

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 969**

51 Int. Cl.:

C07H 15/18 (2006.01)
A61K 31/7034 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2009 E 09795269 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2320947**

54 Título: **Análogos de α -galactosil-ceramida y su uso en inmunoterapias, adyuvantes, y agentes antivirales, antibacterianos y anticancerígenos**

30 Prioridad:

11.07.2008 US 218082

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.09.2015

73 Titular/es:

ACADEMIA SINICA (100.0%)
128 Academia Road, Section 2, Nankang
Taipei 115, TW

72 Inventor/es:

WONG, CHI-HUEY;
YU, ALICE;
CHANG, YA-JEN;
LIN, KUN-HSIEN;
CHENG, EDMOND Y.S.;
JAN, JIA-TSRONG;
LIN, YI-LING y
HUNG, JUNG-TUNG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 545 969 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

Análogos de α -galactosil-ceramida y su uso en inmunoterapias, adyuvantes, y agentes antivirales, antibacterianos y anticancerígenos

Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a análogos de α -galactosil-ceramida (alfa-GalCer), y a su uso como inmunoterapias, adyuvantes, y agentes antivirales, antibacterianos y anticancerígenos.

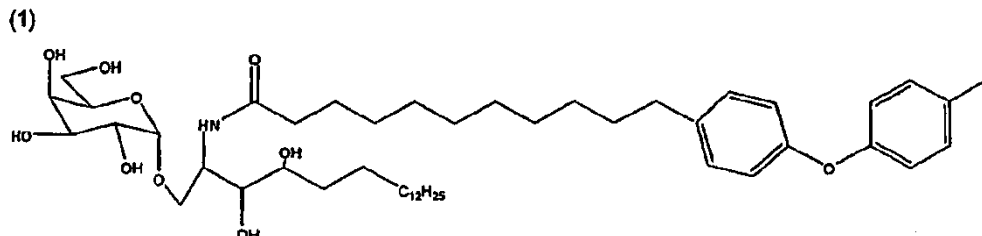
Antecedentes

Los linfocitos T citolíticos naturales (NKT) representan un subconjunto de linfocitos T con propiedades únicas, entre las que se incluyen la reactividad hacia los glucolípidos naturales o sintéticos presentados por CD1d y la expresión de una cadena α de receptor de antígeno de linfocitos T (TCR) invariable. Los NKT se diferencian de los linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales diferenciados funcionalmente en que comparten propiedades tanto de los linfocitos citolíticos naturales como de los linfocitos T, y en que pueden producir rápidamente respuestas tanto de tipo T_H1 como de tipo T_H2 tras la estimulación con sus ligandos (inmunidad innata). Paradójicamente, la activación de los NKT puede conducir bien a la supresión o a la estimulación de las respuestas inmunes. Por ejemplo, se piensa que la producción de citocinas T_H1 potencia la inmunidad celular con actividades antitumorales, antivirales/antibacterianas y adyuvantes, mientras que se piensa que la producción de citocinas T_H2 reduce las enfermedades autoinmunes y potencia la producción de anticuerpos. Dado que los NKT desempeñan un papel regulador en el sistema inmune, son dianas atractivas para la inmunoterapia.

En los documentos US 2007/0238871, WO2006/026389 o WO2007/035717, se desvelan ejemplos de α -GalCer que tienen dichas propiedades.

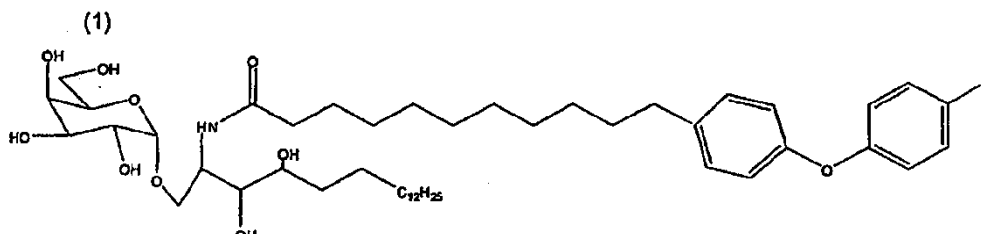
Sumario de la divulgación

La presente invención proporciona un compuesto representado por la estructura de fórmula 1:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en medicina.

La presente invención también proporciona un método de síntesis de un compuesto representado por la estructura de fórmula 1:



que comprende:

proteger selectivamente los grupos 2,3-dihidroxi de D-lixosa con 2-metoxipropeno en presencia de ácido, dando un producto intermedio de actónido;

someter un grupo hidroxilo primario del producto intermedio de actónido a cloruro de tritilo y condiciones básicas, dando un producto intermedio de tritiléter;

hacer reaccionar el producto intermedio de tritiléter con $C_{13}H_{27}^+PPh_3^-Br$ mediante olefinación de Wittig en presencia de hexametildisilazida de litio (LHMDS), mediante lo que se produce un producto intermedio de alqueno con una proporción de *E/Z* de 2:1 según la caracterización por espectrometría de RMN de 1H ;

hidrogenar el producto intermedio de alqueno, dando un alcano;

activar un grupo hidroxilo del alcano mediante anhídrido de triflato y 2,6-lutidina, dando un producto intermedio de

triflato;

hacer reaccionar el producto intermedio de triflato con azida de tetrametilguanidinio (TMGA) mediante la reacción de S_N2 , dando un compuesto de azido con la configuración invertida;

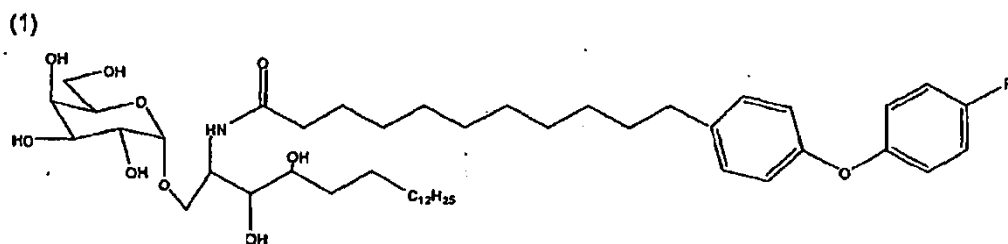
retirar el grupo tritilo del compuesto de azido mediante el uso de ácido trifluoroacético (TFA), dando fitosfingosina;

efectuar la glucosilación del derivado de galactosa donante y la fitoesfingosina aceptora usando anhídrido trifluorometanosulfónico (Tf_2O) y sulfuro de dimetilo (Me_2S) como potenciadores, dando un producto intermedio clave que tenga un grupo azido;

reducir el grupo azido del producto intermedio clave usando una reacción de Staudinger, dando un producto intermedio de amina; y

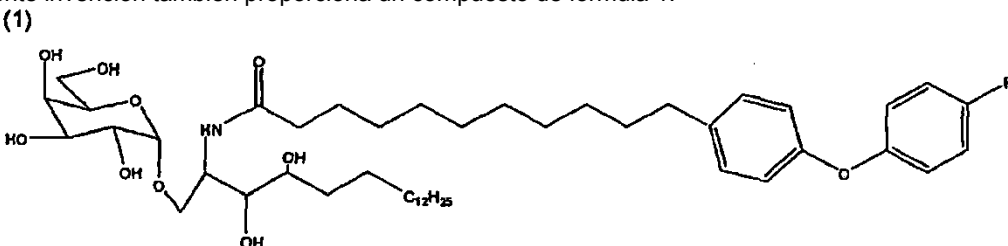
acoplar el producto intermedio de amina con ácido graso usando EDC y HBTU.

La presente invención también proporciona un compuesto de fórmula 1:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una infección viral o bacteriana.

La presente invención también proporciona un compuesto de fórmula 1:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que se puede estimular el desarrollo de DC mediante el uso de factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) o, en otra realización ilustrativa, interleucina (IL)-3, que puede, en otra realización ilustrativa, aumentar la supervivencia de DC.

Como se describe en el presente documento, las DC pueden expresar marcadores mieloides tales como, por ejemplo, CD11c o una cadena de receptor α de IL-3 (IL-3R α) (CD123). En otra realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que las DC pueden producir interferones de tipo I (IFN). También, como se describe en el presente documento, las DC expresan moléculas coestimuladoras. En otra realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que las DC pueden expresar moléculas de adhesión adicionales que pueden, en una realización, servir como moléculas coestimuladoras adicionales, o como se describe en el presente documento, servir para dirigir las DC a determinados sitios *in vivo*, como se describe más detalladamente a continuación.

Como se describe en el presente documento, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que las células dendríticas pueden expresar CD83, un receptor endocítico para aumentar la captación del antígeno propio tal como DEC-205/CD205 en una realización, o marcadores de la superficie celular DC-LAMP (CD208) o, en otra realización, niveles variables de productos de MHC presentadoras de antígeno de clase I y II, o en otra realización, moléculas auxiliares (de adhesión o coestimuladoras) entre las que se incluyen CD40, CD54, CD58 o CD86, o cualquier combinación de las mismas. En otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que las células dendríticas pueden expresar niveles variables de CD115, CD14, CD68 o CD32.

Como se describe en el presente documento, las células dendríticas pueden ser células dendríticas maduras. La expresión "células dendríticas maduras" puede referirse a una población de células dendríticas con expresión reducida de CD115, CD14, CD68 o CD32, o una población de células con expresión aumentada de CD86, o una combinación de las mismas. Las células dendríticas maduras pueden presentar un aumento de la expresión de uno

o más de p55, CD83, CD40 o CD86, o una combinación de los mismos. En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que las células dendríticas expresarán el receptor de DEC-205 en su superficie. En otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que la maduración de las DC se puede realizar a través de, por ejemplo, la ligadura de CD40, la adición de oligodesoxirribonucleótido CpG, la ligadura de IL-1, TNF α o ligando del receptor de tipo Toll, la adición de lipoglucano bacteriano o polisacáridos, o la activación de una vía intracelular tal como TRAF-6 o NF- κ B.

En una realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que la inducción de la maduración de las DC puede ser en combinación con la administración del receptor endocítico de un antígeno preseleccionado. En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que la administración del receptor endocítico de antígeno puede ser mediante el uso del receptor de DEC-205.

En una realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que se puede confirmar el estado de maduración de las células dendríticas, por ejemplo, mediante la detección de uno cualquiera o más de 1) un aumento de la expresión de uno o más de los antígenos p55, CD83, CD40 o CD86; 2) la pérdida del antígeno CD115, CD14, CD32 o CD68; o 3) la inversión a un fenotipo de macrófagos caracterizado por el aumento de la adhesión y la pérdida de velos tras la supresión de las citocinas que potencian la maduración de las células PBMC a las células dendríticas inmaduras, mediante métodos bien conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, inmunohistoquímica, análisis FACS y otros.

En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que la expansión de los NKT varía en respuesta a un antígeno de presentación. En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que se suministra un análogo de α -GalCer en el cultivo simultáneamente al contacto de las células dendríticas con los NKT. En otra aplicación, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que las células dendríticas que ya han procesado el antígeno se ponen en contacto con los NKT.

La expresión "poner en contacto una célula diana" puede referirse en el presente documento a la exposición tanto directa como indirecta de la célula al elemento indicado. En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que el contacto de los NKT con un análogo de α -GalCer, una citocina, factor de crecimiento, célula dendrítica o combinación de los mismos, es directo o indirecto. En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que el contacto de una célula puede comprender la inyección directa de la célula a través de cualquier medio bien conocido en la técnica, tal como la microinyección. También se prevé, en otra realización, que el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que el suministro a la célula es indirecto, tal como a través de la disposición en un medio de cultivo que rodea a la célula o la administración a un sujeto, a través de cualquier vía bien conocida en la técnica, y como se describe a continuación.

