como una cepa de enterococos, que comprende el mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de la presente invención en un vertebrado, comprendiendo dicho método la administración a dicho vertebrado de una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna de acuerdo con la invención, o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

Parte de la descripción es, además, un método para tratar o prevenir una infección bacteriana en un vertebrado, que comprende administrar a dicho vertebrado una cantidad terapéuticamente eficaz del mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

Para el método descrito, dicha infección bacteriana, en particular la infección por enterococos, es una infección nosocomial, bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, peritonitis,

infecciones de heridas y tejidos blandos, meningitis, neumonía o infecciones de cuerpos extraños, en particular provocadas por enterococos resistentes a antibióticos tales como cepas de VRE tales como *E. faecalis*, estafilococos o estreptococos.

5 La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes Ejemplos no limitantes preferidos con referencia a las figuras adjuntas.

La Fig. 1 muestra la estructura del mimético sintético de LTA WH6 de acuerdo con la invención.

La Fig. 2 muestra la estructura del mimético sintético de LTA WH7 de acuerdo con la invención.

10 La Fig. 3 muestra la inhibición del exterminio opsonofagocítico de antisuero de conejo anti-LTA con el mimético sintético de LTA WH 6. La barra de color negro representa el exterminio opsónico de sueros anti-LTA en una dilución 1:200. Se añadieron diferentes cantidades de LTA purificado (barras blancas) y WH6 (barras grises) que conducen a una inhibición significativa y dependiente de la dosis del exterminio.

15 Fig. 4: Inhibición del exterminio opsonofagocítico de antisuero de conejo anti-LTA con el mimético sintético de LTA WH 7. La barra de color negro representa el exterminio opsónico de sueros anti-LTA en una dilución 1:200. Se añadieron diferentes cantidades de LTA purificado (barras blancas) y WH6 (barras grises) que conducen a una inhibición significativa y dependiente de la dosis del exterminio.

Ejemplos

Se sintetizaron dos nuevas estructuras como sigue:

20 Soporte de vidrio poroso controlado modificado con aminopropilo (CPG, Fluka) se cargó con 1-O- (succinato de trietilamonio)-2-O-(2,3-di-O-bencil-4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-3-O-(4,4'-dimetoxitritil)-sn-glicerol o 1-O- (succinato de trietilamonio)-2-O-bencil-3-O-(4,4'-dimetoxitritilo)-sn-glicerol (carga: 100 μ mol/g de CPG).

25 Las síntesis automatizadas se realizaron en un sintetizador (AKTA oligopilot plus, GE Healthcare) en una escala de 100-150 mg de CPG funcionalizado (10-15 μ mol derivado de glicerol) y se iniciaron con una etapa de destrilación (ácido dicloroacético al 3% en tolueno 15 ml, 3 min) seguido de lavado con acetonitrilo. El alargamiento se realizó utilizando 1-O-([N,N-diisopropilamino]-2-cianoetoxi-fosfito)-2-O-bencil-3-O-(4,4'-dimetoxitritil)-sn-glicerol o 1-O-([N,N-diisopropilamino]-2-cianoetoxi-fosfito)-2-O-(2,3-di-O-bencil-4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-3-O-(4,4'-dimetoxitritil)-sn-glicerol (0,1 M en ACN, 0,5 ml, 5 eq) y 5-benciltiotetrazol (BTT, 0,3 M en acetonitrilo, 0,75 ml, 22,5 eq) durante 5 min utilizando un flujo de ciclado.

30 Después de lavar con acetonitrilo, se llevó a cabo la oxidación del fosfito resultante utilizando I₂ (0,05 M en piridina/H₂O 9/1,2 ml, 10 eq, 1 min) y se llevó a cabo una etapa de destrilación utilizando el cóctel antes mencionado.

La eficacia de acoplamiento media se midió mediante detección UV cuantitativa (400 nm) del catión dimetoxitritilo durante cada etapa de destrilación. Cuando se obtuvo la longitud deseada, 6-([N, N-diisopropilamino]-2-cianoetoxi-fosfito)-hexil-1-carbamato de bencilo (0,1 M en ACN, 2 x 0,5 ml, 2 x 5 eq, 2 x 5 min) se acopló al oligómero de GPC-TA utilizando BTT (0,3 M en acetonitrilo, 2 x 0,75 ml, 2 x 22,5 eq).

35 La escisión de la resina se vio afectada por el tratamiento con amoníaco (al 25% en H₂O, 10 ml, 1 h, los grupos protectores de cianoetilo se liberan de forma concomitante en esta etapa). Los disolventes se separaron en vacío.

Se utilizó el análisis LC-MS (columna: Gemini C-18, dimensiones 4,6/5 mm, eluyente: (NH₄OAc 10 mM en H₂O)/acetonitrilo, 9/1→1/1, detección: UV (215 y 254 nm) para comprobar la integridad del oligómero semiprotectado.

40 Los fragmentos de TA se purificaron utilizando cromatografía de intercambio aniónico (AKTA Explorer, GE Healthcare; columna: Q-Sepharose HR16/10, GE Healthcare; eluyente: tampón A (NaOAc 50 mM, NaClO₄ 50 mM), tampón B (NaOAc 50 mM, NaClO₄ 500 mM), gradiente 1/0 → 0/1)), seguido de desalación utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño (Sephadex G25, GE Healthcare, dimensiones: 26/60 mm, eluyente: NH₄HCO₃ 0,15 M).

45 El oligómero purificado se liofilizó dos veces antes de que se eluyera a través de una pequeña columna que contiene resina de intercambio de cationes Na⁺ Dowex (tipo: 50WX4-200, almacenada en NaOH 0,5 M en H₂O). La desprotección se llevó a cabo tratando los oligómeros (1-5 μ mol) durante 3 días con negro de paladio (20-40 mg)/H₂ en H₂O (3-6 ml) junto con AcOH (3-6 gotas). Subsiguientemente, la mezcla se filtró y los disolventes se separaron a presión reducida antes de que el residuo se purificara por cromatografía de exclusión por tamaño (Sephadex HW40, Toyopearl, dimensiones: 16/60 mm, eluyente: Et₃NHOAc 0,15 M o NH₄OAc 0,15 M). Después de la liofilización repetida (dos veces), el producto se eluyó a través de una pequeña columna que contiene resina de intercambio de cationes Na⁺ Dowex (tipo: 50WX4-200, almacenada en NaOH 0,5 M en H₂O).

50

Síntesis de compuesto WH 6 (véase la Fig. 1):

Síntesis a escala de 15 μmol (150 mg de resina de glicerol). Eficacia de acoplamiento media: 98,2% (5 acoplamientos). La LC-MS indicó un gradiente de formación de producto limpio: NH_4OAc 10 mM en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetronitrilo}$ 1/0 \rightarrow 1/9, t.r. 7,60 min, $[\text{C}_{94}\text{H}_{119}\text{NO}_{38}\text{P}_6 + \text{H}]^{2+}$ requiere 1029,3 encontrado 1029,2.

5 La purificación dio el hexámero semiprotectado en forma de un sólido amorfo blanco (10,5 mg, 32%). ^{31}P -RMN (162 MHz, D_2O): $\delta = 1,0$ (1P), 1,1 (3P), 1,1 (1P), 1,2 (1P); ^1H -RMN (600 MHz, D_2O): $\delta = 0,85 - 1,17$ (m, 6H, 3 x CH_2 espaciador de hexilo), 1,37 (m, 2H, CH_2 espaciador de hexilo), 2,84 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$ espaciador de hexilo), 3,34-4,11 (m, 38H, $\text{CH}_2\text{-O}$ espaciador de hexilo, 12 x CH_2 glicerol, 6 x CH glicerol, H-2, H-3, H-4, H-5, 2 x H-6), 4,29 - 4,71 (m, 16H, 7 x CH_2 Bn, CH_2 carbamato de bencilo), 6,86 - 7,43 (m, 45H, Harom); HRMS: $[\text{C}_{94}\text{H}_{119}\text{NO}_{38}\text{P}_6 + \text{NH}_4 + \text{H}]_2^+$ requiere 1037,3123, encontrado 1037,3120.