Los métodos de cebado de células dendríticas con el antígeno son bien conocidos por el experto en la materia, y se pueden efectuar, como se describe, por ejemplo, en Hsu *et al.*, *Nature Med.* 2: 52-58 (1996); o Steinman *et al.*, solicitud internacional PCT/US93/03141.

En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que el análogo de α -GalCer se administra a un sujeto y, en otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que α -GalCer se dirige a la célula dendrítica, en la que se produce la captación *in vivo*, para los métodos como los descritos a continuación en el presente documento.

En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que la captación y el procesamiento del análogo de α -GalCer pueden ocurrir en el transcurso de 24 horas, o en otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que pueden ser necesarios períodos de tiempo más largos, tales como, por ejemplo, hasta e incluyendo 4 días o, en otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que pueden ser necesarios períodos de tiempo más cortos, tales como, por ejemplo, períodos de aproximadamente 1-2 horas.

En otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los NKT expandidos por las células dendríticas son autólogos, singénicos o alogénicos, con respecto a las células dendríticas.

Como se describe en el presente documento, los NKT se pueden usar para modular una respuesta inmune de una manera específica de la enfermedad. Se ha de entender que los linfocitos NKT se pueden usar, por tanto, para cualquier respuesta inmune en la que se desee aumentar la producción de citocinas u obtener un determinado perfil de citocinas, incluyendo el interferón- γ , la interleucina-2 y/o la interleucina-4.

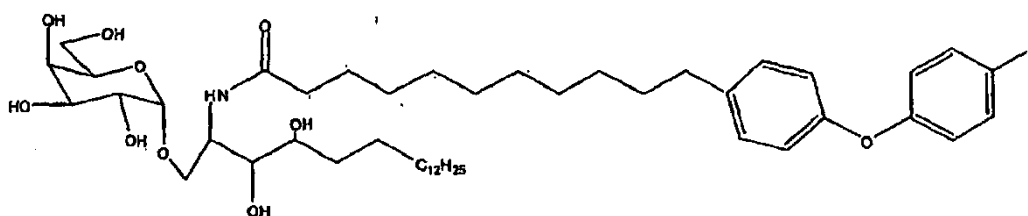
Como se describe en el presente documento, los métodos pueden comprender además la etapa de cultivar NKT previamente aislados con células dendríticas adicionales y un análogo de α -GalCer durante un período de tiempo que produzca una mayor expansión de los NKT, una mayor producción de citocinas o una combinación de las mismas.

También se describe en el presente documento un método para retrasar la aparición, reducir la incidencia o suprimir una enfermedad en un sujeto, que comprende las etapas de poner en contacto, en un cultivo, NKT con células dendríticas y un análogo de α -GalCer, durante un período de tiempo que produzca la expansión de los NKT, la producción de citocinas o una combinación de las mismas, y administrar los NKT obtenidos de este modo al sujeto, mediante lo que los NKT retrasan la aparición, reducen la incidencia o suprimen una enfermedad en un sujeto, retrasando así la aparición, reduciendo la incidencia o suprimiendo la enfermedad en el sujeto.

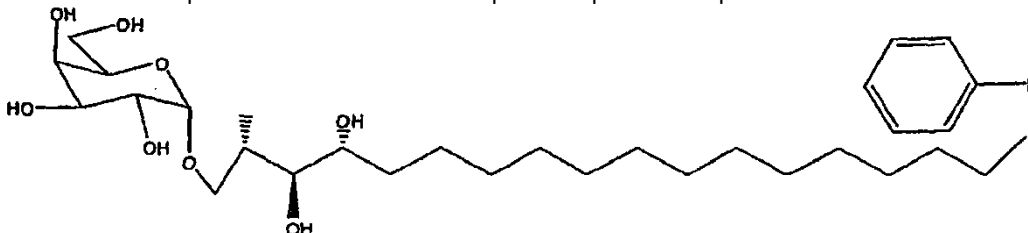
En una realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que las células para la administración a un sujeto en la presente divulgación se pueden proporcionar en una composición. Estas composiciones se pueden administrar por vía parenteral o intravenosa. Las composiciones para la administración pueden ser soluciones estériles, o suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas. Las composiciones pueden comprender propilenglicol, polietilenglicol, ésteres orgánicos inyectables, por ejemplo, oleato de etilo, o ciclodextrinas. Las composiciones también pueden comprender agentes humectantes, emulsionantes y/o dispersantes. Las composiciones también pueden comprender agua estéril o cualquier otro medio estéril inyectable. Las composiciones pueden comprender adyuvantes que sean bien conocidos por un experto en la materia (por ejemplo, vitamina C, agentes antioxidantes, etc.) para algunos de los métodos descritos en el presente documento, en los que se desea la estimulación de una respuesta inmune, según lo descrito más detalladamente a continuación.

En una realización ilustrativa, la divulgación proporciona un compuesto representado por la estructura de fórmula 1:

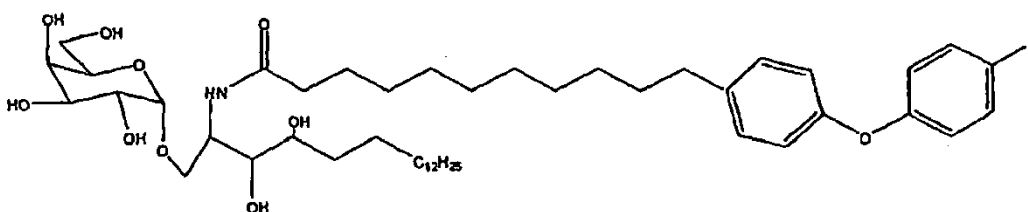
(1)



También se describe en el presente documento un compuesto representado por la estructura de fórmula 2:



También se describe en el presente documento un compuesto representado por la estructura de fórmula 3:



En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer, las células, las vacunas o las composiciones se pueden administrar a un sujeto mediante inyección. En una realización, la inyección puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica, y puede incluir, por ejemplo, inyección intra-linfoidea o inyección SubQ.

En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer se administran a las células dendríticas *in vivo* en el estado estacionario, lo que, en otra realización, conduce a la expansión de los NKT que mejoran la enfermedad. La administración de los análogos en el estado estacionario se puede realizar según lo descrito en Bonifaz, *et al.* (2002) *Journal of Experimental Medicine* 196: 1627-1638; Manavalan *et al.* (2003) *Transpl Immunol.* 11: 245-58.

En otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que tipos seleccionados de células dendríticas *in vivo* funcionan para cebar los NKT.

También se describe en el presente documento un método de modulación de una respuesta inmune 8 que es una respuesta inapropiada o no deseada. La respuesta inmune se puede caracterizar por un perfil de citocinas que es perjudicial para el hospedador.

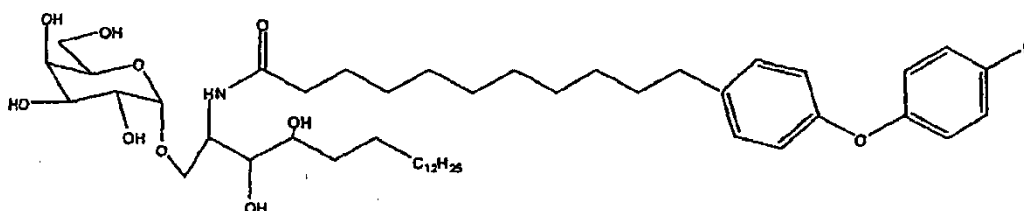
En una realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los NKT se pueden administrar a un receptor junto con el tratamiento para una determinada enfermedad, tal como, por ejemplo, junto con un tratamiento contra el cáncer convencional, para servir como tratamiento adyuvante para un cáncer dado. En otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los NKT se pueden administrar antes de la administración del otro tratamiento.

También se describe en el presente documento un método de modulación de una respuesta inmune que se dirige a la infección con un patógeno, no siendo la respuesta inmune protectora para el sujeto.

En otra realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que la respuesta inmune genera un perfil de citocinas que no es beneficioso para el hospedador. En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que el perfil de citocinas agrava la enfermedad. En una realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que se inicia una respuesta T_H2 cuando una respuesta T_H1 es beneficiosa para el hospedador, tal como, por ejemplo, en la lepra lepromatosa. En otra realización, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que se inicia una respuesta T_H1 , y persiste en el sujeto, tal como, por ejemplo, las respuestas al antígeno del huevo en la esquistosomiasis.

También se describe en el presente documento un método de activación de una respuesta de citocinas en un sujeto mediante el que se administra una cantidad eficaz de un compuesto o de una sal o de una mezcla, en el que el sujeto tiene un sistema inmune adaptativo que incluye una población de células, incluyendo la población al menos un linfocito y al menos una célula presentadora de antígeno, y en el que el compuesto está representado por la estructura de fórmula 1:

(1)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
la formación de un complejo entre el compuesto y la célula presentadora de antígeno, en el que la formación del complejo produce la activación de un receptor en el linfocito; y
la activación del linfocito para producir la respuesta de las citocinas.

El al menos un linfocito puede ser un linfocito T y, en algunos casos, el linfocito T puede ser un linfocito T citolítico natural. En algunos casos, el linfocito T citolítico natural es un linfocito T citolítico natural invariable.

La al menos una célula presentadora de antígeno puede ser una célula dendrítica. En algunos casos, la célula dendrítica es una célula dendrítica inmadura o una célula dendrítica madura.

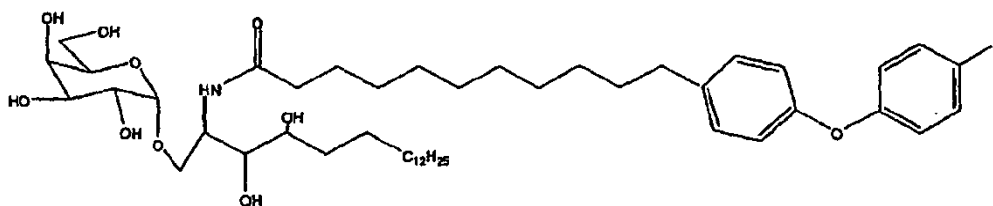
La administración del compuesto se puede llevar a cabo mediante la administración subcutánea, la administración intravenosa, la administración intranasal o la administración intramuscular.

El compuesto puede formar un complejo con una molécula CD1 sobre la célula presentadora de antígeno. En algunos casos, la molécula CD1 es una molécula CD1d. En algunos casos, el receptor del linfocito T es un receptor de linfocitos T. En algunos casos, estimulando al menos otro linfocito para producir la respuesta de citocinas, en algunos casos, el al menos otro linfocito es un linfocito T auxiliar.

La respuesta de citocinas puede ser una respuesta de citocinas de tipo T_H1 que produzca citocinas T_H1 que también se pueden seleccionar del grupo que consiste en $IFN-\gamma$, $IL-1\beta$, $IL-2$, $IL-3$, $IL-8$, $IL-12$, $IL-15$, $TNF-\alpha$, $GM-CSF$, $RANTES$, $MIP-1\alpha$ y $MCP-1$.

También, como se describe en el presente documento, la respuesta de citocinas es una respuesta de citocinas de tipo T_H2 que produce citocinas T_H2 que también se pueden seleccionar del grupo que consiste en $IL-4$, $IL-6$, $IL-8$, $IL-10$, $IL-13$, $RANTES$, $MIP-1\alpha$ y $MCP-1$.

En algunas realizaciones ilustrativas, la divulgación proporciona una vacuna que comprende una cantidad eficaz de un compuesto representado por la estructura de fórmula 1:



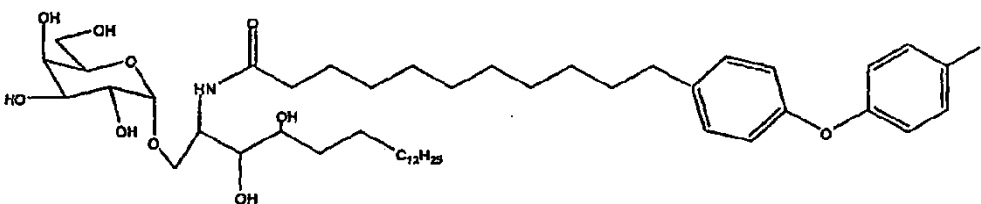
(1)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un agente vacunal.

- 5 En algunos casos, el agente vacunal se selecciona del grupo que consiste en un microorganismo muerto, un microorganismo viral vivo atenuado, un toxoide y un fragmento de un microorganismo inactivado o atenuado. En algunos casos, el microorganismo es una bacteria o un hongo. En algunos casos, el toxoide es un toxoide tetánico o diftérico. En algunos casos, el agente vacunal es capaz de provocar una respuesta inmune en un sujeto que recibe la vacuna. En algunos casos, el compuesto actúa como un adyuvante inmunológico, y es capaz de modificar o
- 10 aumentar la respuesta inmune provocada por el agente vacunal estimulando el sistema inmune, lo que hace que el sujeto responda a la vacuna más enérgicamente que sin el compuesto.

En algunas realizaciones ilustrativas, la divulgación proporciona un compuesto representado por la estructura de fórmula 1:

(1)



- 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en una inmunoterapia antitumoral.
- Según lo descrito en el presente documento, la administración se basa en al menos uno entre cáncer, un riesgo elevado de cáncer o precursores precancerosos. En algunos aspectos del método, la administración del compuesto provoca una respuesta en al menos una de las células tumorales y cancerosas. En algunos casos, la respuesta provocada es una ralentización en un crecimiento del tumor. En algunos casos, la respuesta provocada es una reducción en un tamaño del tumor.
- 25 Según lo descrito en el presente documento, la administración del compuesto es para efectuar un sistema inmune adaptativo que incluya una población de células, incluyendo la población al menos un linfocito y en el que la respuesta provocada es una expansión de la población de células en el sistema inmune adaptativo.
- Según lo descrito en el presente documento, la expansión de la población de células en el sistema inmune adaptativo incluye una expansión en una serie de linfocitos T, linfocitos T CD8, linfocitos NK o linfocitos NKT. En algunos casos, el método incluye proporcionar una vacuna contra el cáncer a la que se añade el compuesto. El cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, hepatoma, leucemia, tumor sólido y carcinoma.

- 35 La administración se puede basar en una enfermedad infecciosa producida como consecuencia de la presencia de agentes microbianos patógenos. Los agentes microbianos patógenos se pueden seleccionar del grupo que consiste en virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos multicelulares y proteínas aberrantes. El agente microbiano patógeno puede ser un virus. El virus se puede seleccionar del grupo que consiste en *Retroviridae*, *Picornaviridae*, *Calciviridae*, *Togaviridae*, *Flaviridae*, *Coronaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Hepadnaviridae*, *Parvoviridae*, *Papovaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae* e *Iridoviridae*. El agente patógeno microbiano puede ser una bacteria. La bacteria se puede seleccionar del grupo que consiste en *Helicobacter pylori*, *Borellia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacteria* sp., *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógena, *Enterococcus* sp., *Chlamidia* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Actinomyces israeli*, *Sphingomonas capsulate* y *Francisella tularensis*.

La administración del compuesto a un sujeto puede producir un aumento del aclaramiento bacteriano en comparación con un sujeto a quien no se ha administrado el compuesto. La administración del compuesto puede producir la muerte del agente microbiano. La administración del compuesto puede hacer que el agente microbiano no pueda crecer.

Breve descripción de las figuras

La patente o solicitud contiene al menos una figura realizada a color. Las copias de la presente patente o publicación de solicitud de patente con figuras a color serán proporcionados por la Oficina bajo petición y pago de la tarifa necesaria. Los análogos de α -GalCer C1-C33 descritos en el presente documento no forman parte de la invención, pero el análogo de α -GalCer C34 sí forma parte de la invención.

Las Figuras 1 (A-B) son ilustraciones esquemáticas que muestran la función de los linfocitos T citolíticos naturales (NKT). La Figura 1A muestra un esquema general. La Figura 1B muestra cómo la α -galactosil-ceramida (α -GalCer) y los análogos de α -GalCer son capaces de unirse a CD1d y estimular una respuesta rápida a las citocinas T_H1 y T_H2 .

La Figura 2 muestra las estructuras químicas de α -GalCer (C1) y diversos glucolípidos α -GalCer (también denominados análogos) incluyendo: glucolípidos de origen bacteriano (C3, C3 y C14), glucolípidos modificados con sulfonación (C4, C5 y C9), glucolípidos cadena fenilalquilo (C6-C8, C10-C11, C15-C16, C18-C34 (siendo C34 de la presente invención) y 7DW8-5 (aka, C8-5) y 7DW8-6 (aka, C8-6)) y glucolípidos truncados con fitoesfingosina (C12, C13 y C17).

La Figura 3 muestra los esquemas sintéticos para los análogos de α -GalCer C12 y C13.

La Figura 4 muestra los niveles de secreción de citocina IL-2 (pg/ml) por hibridomas 1.2 murinos tratados con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados.

La Figura 5 (A-C) muestra las "veces de aumento" de (A) IFN- γ e IL-4, (B) IL-2 e IL-6, y (C) la producción de citocinas IL-12 e IL-10, normalizadas con respecto al control de DMSO, por NKT CD161⁺/CD3⁺ NKT humanos tratados con α -GalCer o análogos de α -GalCer indicados y cultivados junto con DC CD14⁺ autólogas inmaduras. Los paneles de la izquierda indican una respuesta de tipo T_H1 y los paneles de la derecha indican una respuesta de tipo T_H2 .

Las Figuras 6 (A-B) muestran (A) la pureza de los NKT CD161⁺/CD3⁺ humanos y (B) las "veces de aumento" de la proporción de producción de citocinas IFN- γ /IL-4, normalizadas con respecto al control (DMSO), derivadas de los datos que se muestran en la Figura 5.

La Figura 7 es una tabla que muestra las veces de aumento frente a la concentración basal de citocinas en los sobrenadantes de los NKT humanos de las Figuras 5 y 6 tratados con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados.

La Figura 8 (A-F) muestra las "veces de aumento" de la producción de citocinas (A) IFN- γ , (B) IL-4, (C) la proporción de IFN- γ /IL-4, (D) IL-2, (E) IL-12 y (F) IL-6, normalizada con respecto al control (DMSO), por los NKT humanos preinmunes tratados con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados y cultivados junto con DC inmaduras autólogas.

La Figura 9 muestra las veces de cambio del número total de NKT en respuesta a los análogos de α -GalCer indicados.

Las Figuras 10 (A-E) muestran la producción de citocina IFN- γ por (A) NKT preinmunes cultivados junto con células dendríticas autólogas; (B) NKT preinmunes cultivados junto con células HeLa-CD1d; (C) NKT pulsados con α -GalCer cultivados junto con células HeLa-CD1d y (D) NKT pulsados con análogo de α -GalCer C11 cultivados junto con células HeLa-CD1d, normalizados con respecto al control de vehículo (DMSO), tratados con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados. (E) muestra diferentes niveles basales de la producción de citocina IFN- γ en NKT preinmunes humanos, NKT pulsados con α -GalCer e NKT pulsados con análogo de α -GalCer C11.

Las Figuras 11 (A-C) muestran (A) los niveles de secreción de citocina IFN- γ (pg/ml); (B) los niveles de secreción de citocina IL-4 (pg/ml) y (C) la proporción de IFN- γ /IL-4 por NKT preinmunes humanos tratados con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados.

La Figura 12 es una tabla que muestra las veces de aumento frente a las concentraciones basales en suero en los sobrenadantes de los NKT humanos de la Figura 10 tratados con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados.

La Figura 13 muestra los datos de citometría de flujo representativos para la expansión de células CD56⁺ humanas

(mezclas de NK/NKT) cultivadas con células dendríticas CD14⁺ inmaduras autólogas y pulsadas con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados. Se muestra el porcentaje de células CD161⁺/V α 24TCR⁺ de las mezclas NK/NKT.

La Figura 14 muestra el número total de NKT (10^3) que se encuentra en las mezclas de NK/NKT de la Figura 13.

Las Figuras 15 (A-B) muestran los datos de citometría de flujo representativos para la expansión de células CD56⁺ humanas (mezclas de NK/NKT) cultivadas con células dendríticas CD14⁺ inmaduras autólogas y pulsadas con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados. (A) muestra los datos de citometría de flujo representativos del porcentaje de células CD161⁺/V α 24TCR⁺ en las mezclas de NK/NKT y (B) muestra las veces de aumento en el número total de NKT encontrados en las mezclas de NK/NKT.

La Figura 16 muestra los niveles de expresión, como la intensidad media de fluorescencia (MFI), de las proteínas de la superficie CD40, CD80, CD86 y CD83, así como el receptor de superficie celular del MHC de clase II HLA-DR, sobre las células dendríticas (DC) tras incubar DC inmaduras humanas con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados.

Las Figuras 17 (A-B) muestran cómo el análogo de α -GalCer C13 potencia la maduración de DC derivadas de monocitos humanas. (A) muestra los histogramas para la expresión de CD40, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR en las DC en respuesta a C13. (B) muestra la morfología de las DC incubadas con C13 durante 48 horas.

La Figura 18 muestra una ilustración esquemática de las vías de señalización del receptor de linfocitos NKT .

Las Figuras 19 (A-E) demuestran cómo los análogos de α -GalCer potencian la activación del receptor de linfocitos T (TCR) dependiente CD1d de los NKT humanos. (A) muestra la expresión de CD1d en células HeLa transfectadas con CD1d (HeLa-CD1d). (B) muestra los niveles intracelulares de fosfo-CD3 ϵ . (C) muestra los niveles intracelulares de fosfo-ERK1/2. (D) muestra los niveles intracelulares de fosfo-Syk. (E) muestra los niveles intracelulares de fosfo-CREB.

Las Figuras 20 (A-L) demuestran cómo los análogos de α -GalCer potencian la activación del receptor de linfocitos T (TCR) dependiente CD1d de NKT humanos preinmunes (V α 24⁺). (A) muestra la determinación de los linfocitos T V α 24⁺ humanos preinmunes aislados mediante citometría de flujo. (B-L) muestra la activación del TCR en NKT . Se cargaron células HeLa o HeLa-CD1d con α -GalCer o análogos de α -GalCer C16, C23, 7DW8-5, 7DW8-6 o C26, y luego se añadieron a linfocitos T V α 24⁺ preinmunes. Se midieron los niveles intracelulares de las siguientes proteínas fosforiladas y se expresaron como la intensidad de fluorescencia media, y se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína total de entrada: (B) fosfo-CD3 ϵ (fosfotirosina), (C) fosfo-CREB (Ser-133), (D) fosfo-ERK1/2 (Thr-185/Tyr-187), (E) fosfo-p38 (Thr-180/Tyr-182), (F) fosfo-I κ B α (Ser32), (G) fosfo-Lck, (H) fosfo-Lat, (I) fosfo-STAT3 (Ser727), (J) fosfo-STAT5 A/B (Tyr 694/699), (K) fosfo-Syk (fosfo-tirosina) y (L) fosfo-Zap-70 (fosfo-tirosina), *, p < 0,05, en comparación con el control de DMSO y #, p < 0,05, en comparación con α -GalCer.

Las Figuras 21 (A-C) muestra cómo los análogos de α -GalCer indujeron una mayor expansión celular y presentaron una mayor capacidad para unirse a NKT restringidos a CD1d y linfocitos T. Se recogieron los bazo de ratones BALB/c 72 horas después de la inyección intravenosa (IV) de 0,1 μ g/ratón de vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados. Se determinó el porcentaje de (A) los NKT de ratón o (B) los linfocitos T. (C) muestra diferentes afinidades de unión de α -GalCer y los análogos de α -GalCer indicados a linfocitos NKT restringidos a CD1d y linfocitos T.