Desprotección: El hexámero parcialmente protegido (10,5 mg, 4,87 μmol) se desprotegió utilizando el proceso estándar, proporcionando monoglucosilglicerol hexámero TA WH7 (4,37 mg, 75%) en forma de un sólido blanquecino amorfo. ^{31}P -RMN (162 MHz, D_2O): $\delta = 0,9$ (1P), 1,2 (3P), 1,3 (1P), 1,3 (1P); ^1H -RMN (600 MHz, D_2O): $\delta = 1,36\text{-}1,40$ (m, 4H, 2 x CH_2 espaciador de hexilo), 1,58 - 1,65 (m, 4H, 2 x CH_2 espaciador de hexilo), 2,94 (at, 2H, J = 7,5 Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$ espaciador de hexilo), 3,34 (at, 1H, J = 9,6 Hz, H-4), 3,46 (dd, 1H, J = 3,7 Hz, 9,9 Hz, H-2), 3,55 (dd, 1H, J = 6,1 Hz, 11,8 Hz, CHH glicerol), 3,62 (dd, 1H, J = 4,2 Hz, 11,8 Hz, CHH glicerol), 3,69 - 3,72 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 3,79-4,00 (m, 30H, $\text{CH}_2\text{-O}$ espaciador de hexilo, 11 x CH_2 glicerol, 5 x CH glicerol, H-6), 4,05 (m, 1H, CH glicerol), 5,11 (d, 1H, J = 3,7 Hz, H-1); ^{13}C -RMN (150 MHz, D_2O): $\delta = 25,4$, 26,1, 27,6, 30,4 (4 x CH_2 espaciador de hexilo), 40,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$ espaciador de hexilo), 61,5 (C-6), 63,0 (CH_2 glicerol), 65,2 (CH_2 glicerol), 66,1 (CH_2 glicerol) 67,0 - 67,4 ($\text{CH}_2\text{-O}$ espaciador de hexilo, 9 x CH_2 glicerol), 70,4-70,6 (4 x CH glicerol, C-4), 71,7 (CH glicerol), 72,5 (C-2), 72,8 (C-5), 73,9 (C-3), 76,3 (CH glicerol), 98,7 (C-1); HRMS: $\text{C}_{30}\text{H}_{67}\text{NO}_{36}\text{P}_6 + \text{H}^+$ requiere 1204,1941, encontrado 1204,1957

WH 7 (véase la Fig. 2): Síntesis a escala de 15 μmol (150 mg de resina de glucosil-glicerol). Eficacia de acoplamiento media: 96,9% (5 acoplamientos). La LC-MS indicó un gradiente de formación de producto limpio: NH_4OAc 10 mM en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetronitrilo}$ 9/1 \rightarrow 1/9, t.r. 6,07 min, $\text{C}_{94}\text{H}_{119}\text{NO}_{38}\text{P}_6 + \text{H}^+$ requiere 2057,6 encontrado 2058,0. El método de purificación B dio el hexámero semiprotectado en forma de un sólido amorfo blanco (11,6 mg, 36%). ^{31}P -RMN (162 MHz, D_2O): $\delta = 1,0\text{-}1,1$ (4P), 1,2 (2P); ^1H -RMN (600 MHz, D_2O): $\delta = 0,90\text{-}1,15$ (m, 6H, 3 x CH_2 espaciador de hexilo), 1,33 (m, 2H, CH_2 espaciador de hexilo), 2,80 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$ espaciador de hexilo), 3,22 - 4,18 (m, 38H, $\text{CH}_2\text{-O}$ espaciador de hexilo, 12 x CH_2 glicerol, 6 x CH glicerol, H-2, H-3, H-4, H-5, 2 x H-6), 4,30 - 4,69 (m, 16H, 7 x CH_2 Bn, CH_2 carbamato de bencilo), 6,86 - 7,26 (m, 45H, H_{arom}); HRMS: $[\text{C}_{94}\text{H}_{119}\text{NO}_{38}\text{P}_6 + \text{H}]^{2+}$ requiere 1028,7991, encontrado 1028,7996. Desprotección: El hexámero parcialmente protegido (2,23 mg, 0,987 μmol) se desprotegió utilizando el proceso estándar, proporcionando monoglucosilglicerol hexámero TA WH6 (1,12 mg, 90%) en forma de un sólido blanquecino amorfo. ^{31}P -RMN (162 MHz, D_2O): $\delta = 1,2$ (1P), 1,2 (3P), 1,3 (1P), 1,3 (1P); ^1H -RMN (600 MHz, D_2O): $\delta = 1,36\text{-}1,40$ (m, 4H, 2 x CH_2 espaciador de hexilo), 1,59 - 1,65 (m, 4H, 2 x CH_2 espaciador de hexilo), 2,94 (at, 2H, J = 7,5 Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$ espaciador de hexilo), 3,36 (at, 1H, J = 9,7 Hz, H-4), 3,48 (dd, 1H, J = 3,8 Hz, 9,9 Hz, H-2), 3,68 - 3,73 (m, 4H, H-3, 2 x H-6, CHH glicerol), 3,77 - 4,02 (m, 32H, $\text{CH}_2\text{-O}$ espaciador de hexilo, 11 x CH_2 glicerol, CHH glicerol, 6 x CH glicerol, H-5), 5,12 (d, 1H, J = 3,7 Hz, H-1); ^{13}C -RMN (150 MHz, D_2O): $\delta = 25,4$, 26,0, 27,6, 30,3 (4 x CH_2 espaciador de hexilo), 40,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$ espaciador de hexilo), 61,5 (CH_2 glicerol), 62,2 (C-6), 65,2 (CH_2 glicerol), 66,9-67,2 ($\text{CH}_2\text{-O}$ espaciador de hexilo, 11 x CH_2 glicerol), 70,4-70,6 (5 x CH glicerol, C-4), 72,4 (C-2), 72,9 (C-5), 73,8 (C-3), 77,8 (CH glicerol), 98,8 (C-1); HRMS: $\text{C}_{30}\text{H}_{67}\text{NO}_{36}\text{P}_6 + \text{H}^+$ requiere 1204,1941, encontrado 1204,1956