Las Figuras 22 (A-D) muestran la expansión dependiente de CD1d de dos subconjuntos de NKT y la activación de NK en respuesta a los análogos de α -GalCer. (A-C) muestran la expansión dependiente de CD1d de dos subconjuntos de NKT. Se recogieron los bazo de ratones BALB/c de tipo silvestre (WT) o ratones CD1 KO 72 horas después de la inyección de α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados. Se evaluó el número total de NKT, y sus dos subtipos, designados como NKT de Tipo I y NKT de Tipo II de ratones (B) tipo silvestre WT o (C) CD1 KO en respuesta por FACS. (D) Activación dependiente de CD1d de NK. Se evaluó la expansión del número total de NK en ratones de tipo silvestre WT (panel izquierdo) o CD1 KO (panel derecho) en respuesta por FACS.

Las Figuras 23 (A-C) muestran niveles en suero de ratón (pg/ml) de diversas citocinas (A) IFN- γ , (B) IL-4 y (C) la proporción de IFN- γ /IL-4 tras la inyección intravenosa (IV) con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados 0, 2, 18, 36, 48, 72 h después de la inyección y normalizados con respecto al control de DMSO.

Las Figuras 24 (A-C) muestran niveles en suero de ratón (pg/ml) de diversas citocinas/quimiocinas (A) IFN- γ , (B) IL-4 y (C) la proporción de IFN- γ /IL-4 a las 2 y 18 h de la inyección IV con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados.

La Figura 25 es una tabla con los resultados (en veces de aumento con respecto a la concentración de citocinas basal) en los sobrenadantes de ratones BALB/c inyectados IV con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados.

Todas las citocinas/quimiocinas alcanzaron su punto máximo a las 2 horas de la inyección, excepto las marcadas con un *, que alcanzaron su punto máximo a las 18 horas.

- 5 Las Figuras 26 (A-H) muestran (A) el número total de células nucleadas y el tamaño del bazo; (B) la población de células inmunes innatas, incluyendo células dendríticas maduras; (C) NK activados; (D) NKT activados; (E) linfocitos B activos; (F) linfocitos T CD8⁺ activos; (G) los linfocitos T CD4⁺ activos; y (H) la proporción de linfocitos T CD8⁺/CD4⁺, todo normalizado con DMSO, en respuesta a la inyección IV de vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer de la Figura 23.
- 10 Las Figuras 27 (A-C) muestran niveles en suero de ratón de diversas citocinas (A) IFN- γ , (B) IL-4 y (C) la proporción de IFN- γ /IL-4 tras la inyección subcutánea (SubQ) con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados a las 0, 2, 18, 36, 48, 72 h de la inyección y normalizados con el control de DMSO.
- 15 Las Figuras 28 (A-H) muestran (A) el número total de células nucleadas y el tamaño del bazo; (B) la población de células inmunes innatas, incluyendo células dendríticas maduras; (C) NK activados; (D) NKT activados; (E) linfocitos B activos; (F) linfocitos T CD8⁺ activos; (G) los linfocitos T CD4⁺ activos; y (H) la proporción de linfocitos T CD8⁺/CD4⁺, todo normalizado con DMSO, en respuesta a la inyección SubQ de vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer de la Figura 27.
- 20 Las Figuras 29 (A-C) muestran niveles de suero de ratón de diversas citocinas (A) IFN- γ , (B) IL-4 y (C) la proporción de IFN- γ /IL-4 tras la inyección intramuscular (IM) con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados a las 0, 2, 18, 36, 48, 72 h de la inyección y normalizados con el control de DMSO.
- 25 Las Figuras 30 (A-H) muestran (A) el número total de células nucleadas y el tamaño del bazo; (B) la población de células inmunes innatas, incluyendo células dendríticas maduras; (C) NK activados; (D) NKT activados; (E) linfocitos B activos; (F) linfocitos T CD8⁺ activos; (G) los linfocitos T CD4⁺ activos; y (H) la proporción de linfocitos T CD8⁺/CD4⁺, todo normalizado con DMSO, en respuesta a la inyección IM de vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer de la Figura 29.
- 30 Las Figuras 31 (A-K) muestran los efectos de la vía de administración (IV, SubQ o IM) de vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados sobre la cinética de las citocinas y la expansión/activación de los esplenocitos. (A) muestra los niveles en suero de ratón (pg/ml) de IFN- γ . (B) muestra los niveles en suero de ratón (pg/ml) de IL-4. (C) muestra la proporción de IFN- γ /IL-4 (log 10). (D) muestra el número total de células nucleadas de ratón (esplenocitos). (E) muestra la población de células inmunes innatas, incluyendo las células dendríticas maduras del bazo. (F) muestra la población de NK activados del bazo. (G) muestra la población de NKT activados del bazo. (H) muestra la población de linfocitos B activos del bazo. (I) muestra la población de linfocitos T CD8⁺ del bazo. (J) muestra la población de linfocitos T CD4⁺ activos del bazo. (K) muestra la proporción de linfocitos T CD8⁺/CD4⁺. Todos los análisis se realizaron mediante la normalización con respecto al vehículo.
- 35
- 40 Las Figuras 32 (A-H) muestran la respuesta a la dosis de la expansión/activación de los esplenocitos en respuesta a la administración IV del análogo de α -GalCer C11 o vehículo. (A) muestra el número total de células nucleadas de ratón (esplenocitos). (B) muestra la población de células inmunes innatas, incluyendo las células dendríticas maduras, del bazo. (C) muestra la población de NK activados del bazo. (D) muestra la población de NKT activados del bazo. (E) muestra la población de células de monocitos de granulocitos del bazo. (F) muestra la población de linfocitos T CD4⁺ activos del bazo. (G) muestra la población de linfocitos T CD8⁺ activos del bazo. (H) muestra la población de linfocitos B activos del bazo. Todos los análisis se realizaron mediante la normalización con respecto al vehículo.
- 45
- 50 Las Figuras 33 (A-D) muestran los niveles en suero de ratón de diversas citocinas (B) IFN- γ , (C) IL-4 y (D) la proporción de IFN- γ /IL-4 después de la inyección IV con (A) vehículo, α -GalCer o diversos análogos de α -GalCer a las 0, 12, 24, 36, 48, 72 h después de la inyección y normalizados con respecto al control del vehículo.
- La Figura 34 es una tabla con los resultados (en veces de aumento con respecto a la concentración de citocinas basal) en los sobrenadantes de ratones BALB/c inyectados IV con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados de la Figura 33. Todas las citocinas/quimiocinas alcanzaron su punto máximo a las 2 horas de la inyección, excepto las marcadas con un *, que alcanzaron su punto máximo a las 18 horas.
- 55
- 60 Las Figuras 35 (A-G) muestran los niveles en suero (pg/ml) de diversas citocinas/quimiocinas a las 2 y 18 h de la inyección IV de vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados a ratones BALB/c de tipo silvestre (WT) y ratones CD1d KO BALB/c (CD1KO). (A) IFN- γ . (B) IL-4. (C) proporción de IFN- γ /IL-4 (log 10). (D) IL-10. (E) IL-12p70. (F) KC. (G) MCP-1.
- 65 Las Figuras 36 (A-I) muestran la expansión/activación de los esplenocitos en ratones C57BL/6 tras la inyección IV de vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados, y (G-I) muestran la activación dependiente de CD1d de dos subconjuntos de NKT (ratones C57BL/6 de tipo silvestre (WT) y CD1 KO después de la inyección IV de vehículo,

- α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados. (A) muestra el número total de células nucleadas (esplenocitos) de ratones C57BL/6. (B) muestra la población de células dendríticas maduras. (C) muestra la población de NK activados. (D) muestra la población de linfocitos T CD4⁺ activos. (E) muestra la población de linfocitos T CD8⁺ activos. (F) muestra la proporción de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ normalizada con DMSO. (G) muestra la determinación de los linfocitos NKT en los ratones WT por citometría de flujo (panel inferior izquierdo), el número total de NKT (panel superior izquierdo) y sus dos subtipos que incluyen NKT de tipo II (panel superior derecho) y de NKT de Tipo I (panel inferior derecho). (H) muestra el número total de NKT en ratones CD1 KO. (I) muestra el número total de linfocitos Treg en ratones WT. Todos los análisis se realizaron mediante la normalización con respecto al vehículo.
- 10 Las Figuras 37 (A-B) muestran cómo los análogos de α -GalCer pueden prolongar la supervivencia de ratones portadores de cáncer de pulmón. Se inocularon IV a ratones C57BL/6 células de cáncer de pulmón de ratón (TC-1), y luego se trataron con el control, α -GalCer o el análogo de α -GalCer indicado dos veces a la semana durante cuatro semanas. (A) muestra los resultados de la prueba de los análogos de α -GalCer del Grupo I. (B) muestra los resultados de la prueba de los análogos de α -GalCer del Grupo II. (C) muestra los resultados de la prueba de los análogos de α -GalCer del Grupo III. (D) muestra los resultados de la prueba de los análogos de α -GalCer del Grupo IV. Se muestran las curvas de supervivencia de Kaplan Meier (paneles de la izquierda) y los cambios en el peso corporal (paneles de la derecha) de ratones portadores de cáncer de pulmón. El control es el ratón sin la inoculación del tumor.
- 20 Las Figuras 38 (A-B) muestran nódulos tumorales y tamaños (A) sobre una superficie de pulmones de ratones tratados con el análogo de α -GalCer C11 o control, y sacrificados el Día 16 después de la inoculación del tumor con linfocitos TC-1 y (B) en tumores subcutáneos de ratones tratados con el análogo de α -GalCer C11 o control, y sacrificados el Día 16 después de la inoculación del tumor SubQ con células de cáncer de mama de ratón (4T-1).
- 25 Las Figuras 39 (A-B) muestran las curvas de supervivencia de Kaplan Meier (panel de la izquierda) y el crecimiento del tumor (panel de la derecha) de los ratones inoculados por vía subcutánea con células de cáncer de mama de ratón 4T-1, y tratados con control, α -GalCer o el análogo de α -GalCer indicado tres días después de la inoculación, y dos veces a la semana durante cuatro semanas mediante (A) la inyección IV o (B) inyección SubQ.
- 30 La Figura 40 muestra las curvas de supervivencia de Kaplan Meier de ratones portadores de cáncer de mama y tratados mediante inyección bien IV o SubQ con α -GalCer (C1). La administración SubQ de C1 es más eficaz que la administración IV en la prolongación de la supervivencia de los ratones portadores del cáncer de mama.
- 35 Las Figuras 41 (A-C) muestran la optimización de los protocolos terapéuticos contra el cáncer de análogos de α -GalCer mediante la dosificación de la administración. Los cambios en el peso corporal (panel de la derecha) y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier (panel de la izquierda) de ratones C57BL/6 después de la inoculación IV con células de cáncer de pulmón de ratón (TC-1), y tras el tratamiento con α -GalCer o análogos de α -GalCer 7DW8-5 o C26 a varias dosis dos veces a la semana o una vez a la semana durante cuatro semanas. (A) α -GalCer. (B) análogo de α -GalCer 7DW8-5. (C) análogos de α -GalCer C26.
- 40 Las Figuras 42 (A-C) muestran la optimización de los protocolos terapéuticos contra el cáncer de análogos de α -GalCer por diferentes vías y frecuencia. (A) muestra el volumen del tumor (mm³) (panel de la derecha) y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier (panel de la izquierda) de los ratones BALB/c después de la inoculación SubQ con células de cáncer de mama de ratón, 4T-1, y el posterior tratamiento tres días después de la inoculación con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer dos veces a la semana durante cuatro semanas por vía IV o SubQ. (B) muestra los cambios en el peso corporal (panel de la derecha) y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier (panel de la izquierda) de ratones C57BL/6 después de la inoculación IV con células de cáncer de pulmón de ratón, TC-1 y el posterior tratamiento tres días después de la inoculación con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados dos veces a la semana durante cuatro semanas por vía IV o SubQ. (C) muestra los impactos de la frecuencia de administración sobre el peso corporal (panel de la derecha) y las curvas de supervivencia de Kaplan Meier (panel de la izquierda) de ratones C57BL/6 tras la inoculación IV con células de cáncer de pulmón de ratón, TC-1, y el posterior tratamiento con vehículo o análogo de α -GalCer C16 dos veces a la semana o una vez a la semana durante cuatro semanas por vía IV.
- 50 Las Figuras 43 (A-B) muestran la evaluación de la eficacia contra el cáncer de diversos análogos de α -GalCer. Los ratones C57BL/6 fueron inoculados IV con células de cáncer de pulmón de ratón, TC-1, o inoculados SubQ con melanoma de ratón, células B16, y luego se trataron con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados una vez a la semana durante cuatro semanas. (A) muestra las curvas de supervivencia de Kaplan Meier. (B) muestra las curvas de crecimiento del volumen del tumor (mm³).
- 60 Las Figuras 44 (A-B) muestran la evaluación en tiempo real del crecimiento tumoral en (A) ratones C57BL/6 después de la inoculación SQ con células de cáncer de pulmón (TC-1-GRP-luciferasa) o (B) células de cáncer de mama (4T-1-GFP-Luciferasa) y el posterior tratamiento con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados una vez a la semana durante cuatro semanas.

Las Figuras 45 (A-H) muestran los análogos de α -GalCer influidos por T_H1 generan más linfocitos infiltrantes de tumor en los tumores de pulmón y melanoma. (A-D) muestran linfocitos infiltrantes de tumor en células de cáncer de pulmón (TC-1). Los ratones C57BL/6 fueron tratados con vehículo, α -GalCer o análogos de α -GalCer C23, C8-5 o C34 (siendo C34 de la presente invención) a 0,1 μ g/ratón una vez a la semana durante tres semanas. (A) muestra la población de células CD3⁺. (B) muestra la población de linfocitos T CD8. (C) muestra la población de linfocitos NK. (D) muestra la población de NKT. Todos los análisis se realizaron mediante la normalización con respecto al vehículo. (E-H) muestran linfocitos infiltrantes de tumores en células de melanoma. Los ratones C57BL/16 fueron tratados con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer C23, C8-5 o C34 a 0,1 μ g/ratón una vez a la semana durante tres semanas. (E) muestra la población de células CD3⁺. (F) muestra la población de linfocitos T CD8. (G) muestra la población de NK. (H) muestra la población de NKT. Todos los análisis se realizaron mediante la normalización con respecto al vehículo.

Las Figuras 46 (A-B) muestran los efectos adyuvantes del alumbre, α -GalCer y análogo de α -GalCer C11 sobre la respuesta de los anticuerpos a la vacuna proteica de toxoide tetánico (TT). (A) los ratones fueron vacunados con TT sin o con adyuvante convencional de alumbre, α -GalCer o análogo de α -GalCer C11 el día 0 (primera vacunación) y el día 28 (4 semanas-segunda vacunación). El suero se recogió semanalmente para determinar los anticuerpos específicos contra TT. (B) muestra los efectos del adyuvante convencional de alumbre, α -GalCer y análogo de α -GalCer C11 sobre el refuerzo antigénico retardado 20 semanas después de la segunda vacunación.

Las Figuras 47 muestra los efectos adyuvantes del adyuvante convencional de alumbre, α -GalCer y diversos análogos de α -GalCer sobre el péptido que contiene el dominio extracelular de la proteína M2 (M2e) de la cepa de virus H1N1, dos semanas después de la tercera inmunización. Los ratones BALB/c fueron vacunados con 5 o 45 μ g de péptido M2e con o sin α -GalCer y diversos análogos de α -GalCer las semanas 0, 3 y 6.

Las Figuras 48 (A-C) muestran los efectos adyuvantes de α -GalCer (C1) sobre ratones inmunizados con PHA, un plásmido de ADN que contiene la secuencia de consenso de H5 de longitud completa del virus de la gripe aviar. (A) los ratones fueron inmunizados con entre 5 y 45 μ g de pHA sin o con C1 las semanas 0 y 3. (B) los ratones fueron inmunizados con dosis bajas de la vacuna pHA sin o con C1. (C) muestra la protección contra la exposición viral con DL₅₀ 20 de cepa de la gripe recombinante de Vietnam NIBRG-14 dos semanas después de la vacuna de ADN H5 sin o con C1.

Las Figuras 49 (A-C) muestran la inducción de anticuerpo IgG específico anti-HA una vez que los ratones fueron inmunizados con PHA con o sin C1 o los análogos de α -GalCer indicados. (A) muestra los títulos de anticuerpos IgG específicos anti-HA (AY3) en ratones después de la inmunización con 0,2 μ g de pHA. (B) muestra los títulos de anticuerpos IgG específicos anti-HA (AY4) en ratones después de la inmunización con 0,2 μ g de pHA. (C) muestra el porcentaje de supervivencia del ratón después de la exposición viral.

Las Figuras 50 (A-B) muestran la inducción de anticuerpo IgG específico anti-HA una vez que los ratones fueron inmunizados con pHA con o sin C1 o los análogos de α -GalCer indicados. (A) muestra los títulos de anticuerpo IgG específico anti-HA (AY4) tras la inmunización con 0,5 μ g de pHA y los análogos de α -GalCer indicados. (B) muestra el porcentaje de supervivencia después de la exposición viral.

Las Figuras 51 (A-B) muestran el título de anticuerpo IgG específico anti-HA de ratón (AY5) después de la inmunización con (A) 0,1 μ g de pHA o (B) 0,2 μ g de pHA y los análogos de α -GalCer indicados.

Las Figuras 52 (A-B) muestran el título de anticuerpos IgG específicos anti-HA de ratón (AY6) después de la inmunización con (A) 0,1 μ g de pHA o (B) 0,2 μ g de pHA, y los análogos de α -GalCer indicados a 0,1 μ g o 1 μ g.

Las Figuras 53 (A-D) muestran la inducción de anticuerpo IgG específico anti-HA por α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados. Los ratones BALB/c fueron vacunados por electrotransferencia en el músculo con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados con pHA_c y recibieron el refuerzo una vez con la misma formulación 4 semanas más tarde. Se recogieron muestras de sangre a las 2 semanas de la segunda vacunación y se ensayaron para determinar los títulos de anticuerpos IgG específicos anti-HA_c por ELISA. (A) muestra los títulos de anticuerpo IgG específico anti-HA (AY3). (B) muestra los títulos de anticuerpo IgG específico anti-HA (AY4). (C) títulos de anticuerpo IgG específico anti-HA (AY5). (D) muestra los títulos de anticuerpo IgG específico anti-HA (AY16).

Las Figuras 54 (A-B) muestran (A) las células productoras de IFN- γ específico de HA y (B) las células de respuesta a péptido específico de HA. Los ratones BALB/c fueron vacunados por electrotransferencia en el músculo con pHA_c y α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados, y recibieron el refuerzo una vez con la misma formulación tres semanas más tarde. Se cultivaron esplenocitos con péptido específico de HA (9-mero) y se determinaron los puntos después de 1 día.

La Figura 55 muestra la protección contra el desafío viral. Los ratones BALB/c fueron vacunados por electrotransferencia en el músculo con pHA_c y α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados, y recibieron el

refuerzo una vez con la misma formulación tres semanas más tarde. Se expusieron los ratones a una DL₅₀ de 200 de virus NIBRG-14 a las dos semanas de la segunda vacunación, y se monitorizó la supervivencia de los ratones.

Las Figuras 56 (A-B) muestran el efecto de la vacunación de una sola dosis. Los ratones BALB/c fueron vacunados por electrotransferencia en el músculo con pHAc (2 µg) y α-GalCer o los análogos de α-GalCer indicados (2 µg). (A) Se recogieron muestras de sangre tres semanas más tarde y se analizaron para determinar los títulos de anticuerpos IgG específicos anti-HAc. (B) Se expusieron los ratones a DL₅₀ de 200 del virus NIBRG-14 a las tres semanas del refuerzo y se monitorizó la supervivencia.

Las Figuras 57 (A-B) muestran los efectos adyuvantes de α-GalCer o los análogos de α-GalCer indicados sobre los antígenos de hidratos de carbono. Los ratones BALB/c fueron vacunados mediante inyección IM con α-GalCer o los análogos de α-GalCer indicados, mezclados con globo H-DT, y recibieron un refuerzo dos veces en un intervalo de dos semanas. Se recogieron muestras de sangre dos semanas después de la tercera vacunación y se ensayaron para determinar (A) anticuerpo IgG específico de anti-globo H; y (B) la producción de anticuerpos IgM específicos anti-globo H.

Las Figuras 58 (A-B) muestran la tasa de supervivencia al tratar los ratones BALB/c con α-GalCer o los análogos de α-GalCer indicados por vía intraperitoneal (IP) (A) comenzando 30 min después de la exposición al virus FLU-A pseudotipo H1N1 (WSN); y (B) comenzando 2 semanas antes de la exposición al virus H1N1.

Las Figuras 59 (A-B) muestran la proporción acumulada de la supervivencia de ratones BALB/c infectados con H1N1 (WSN) y tratados con α-GalCer o los análogos de α-GalCer indicados (A) comenzando 2 semanas antes de la exposición al virus con una dosis alta de virus H1N1 (WSN) y (B) por vía intranasal.

Las Figuras 60 (A-B) muestran el efecto citopático (CPE) de las células de riñón canino de Madin-Darby (MDCK) *in vitro*. Se trataron previamente las células MDCK con vehículo, α-GalCer o uno de los análogos de α-GalCer C13, C14 o C16 a 10 µg/ml durante cuatro horas, seguido de la infección con el virus FLU-A pseudotipo H1N1 (WSN) a 10TCID₅₀. (A) muestra el título de virus de supervivencia (log₁₀) después del tratamiento de glucolípidos *in vitro* y (B) muestra el título de virus en células MDCK a las 48 horas de la infección.

Las Figuras 61 (A-B) muestran las eficacias antibacterianas de α-GalCer o los análogos de α-GalCer indicados tratados a (A) 100 µg/kg o (B) 50 µg/kg en ratones infectados con *Sphingomonas capsulate*.

Las Figuras 62 (A-B) muestran la eficacia antibacteriana de α-GalCer o los análogos de α-GalCer indicados en ratones infectados con *Klebsiella pneumoniae*. C1 y C14 pueden reducir significativamente las cargas bacterianas en (A) pulmón de ratón y (B) hígado de ratón después de la inyección.

La Figura 63 muestra que los números UFC (en los pulmones) de los grupos tratados con C23 y C34 (siendo C34 de la presente invención) a 50 µg/kg son significativos en comparación con el grupo no tratado.

Las Figuras 64 (A-B) muestran las estructuras químicas de α-GalCer (C1) y diversos glucolípidos de α-GalCer (también denominados análogos) incluyendo: C3, C9, C11, C14, C16, C17, C23, 7DW8-5 (aka, C8-5) y C34 (siendo C34 de la presente invención).

La Figura 65 muestra las eficacias antibacterianas de los glucolípidos tratados a 100 µg/kg en ratones infectados con *Sphingomonas capsulate*. Los valores de UFC en los hígados de los ratones de cada grupo de tratamiento medidos a las 24 h de la infección se representan con un punto. Los valores medios de UFC de cada grupo de tratamiento se indican con líneas horizontales cortas. El análisis estadístico usando ANOVA reveló que los grupos tratados con C1, C11, C14 y C16, produjeron una carga bacteriana significativamente reducida en el hígado. Los grupos con diferencias significativas con respecto al control de PBS se marcan con estrellas: "" para P < 0,05, """" para P < 0,01.