El ensayo opsonofagocítico es el mejor sustituto para la respuesta inmune protectora contra agentes patógenos bacterianos. Sueros de conejo generados contra LTA purificado a partir de *E. faecalis* 12030 son capaces de exterminar con eficacia la cepa homóloga, así como un subconjunto de aproximadamente 25% de *E. faecalis* y *E. faecium*. La absorción de este suero con LTA purificado inhibe el exterminio (Theilacker, Kaczynski et al. 2006). Utilizando este enfoque los autores de la invención han sido capaces de inhibir el exterminio del suero anti-LTA con dos estructuras de la cadena principal de LTA sintéticas sustituidas con moléculas de glucosa en diferentes posiciones (véanse las Figuras 1 y 2).

La inhibición con WH6 (véase la Figura 1) y WH7 (véase la Figura 2) dio como resultado la inhibición completa equiparable a LTA de tipo salvaje de longitud completa (véanse las Figuras 3 y 4; barras blancas).

Seis miméticos de LTA diferentes que se sometieron a ensayo de una manera similar no mostraron inhibición significativa o dependiente de la dosis del exterminio.

Por lo tanto, los autores de la invención concluyen que los miméticos de LTA presentados en esta memoria son prometedores objetivos de vacunas contra enterococos y otros patógenos gram-positivos mediante la conjugación de estas moléculas a soportes proteicos apropiados (tales como el toxoide tetánico o toxoide difteria).

Referencias:

J. Huebner, Y. Wang, W. A. Krueger, L. C. Madoff, G. Martirosian, S. Boisot, D. A. Goldmann, D. L. Kasper, A. O. Tzianabos y G. B. Pier (1999). "Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." Infect Immun 67(3): 1213-1219.

- 5 J. Huebner, A. Quaas, W. A. Krueger, D. A. Goldmann y G. B. Pier (2000). "Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and -resistant enterococci." Infect Immun 68(8): 4631-4636.

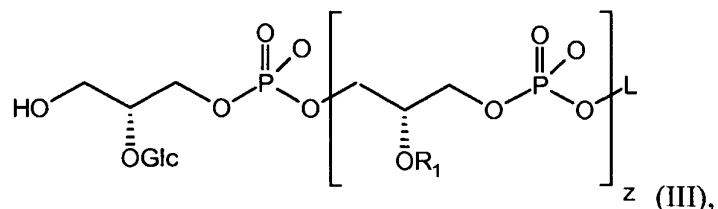
C. Theilacker, Z. Kaczynski, A. Kropec, F. Fabretti, T. Sange, O. Holst y J. Huebner (2006). "Opsonic antibodies to *Enterococcus faecalis* strain 12030 are directed against lipoteichoic acid." Infect Immun 74(10): 5703-5712.