Las Figuras 66 (A-B) muestran las eficacias antibacterianas de glucolípidos seleccionados en el modelo de infección del muslo con *Staphylococcus aureus*. Se evaluaron las eficacias antibacterianas de los glucolípidos a 150 µg/kg administrados mediante inyecciones IP a las 3 horas de la infección mediante análisis de imágenes a las 48 horas de la infección con Xen29 de *S. aureus* de luminiscencia. (A) Se tomaron imágenes de ratones en diferentes tratamientos a las 48 horas de la infección. (B) Se representaron gráficamente los valores de luminiscencia relativa (ULR) de cada ratón medidos a las 48 h de la infección con símbolos individuales, y los valores medios de cada grupo de tratamiento se muestran con líneas horizontales. *: p < 0,05.

La Figura 67 muestra la mejora producida con los glucolípidos de la protección del hospedador frente a la infección por JEV. Se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) a ratones C57BL/6 de tipo silvestre, de siete semanas de vida, 1 µg de compuesto C1, 7DW8-5, C23, C34 o disolvente para cada grupo un día antes de la exposición al virus. Los ratones fueron infectados IP con 5 x 10⁵ PFU de JEV (cepa RP-9) y, al mismo tiempo, recibieron por inyección intracerebral 30 µg de PBS. Un día después de la infección por el virus, los ratones recibieron un refuerzo IP con

1 µg de C1, 7DW8-5, C23, C34 o disolvente. Los ratones fueron monitorizados diariamente durante 25 días, mostrándose el porcentaje de supervivencia. Se incluyeron catorce ratones en cada grupo experimental. Se realizaron comparaciones de las curvas de supervivencia usando el análisis estadístico del programa informático Prism con el ensayo de rangos logarítmicos y $P < 0,05$ en comparación con el control de disolvente indicado con "***".

Las Figuras 68 (A-C) muestran la dependencia de los glucolípidos en los componentes de inmunidad innatos y adaptados del hospedador para activar la protección contra la infección por JEV. A ratones inmunodeficientes de siete semanas de vida que carecían de Stat-1 (A), cadena μ de inmunoglobulina (B) o cadena de CD8 α (C) se administraron C34, 7DW8-5 o disolvente como se describe en la Fig. 67, usando un protocolo de dos dosis. Los ratones con Stat-1 desactivado se expusieron a 0,1 UFP de JEV (cepa RP-9) por vía intraperitoneal. Los ratones con cadena 1µg desactivada y los de la cadena de CD8 α desactivada fueron expuestos como se describe en la Fig. 67. Los ratones fueron monitorizados diariamente durante 25 días. En la leyenda de cada panel, se muestra el porcentaje de supervivencia y el número de ratones de cada grupo experimental.

Las Figuras 69 (A-B) muestran los resultados de un protocolo de dos dosis, un día antes y un día después de la infección por JEV, que dio el mejor efecto protector. Se administró glucolípido C34 (A) o 7DW8-5 (B) a ratones C57BL/6 de tipo silvestre, de 7 semanas de vida, mediante un protocolo de dos dosis como el descrito en la Fig. 67 [día (-1) y día (+1)] o solo una vez un día antes de [día (-1)], el mismo día [día (0)] o un día después [día (+1)] de la infección viral. Los ratones fueron desafiados y monitorizados como se describe en la Fig. 67. En la leyenda de cada panel, se muestra el porcentaje de supervivencia y el número de ratones de cada grupo experimental.

Las Figuras 70 (A-B) muestran un perfil de supervivencia de los ratones infectados de gripe que recibieron C34 en diferentes momentos y dosis. Los ratones Blab/C fueron infectados con virus de la gripe a la DL₅₀ de diez por vía intranasal. Los ratones se agruparon en cuatro grupos que recibieron dos inyecciones IP tanto el día -1 como el día +1 con respecto a la infección por gripe. En (A), se describe el protocolo de estudio con el contenido de la inyección IP (1 µg/ratón de C34 o el vehículo de PBS) y los tiempos de inyección de diferentes grupos de tratamiento. En (B), se muestran las curvas de supervivencia de los diferentes grupos de tratamiento.

La Figura 71 muestra los efectos del momento de la administración de C34 sobre el aclaramiento de la infección del modelo de infección de herida en el muslo murino. Los ratones infectados con *S. aureus* de luminiscencia en el muslo izquierdo se agruparon en el grupo de control de vehículo y dos grupos que recibieron C34 a las 0 y 6 horas de la infección. Se tomaron imágenes de los ratones a las 48 horas de la infección. Las imágenes de la infección bacteriana de luminiscencia y las unidades relativas de luminiscencia se muestran de manera similar a la Figura 66. "***" para la significación con $p < 0,01$.

La Figura 72 es una tabla que muestra la eficacia de glucolípidos seleccionados para suprimir infecciones por *S. capsulate*.

Las Figuras 73 (A-B) muestran la inmunoprotección contra la infección por el virus de la gripe aviar mediante inyección intramuscular de dos dosis de la vacuna de pCHA5 ± glucolípido. Se recogieron los sueros y se ensayaron para determinar los títulos de anticuerpos específicos de HA por ELISA (A); y se expusieron los ratones a DL₅₀ de 200 de los virus NIBRG-14 y se monitorizaron para determinar la supervivencia (B).

Las Figuras 74 (A-C) muestran las respuestas inmunes y la supervivencia de los ratones después de una sola dosis IM de pCHA5 con y sin glucolípidos como adyuvantes. Tres semanas después de la vacunación con pCHA5 (50 µg) ± glucolípidos (2 µg) o alumbre por vía IM, se recogieron los sueros y se analizaron los títulos de anticuerpos específicos de HA mediante ELISA (A). Al mismo tiempo, se sacrificaron los ratones y se recogieron los esplenocitos para el ensayo de ELISPOT (B). Se expuso otro grupo de ratones a una DL₅₀ de 200 del virus NIBRG-14 y se monitorizó la supervivencia (C).

Las Figuras 75 (A-C) muestran la comparación de los efectos adyuvantes de los glucolípidos para la vacuna de pCHA5 y pCHA5-II. Dos semanas después de la inyección de refuerzo para la vacunación con pCHA5 o pCHA5-II (30 µg) ± glucolípidos (2 µg) por vía IM/EP. en la semana 0 y tres, se recogieron los sueros y se ensayaron los títulos de anticuerpos anti-HA mediante ELISA (A); y se expuso a los ratones que fueron vacunados con pCHA5 (B) y pCHA5-II (C) al virus E319, monitorizándose la supervivencia.

Las Figuras 76 (A-D) muestran los efectos de las dosis de pCHA5-II y C34 sobre la producción de anticuerpos específicos de HA y la protección inmune en ratones. Tres semanas después de la vacunación con una sola dosis de pCHA5-II (100, 75, 50 µg) con o sin C34 (0,5, 1, 2, 4 µg) como adyuvante por vía IM, se recogieron los sueros y se analizaron los títulos de anticuerpos específicos de HA por ELISA (A). Al mismo tiempo, se sacrificaron los ratones y se recogieron los esplenocitos para el ensayo de ELISPOT (B). La Fig. 76C muestra las supervivencias de los ratones tratados con dosis diferentes de pCHA5-II y 2 µg de adyuvante C34. La Fig. 76D muestra las supervivencias de los ratones tratados con 100 µg de pCHA5-II y C34 a varias dosis.

Las Figuras 77 (A-D) muestran el efecto adyuvante de C34 sobre la producción de anticuerpos neutralizantes contra

diversos virus de pseudotipo HA. Se muestra el análisis de regresión lineal para las diluciones de los sueros después de la vacunación IM/EP con 0,2 µg de pCHA5 disuelto en PBS que contenía 2 µg de C34 en la semana 0 y 3, dando el 50 % de neutralización del virus de pseudotipo HA (DI₅₀) para TK (A), VN1194 (B), ID05 (C) y Anhui05 (D). El valor de p fue la comparación de los ajustes *p < 0,05 y se presentó estadísticamente significativo al comparar el grupo de adyuvante C34 con el grupo de solo pCHA5.

Las Figuras 78 (A-L) muestran los perfiles de expresión de citocinas en suero en los ratones que recibieron pCHA5 con o sin C34 como adyuvante. Se muestran las concentraciones en suero después de la vacunación con 0,2 µg de pCHA5 con o sin C34 por vía IM/EP en la semana 0 y 3 con respecto a IL-2 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), RANTES (D), MIP-1α (E), MIP-1β (F), KC (G), IL-1β (H), IL-17 (I), IL-12p40 (J), G-CSF (K) y IFN-γ (L).

Las Figuras 79 (A-D) muestran cómo se indujeron las capacidades de neutralización de los antiseros con C34 a través de una inyección intramuscular de una sola dosis. Se muestran los resultados del ensayo de neutralización de virus de pseudotipo HA realizado tres semanas después de la vacunación con 50 µg de pCHA5-II disuelto en PBS que contenía 2 µg de C34 con respecto a Anhui05 (A), TK05 (B), ID05 (C) y VN1194 (D). El valor de p fue la comparación de los ajustes *p < 0,05 y se presentó estadísticamente significativo al comparar el grupo de adyuvante C34 con el grupo de solo pCHA5-II.

La Figura 80 muestra un esquema sintético para el análogo de α-GalCer C34. Los reactivos y las condiciones que se muestran son los siguientes: (a) 2-metoxipropeno, CSA, DMF, 83 %; (b) Ph₃CCl, piridina, 77 %; (c) C₁₃H₂₇⁺PPh₃Br, LHMDs, THF: 75 %; (d) H₂, Pd(OH)₂, EA, 90 %; (e) Tf₂O, 2,6-lutidina, TAIGA, CH₂Cl₂; (f) TFA/TFAA, CH₂Cl₂, dos etapas, 63 %; (g) Tf₂O, Me₂S, 2-Cl-piridina, MS4A, CH₂Cl₂, 60 %; (h) PPh₃ piridina/H₂O; (i) EDC, HBTU, TEA, CH₂Cl₂, dos etapas 88 %; (j) NaOMe, MeOH/CH₂Cl₂; (k) AcOH (ac.); (l) H₂, Pd(OH)₂, MeOH/CHCl₃, tres etapas 40 %.

Descripción detallada de la divulgación

Se ha de dar a todos los términos científicos sus significados habituales entendidos por los expertos en la materia, a menos que se expone un significado alternativo a continuación. En caso de conflicto, prevalecerán las definiciones expuestas en la presente memoria descriptiva.

Como se usa en el presente documento, el término "lípidos" se refiere a cualquier molécula liposoluble (lipófila) que participa en las vías de señalización celular.

Como se usa en el presente documento, el término "glucolípido" se refiere a un lípido enlazado a hidratos de carbono que sirve como marcador para el reconocimiento celular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alfa-galactosil-ceramida" y "α-GalCer" se refiere a un glucolípido que estimula los linfocitos T citotóxicos naturales para producir citocinas auxiliares T tanto (T_H)1 como T_H2.

Como se usa en el presente documento, el término "glucano" se refiere a un polisacárido u oligosacárido. Glucano también se usa en el presente documento para referirse a la porción de hidratos de carbono de un glucoconjugado, tal como una glucoproteína, un glucolípido, un glucopéptido, un glucoproteoma, un peptidoglucano, un lipopolisacárido o un proteoglucano. Los glucanos, por lo general, consisten únicamente en los enlaces O-glucosídicos entre monosacáridos. Por ejemplo, la celulosa es un glucano compuesto de D-glucosa beta-1,4-enlazada, y quitina es un glucano compuesto de N-acetil-D-glucosamina beta-1,4-enlazada. Los glucanos pueden ser homo- o heteropolímeros de restos de monosacáridos, y pueden ser lineales o ramificados. Los glucanos pueden encontrarse unidos a proteínas como en glucoproteínas y proteoglucanos. Por lo general, se encuentran en la superficie exterior de las células. Los glucanos ligados a O o a N son muy comunes en los eucariotas, pero también se pueden encontrar, aunque con menor frecuencia, en los procariotas. Los glucanos ligados a N se encuentran unidos al nitrógeno (N) del grupo R de la asparagina en el sequon. El sequon es una secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X es cualquier aminoácido a excepción de prolina.

Como se usa en el presente documento, el término "glucoproteína" se refiere a una proteína covalentemente modificada con glucano/s. Hay cuatro tipos de glucoproteínas: 1) glucoproteínas ligadas a N; 2) glucoproteínas ligadas a O (mucinas); 3) glucosaminoglucanos (GAG, que también se denominan proteoglucanos); 4) ancladas a GPI. La mayoría de las glucoproteínas tienen micro-heterogeneidad estructural (múltiples estructuras diferentes de glucanos unidas en el mismo sitio de glucosilación) y macro-heterogeneidad estructural (múltiples sitios y tipos de unión de glucano).

Como se usa en el presente documento, el término "análogo" se refiere a un compuesto, por ejemplo, un fármaco, cuya estructura está relacionada con la de otro compuesto, pero cuyas propiedades químicas y biológicas pueden ser muy diferentes.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se define como cualquier sustancia capaz de provocar

una respuesta inmune.

Como se usa en el presente documento, el término "patógeno" es un agente biológico que causa la enfermedad a su hospedador. El organismo contiene muchas defensas naturales contra algunos de los patógenos comunes (tales como *Pneumocystis*) en forma del sistema inmune humano.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunógeno" se refiere a un antígeno o una sustancia capaz de inducir la producción de un antígeno, tal como una vacuna de ADN.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de un inmunógeno, antígeno o vacuna para estimular una respuesta inmune.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoterapia" se refiere a una serie de estrategias de tratamiento basadas en el concepto de la modulación del sistema inmune para conseguir un objetivo profiláctico y/o terapéutico.

Como se usa en el presente documento, el término "CD1d" se refiere a un miembro de la familia de los CD1 (grupo de diferenciación 1) de glucoproteínas expresadas en la superficie de diversas células presentadoras de antígenos humanas. Los antígenos lipídicos presentados por CD1d activan los linfocitos T citolíticos naturales. CD1d tiene un surco de unión al antígeno profundo en el que se unen los antígenos glucolipídicos. Las moléculas de CD1d expresadas en las células dendríticas pueden unirse y presentar glucolípidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sistema inmune adaptativo" se refiere a células y procesos sistémicos altamente especializados que eliminan los desafíos patógenos. Las células del sistema inmune adaptativo son un tipo de leucocito, denominados linfocito. Los linfocitos B y los linfocitos T son los principales tipos de linfocitos.

Como se usan en el presente documento, los términos "linfocitos T" y "Ts" se refieren a un grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos que desempeñan un papel central en la inmunidad mediada por células. Los linfocitos T se pueden distinguir de otros tipos de linfocitos, tales como los linfocitos B y los NK, por la presencia de un receptor especial en su superficie celular denominado receptor de linfocitos T (TCR). Se han descrito varios subconjuntos diferentes de linfocitos T, cada uno con una función distinta. Los linfocitos T auxiliares (T_H) son los "intermediarios" del sistema inmune adaptativo. Una vez activados, se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas denominadas citocinas, que regulan o "ayudan a" la respuesta inmune. Dependiendo de las señales recibidas de citocinas, estas células se diferencian en T_H1 , T_H2 , T_H17 , o uno de los otros subconjuntos, que secretan citocinas diferentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula presentadora de antígeno" (APC) se refiere a una célula que muestra un antígeno foráneo formando un complejo con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Los linfocitos T pueden reconocer este complejo usando su TCR. Las APC se dividen en dos categorías: profesionales o no profesionales. Las células dendríticas (DC) entran en la categoría de profesionales, y son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T, en el contexto de CD1. Como se describe en el presente documento, las DC pueden ser de cualquiera de varios subconjuntos de DC, que se diferencian de, en una realización, los progenitores linfoides o, en otra realización, progenitores mieloides de la médula ósea.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula preinmune" se refiere a una célula inmune indiferenciada, por ejemplo, un linfocito T CD4, que aún no se ha especializado para reconocer un patógeno específico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "linfocitos citolíticos naturales" y "NK" se refiere a una clase de células linfoides que son activadas por interferones para contribuir a la defensa innata del hospedador contra los virus y otros patógenos intracelulares.

En el presente documento, la expresión "linfocitos T citolíticos naturales" (NKT) se refiere a un subconjunto de linfocitos T que comparten características/receptores tanto con los T como con los NK convencionales. Muchas de estas células reconocen la molécula CD1d no polimórfica, una molécula presentadora de antígeno que se une a lípidos y glucolípidos propios y foráneos. El TCR de los NKT es capaz de reconocer antígenos glucolipídicos presentados (acompañados) por una molécula CD1d. Una respuesta principal de los NKT es la rápida secreción de citocinas, incluyendo IL-4, IFN- γ e IL-10 después de la estimulación y, por tanto, la influencia en diversas respuestas inmunes y procesos patógenos. Los NKT pueden ser una población homogénea o una población heterogénea. En una realización ilustrativa, la población puede ser "NKT no invariantes", que pueden comprender poblaciones de linfocitos T de médula ósea humana y de ratón, y de hígado humano que son, por ejemplo, linfocitos T no invariantes reactivos a CD1d que expresan diversos TCR, y que también pueden producir una gran cantidad de IL-4 e IFN- γ . El subconjunto más conocido de NKT dependiente de CD1d expresa una cadena alfa de TCR invariante (TCR- α). Estos se conocen como NKT invariantes o de tipo I (iNKT). Estas células se conservan entre los seres humanos (NKT $V\alpha 24i$) y los ratones (NKT $V\alpha 14i$) y están implicadas en muchos procesos inmunológicos.

- Como se usa en el presente documento, el término "citocina" se refiere a cualquiera de las numerosas proteínas secretadas, de pequeño tamaño, que regulan la intensidad y la duración de la respuesta inmune afectando al proceso de diferenciación de las células inmunes que, por lo general, supone cambios en la expresión génica mediante los que una célula precursora se convierte en un tipo de célula especializado distinto. Las citocinas se denominan de manera muy diversa linfocinas, interleucinas y quimiocinas, basándose en su presunta función, célula de secreción o diana de acción. Por ejemplo, algunas interleucinas comunes incluyen, pero sin limitación, IL-12, IL-18, IL-2, IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10, IL-13, IL-21 y TGF- β .
- Como se usa en el presente documento, el término "quimiocina" se refiere a cualquiera de diversas pequeñas citocinas quimiotácticas liberadas en el sitio de infección que proporcionan un medio para la movilización y la activación de los linfocitos. Las quimiocinas atraen a los leucocitos a los sitios de infección. Las quimiocinas tienen restos de cisteína conservados que les permiten su asignación a cuatro grupos. Los grupos, con quimiocinas representativas, son quimiocinas C-C (RANTES, MCP-1, MIP-1 α y MIP-1 β), quimiocinas C-X-C (IL-8), quimiocinas C (linfotactina) y quimiocinas CXXC (fractalquina).
- Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta de tipo T_H2" se refiere a un patrón de expresión de citocinas de modo que se producen ciertos tipos de citocinas, interferones, quimiocinas. Las citocinas T_H2 típicas incluyen, pero sin limitación, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta de tipo T_H1" se refiere a un patrón de expresión de citocinas de modo que se producen ciertos tipos de citocinas, interferones, quimiocinas. Las citocinas T_H1 típicas incluyen, pero sin limitación, IL-2, IFN- γ , GM-CSF y TNF- β .
- Como se usa en el presente documento, la expresión "influida por T_H1" se refiere a una respuesta inmunogénica en la que la producción de citocinas y/o quimiocinas T_H1 se aumenta en mayor medida que la producción de citocinas y/o quimiocinas T_H2.
- Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se define como las partes de una molécula de antígeno que están en contacto con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo o un receptor de linfocitos T.
- Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a un preparado que contiene un antígeno, que consiste en organismos enteros que causan enfermedades (muertos o debilitados) o componentes de dichos organismos tales como proteínas, péptidos o polisacáridos, que se usa para conferir inmunidad contra la enfermedad que los organismos causan. Los preparados vacunales pueden ser naturales, sintéticos o derivados mediante tecnología de ADN recombinante.
- Como se usa en el presente documento, el término "antimicrobiano" se refiere a una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de microbios tales como bacterias, hongos o virus.
- Como se usa en el presente documento, el término "toxóide" se refiere a una toxina bacteriana cuya toxicidad se ha debilitado o suprimido ya sea por tratamiento químico (formalina) o térmico, mientras que se mantienen otras propiedades, normalmente, la inmunogenicidad. Los toxoides se usan en las vacunas, ya que inducen una respuesta inmune a la toxina original o aumentan la respuesta a otro antígeno. Por ejemplo, el toxóide tetánico se obtiene de la tetanospasmina producida por *Clostridium tetani* y causante del tétanos. El toxóide tetánico es usado por muchos centros de plasma de Estados Unidos para el desarrollo de vacunas ricas en plasma.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "vacuna de ADN" se refiere a una construcción de ADN que se introduce en las células y, posteriormente, se traduce en proteínas antigénicas específicas.
- Como se usa en el presente documento, el término "plásmido" se refiere a un ADN circular extracromosómico capaz de replicarse que se puede usar como un vector de clonación.
- Como se usa en el presente documento, el término "microorganismo" y "microbio" se refiere a un organismo que es microscópico (demasiado pequeño para ser visto por el ojo humano a simple vista). Los microorganismos son increíblemente diversos, e incluyen, pero sin limitación, bacterias y hongos.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "adyuvante inmunológico" se refiere a una sustancia que se usa en combinación con un inmunógeno que mejora o modifica la respuesta inmune al inmunógeno. En una realización ilustrativa, los análogos de α -GalCer se usan como adyuvantes inmunológicos para modificar o aumentar los efectos de una vacuna estimulando el sistema inmune de un paciente a quien se administra la vacuna a responder a la vacuna más enérgicamente.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "adyuvante de alumbre" se refiere a una sal de aluminio con actividad adyuvante inmune. Este agente se adsorbe y hace precipitar antígenos proteicos en solución. El precipitado resultante mejora la inmunogenicidad de la vacuna al facilitar la liberación lenta del antígeno desde el depósito vacunal formado en el sitio de la inoculación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente activo para inmunoterapia antitumoral" se refiere a un análogo de α -GalCer que inhibe, reduce y/o elimina tumores.

Como se usa en el presente documento, la expresión "factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos" (GM-CSF) se refiere a una citocina que sirve como un factor estimulante de colonias que estimula la producción de glóbulos blancos, en particular, de granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), macrófagos y células de la médula ósea que son precursores de plaquetas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "específico/a de antígeno" se refiere a una propiedad de una población de células de manera que el suministro de un determinado antígeno o de un fragmento del antígeno genera la proliferación de células específicas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "citometría de flujo" o "FACS" significa una técnica para examinar las propiedades físicas y químicas de las partículas o de las células suspendidas en una corriente de fluido a través de dispositivos de detección ópticos y electrónicos.

Como se usa en el presente documento, análogos de α -GalCer o análogos de α -GalCer sintéticos, a menos que se indique lo contrario, se refieren a análogos de glucolípidos sintéticos basados en la estructura a base de alfa-galactosil-ceramida.