- 10 I. G. Sava, E. Heikens y J. Huebner (2010). "Pathogenesis and immunity in enterococcal infections." Clin Microbiol Infect 16(6): 533-540.

W. F. Hogendorf, L. J. Bos, H. S. Overkleeft, J. D. Codee y G. A. Marel (2010). "Synthesis of an alpha-kojibiosyl substituted glycerol teichoic acid hexamer." Bioorg Med Chem 18(11): 3668-3678.

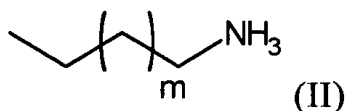
REIVINDICACIONES

1. Un mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) que tiene la siguiente fórmula general (III)



5 en donde z es un número entero seleccionado de 1 a 40, y preferiblemente seleccionado de 4 a 6, en donde R₁ se selecciona de H o un resto carbohidrato, y L es un resto enlazador para conectar dicho mimético a una proteína de soporte adecuada, o sales o solvatos del mismo.

10 2. El mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde L se selecciona de un grupo alquilamino que tiene la fórmula general (II)



en donde m es un número entero seleccionado de 1 a 20.

15 3. El mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho resto carbohidrato es un resto glucosilo (Glc) seleccionado de una unidad de monosacárido o disacárido tal como glucosa (Glu), glucosamina, N-acetil glucosamina, galactosa, ramnosa, gentiobiosa o kojibiosa.

4. El mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde L es



20 5. El mimético sintético de ácido lipoteicoico (LTA) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde z es 5.

6. Una composición farmacéutica, que comprende el mimético de LTA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un soporte, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha composición es una vacuna.

25 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, que comprende, además, al menos una citoquina.

9. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicha vacuna se formula para administración a través de vías intramuscular, subcutánea o por inhalación.

30 10. La molécula de LTA o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad o afección provocada por una bacteria Gram-positiva tal como, por ejemplo, la infección bacteriana, la infección por enterococos, infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis, endocarditis bacteriana, peritonitis, infecciones de heridas y de tejidos blandos y meningitis o neumonía, en donde dicha bacteria Gram-positiva se selecciona preferiblemente de enterococos, estafilococos o estreptococos tal como, por ejemplo, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos o *S.*

pyogenes, *S. pneumoniae*, *C. difficile* y, en particular, cepas resistentes a antibióticos de los mismos.

11. Un método para producir una molécula de LTA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende sintetizar dicha molécula sobre un material en fase sólida.
- 5 12. Un método para producir un anticuerpo que se une específicamente a una molécula de LTA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende inmunizar un animal adecuado con una molécula de LTA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y aislar dicho anticuerpo a partir de dicho animal.
13. La molécula de LTA o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o un anticuerpo producido de acuerdo con la reivindicación 12, para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad o afección provocada por una bacteria.
- 10 14. La molécula de LTA o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha enfermedad o afección provocada por una bacteria se selecciona de infección bacteriana, infección por enterococos, infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis bacteriana, peritonitis, infecciones de heridas y de tejidos blandos, y meningitis o neumonía.
- 15 15. La molécula de LTA o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, en donde dicha composición farmacéutica es una vacuna.

Figura 1:

WH6

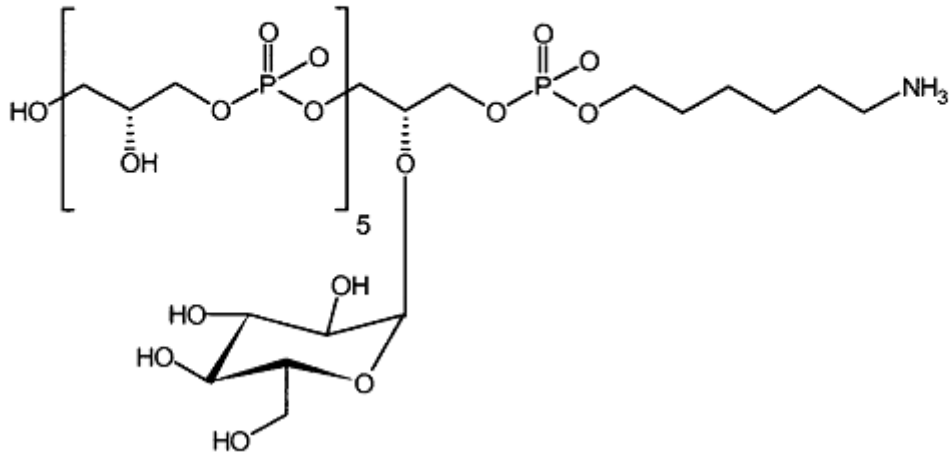


Figura 2:

WH7

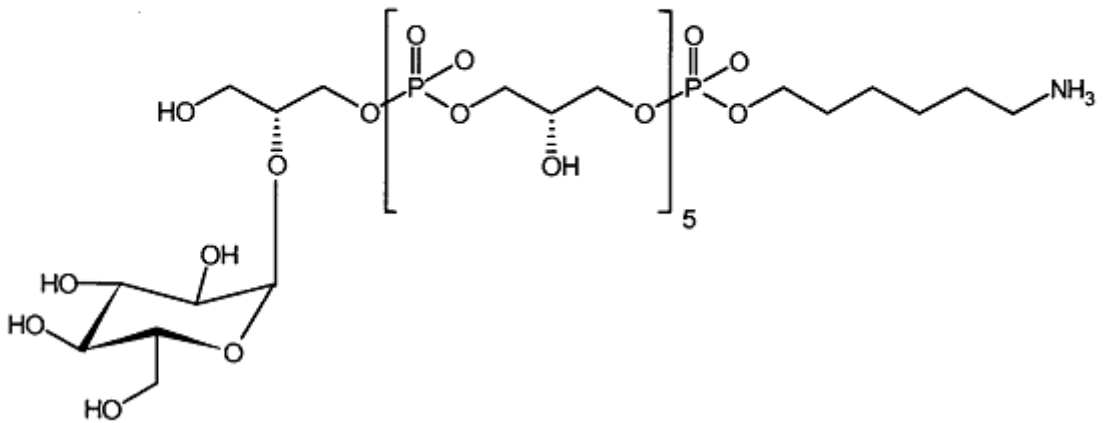


Figura 3

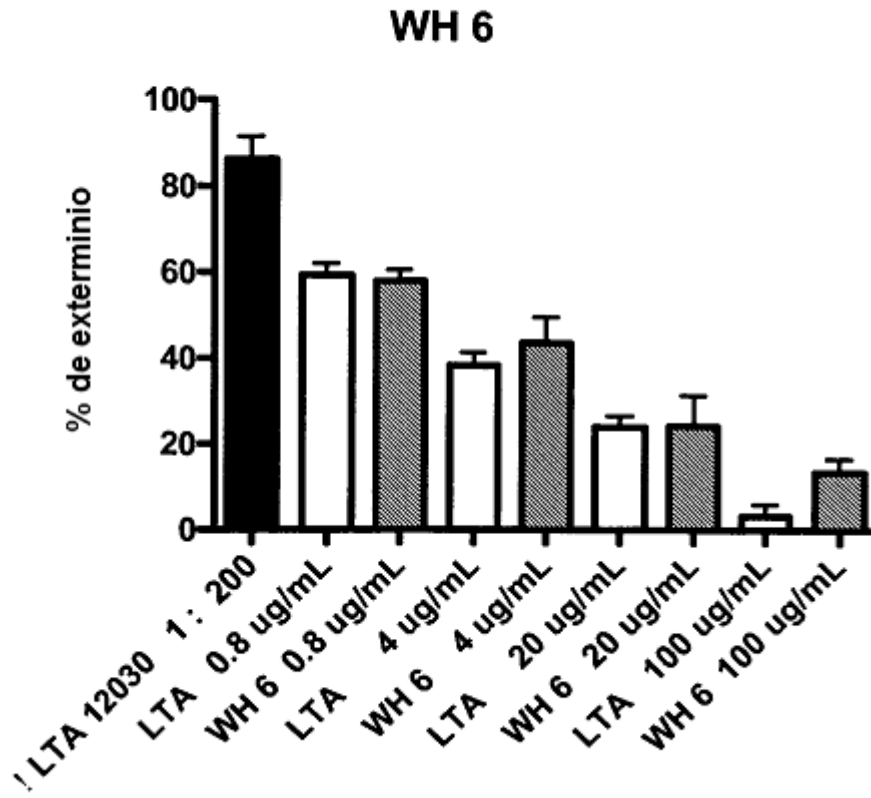


Figura 4