En el presente documento, los restos de aminoácidos de los péptidos se abreviarán como: Fenilalanina es Phe o F; Leucina es Leu o L; isoleucina es Ile o I; Metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o Q; Asparagina es Asn o N; Lisina es Lys o K; Ácido aspártico es Asp o D; Ácido glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R; y Glicina es Gly o G. Para una descripción más detallada de los aminoácidos, se puede consultar "Proteins: Structure and Molecular Properties" de Creighton, T. E., W. H. Freeman & Co., Nueva York 1983.

Se sabe que los lípidos de los mamíferos y de las micobacterias son presentados por CD1a, CD1b, CD1c y CD1d humanas. La α -galactosil-ceramida, un lípido que se encuentra en la esponja marina *Agelas mauritianus*, ha sido el ligando para CD1d más ampliamente estudiado. Se ha demostrado que la estimulación *in vitro* de células de bazo de ratón mediante α -GalCer condujo a la proliferación de NKT y a la producción tanto de IFN- γ como de IL-4, una respuesta de tipo T_H1 y de tipo T_H2, respectivamente. Los estudios murinos han demostrado que las células pueden ser rápidamente activadas por las células dendríticas inmaduras (iDC) portadoras de α -GalCer y que los α NKT activos pueden, a su vez, inducir la maduración completa de las DC.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una serie de nuevas porciones de lípidos de los análogos de α -GalCer que son capaces de unirse con un surco de unión de una molécula de CD1 para formar complejos de CD1-análogo. Estos complejos de CD1-análogo se presentan a los linfocitos T restringidos a DC-1 (NKT) por medio del reconocimiento del receptor de linfocitos T, y son capaces de realizar la activación de TCR, la liberación de citocinas T_H1 y T_H2, y la expansión de NKT. En una realización ilustrativa, se diseña un análogo de α -GalCer de modo que tiene una potente afinidad de unión con el surco de unión de la molécula de CD1, en correlación con una respuesta inmunogénica influida por T_H1. En otra realización ilustrativa, se diseña un análogo de α -GalCer de modo que tiene una potente afinidad de unión con el surco de unión de la molécula de CD1, en correlación con una respuesta inmunogénica influida por T_H2.

En otro aspecto, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer se pueden usar como inmunoterapias. En una realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer se pueden usar para la inmunoterapia del cáncer. En una realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer se pueden usar para inmunoterapia adyuvante. En una realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer se pueden usar para inmunoterapia antimicrobiana que incluye la vacunación. En otra realización ilustrativa más, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer se pueden usar para inmunosupresión para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

De acuerdo con otro aspecto, las composiciones desveladas en el presente documento se pueden incluir en una composición farmacéutica o nutracéutica junto con agentes activos, portadores, vehículos, excipientes o agentes auxiliares adicionales identificables por el experto en la materia tras la lectura.

Las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas comprenden preferentemente al menos un portador farmacéuticamente aceptable. En dichas composiciones farmacéuticas, las composiciones desveladas en el presente documento forman el "compuesto activo", también denominado "agente activo". Como se usa en el presente documento, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes isotónicos y de absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar compuestos activos

suplementarios a las composiciones. Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. El preparado parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis de vidrio o plástico.

“Sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a seres humanos y primates no humanos (por ejemplo, gorila, macaco, tití), animales de granja (por ejemplo, oveja, vaca, caballo, burro y cerdo), animales de compañía (por ejemplo, perro, gato), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo, ratón, conejo, rata, cobaya, hámster), animales salvajes en cautividad (por ejemplo, zorro, ciervo) y cualquier otros organismos que se puedan beneficiar de los agentes. No hay limitación en el tipo de animal que se podría beneficiar de los agentes descritos actualmente. Un sujeto, independientemente de si se trata de un organismo humano o no humano, se puede denominar paciente, individuo, animal, hospedador o receptor.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para un uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, NJ) o tampón fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser líquida en la medida en que sea fácil de inyectar. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y puede conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Se puede provocar la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen el secado al vacío y la liofilización, que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

En general, las composiciones orales incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un portador líquido para su uso como un enjuague bucal. Se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de un pulverizado de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación, se usan penetrantes apropiados para la barrera que se va a atravesar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede llevarse a cabo mediante el uso de pulverizados nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos

se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como se conocen en la técnica en general. Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

De acuerdo con las realizaciones, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse en el mercado, en Aiza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Se pueden usar suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos específicos de células) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 4.522.811, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para la determinación del DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción de DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos. Aunque se pueden usar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio de la ubicación afectada para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para su uso en seres humanos. Las dosis de dichos compuestos se encuentran preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración usada. Para cualquier compuesto usado en el método descrito en el presente documento, se puede estimar inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones circulantes en plasma que incluya la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición media máxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo (es decir, una dosis eficaz) puede variar de aproximadamente 0,001 a 100 g/kg de peso corporal, u otros intervalos que serían evidentes y conocidos por los expertos sin necesidad de experimentación. El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes.

Como se describe en el presente documento, el experto en la materia puede prever uno o más kits de piezas, kits de piezas para llevar a cabo al menos uno de los métodos descritos en el presente documento, el kit de piezas que comprende dos o más composiciones, las composiciones que comprenden, sola o en combinación, una cantidad eficaz de las composiciones desveladas en el presente documento de acuerdo con el al menos uno de los métodos mencionados anteriormente.

Los kits posiblemente también incluyen composiciones que comprenden agentes activos, identificadores de un evento biológico u otros compuestos identificables por un experto en la materia tras la lectura. El término "identificador" se refiere a una molécula, un metabolito u otro compuesto, tal como anticuerpos, oligonucleótidos de ADN o ARN, capaces de descubrir o determinar la existencia, la presencia o el hecho de, o de detectar de otra manera, un hecho biológico bajo procedimientos identificables por un experto en la materia. Los identificadores ilustrativos son anticuerpos, los procedimientos ilustrativos son la transferencia Western, ensayo de nitrato y RT-PCR, u otros procedimientos descritos en los Ejemplos.

El kit también puede comprender al menos una composición que comprenda una cantidad eficaz de las composiciones desveladas en el presente documento o una línea celular. Las composiciones y la línea celular de los kits de piezas se usarán para realizar el al menos un método descrito en el presente documento de acuerdo con el

procedimiento identificable por un experto en la materia.

RECONOCIMIENTO Y ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE LINFOCITOS T A TRAVÉS DE ANÁLOGOS DE α -GalCer Y RESPUESTA INMUNE RESULTANTE

La Figura 1A es una ilustración esquemática que muestra cómo el reconocimiento de linfocitos NKT invariantes de antígenos glucolipídicos presentados por CD1d conduce a una cascada de eventos. Las porciones lipídicas de los antígenos glucolipídicos se insertaron en un surco de unión hidrófoba de la molécula CD1 para formar complejos de CD1-antígeno que son capaces de entrar en contacto en los receptores de linfocitos T (TCR) de los NKT, lo que conduce a la cascada de eventos en la que participan citocinas, quimiocinas y moléculas coestimuladoras. La diversidad y el alcance de la producción de citocinas pueden tener una amplia selección de efectos, que varían de mejorar la inmunidad mediada por células (respuestas de tipo T_H1) a suprimir la inmunidad mediada por células (las respuestas de tipo T_H2). La Figura 1B es una ilustración esquemática que muestra cómo el reconocimiento de los linfocitos NKT de α -GalCer o un análogo de α -GalCer presentado por CD1d estimula una rápida respuesta de las citocinas de tipo T_H1 y T_H2 . En una realización ilustrativa, se inicia una respuesta de citocinas de tipo T_H1 . En otra realización ilustrativa, se inicia una respuesta de citocina de tipo T_H2 . En otra realización ilustrativa, se inicia una respuesta de citocinas tanto de tipo T_H1 como de tipo T_H2 .

En la Figura 2, se muestran las estructuras químicas de α -GalCer, así como de los análogos de α -GalCer sintéticos. Los análogos de α -GalCer incluyen análogos de α -GalCer de origen bacteriano (Grupo I: C2, C3 y C14), análogos de α -GalCer modificados con sulfonación (Grupo II: C4, C5 y C9), análogos de α -GalCer de cadena de fenilalquilo (Grupo III: C6-C8, C10-11, C15-C16, C18-C34 [siendo C34 de la presente invención], C8-5 y C8-6) y análogos de α -GalCer truncados con fitoesfingosina (Grupo IV: C12, C13 y C17). La Figura 3 muestra un ejemplo de la síntesis de análogos de α -GalCer glucoesfingolipídicos C12 y C13.

En un aspecto, los análogos de α -GalCer sintéticos son capaces de formar complejos con una molécula CD1d. En otro aspecto, los análogos de α -GalCer sintéticos son capaces de ser reconocidos por los receptores de linfocitos T NKT. En otro aspecto más, los análogos de α -GalCer sintéticos son capaces de provocar una respuesta de tipo T_H1 , de tipo T_H2 o una respuesta de tipo de tipo T_H1 y de tipo T_H2 . En una realización ilustrativa, los análogos de α -GalCer son capaces de activar los NKT *in vitro*. En otra realización ilustrativa, los análogos de α -GalCer son capaces de activar los NKT *in vivo*.

En el presente documento, se describe un método de estimulación o potenciación de la producción de citocinas en el tejido, células y/o en un sujeto, incluyendo el método: administrar al sujeto uno cualquiera de los análogos de α -GalCer sintéticos, en el que se activa un NKT en el sujeto tras el contacto con el análogo de α -GalCer y se inicia una respuesta de citocinas. La citocina puede ser, por ejemplo, interferón- γ (IFN- γ) o interleucina-4 (IL-4).

También se describe en el presente documento un método de activación de una respuesta de citocinas en tejido, células y/o un sujeto mediante el que se administra una cantidad eficaz de un compuesto, o de una sal o una mezcla, estando los compuestos seleccionados del grupo que consiste en C2-C8, C8-5, C8-6 y C9-C34 (siendo C34 de la presente invención) y en el que el sujeto tiene un sistema inmune adaptativo que incluye una población de células, población que incluye al menos un linfocito y al menos una célula presentadora de antígeno; formación de un complejo entre el compuesto y la célula presentadora de antígeno, en el que la formación del complejo produce la activación de un receptor en el linfocito; y la activación del linfocito para producir la respuesta de citocinas.

Como se describe en el presente documento, se cultivaron hibridomas 1.2 murinos (hibridomas de linfocitos V α 14/T reactivos a CD1d) en placa de 96 pocillos recubierta con mCD1d y se pulsaron con el control de DMSO, α -GalCer (C1) o los análogos de α -GalCer indicados a 100 ng/ml. Se midió la liberación de IL-2 en el medio de cultivo tisular tras un cultivo de 18 horas, como se ve en la Figura 4. La mayoría de los análogos de α -GalCer indujeron una mayor producción de IL-2 que α -GalCer. Cuando se examinaron los análogos de α -GalCer en cuanto a su capacidad para provocar la producción de citocinas/quimiocinas en los NKT preinmunes humanos (CD161⁺CD3⁺) *in vitro*, se encontraron resultados similares. Se cultivaron NKT CD161⁺CD3⁺ preinmunes humanos con células dendríticas inmaduras autólogas (DC CD14⁺) y se pulsaron con el control de DMSO, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados a 10 μ g/ml. Se midieron las citocinas liberadas en el medio de cultivo tisular después de un cultivo de 18 horas, como se ve en la Figura 5. Los análogos de α -GalCer eran potentes inductores de la secreción de citocinas T_H1 y T_H2 . La Figura 5A muestra la inducción de IFN- γ e IL-4; la Figura 5B muestra la inducción de IL-2 e IL-6; y la Figura 5C muestra la inducción de IL-12 e IL-10. Los compuestos aromáticos del Grupo III y IV, especialmente C11, C16 y C13, indujeron significativamente más secreción de IFN- γ que α -GalCer, mientras, todos los análogos de α -GalCer generaron ligeramente menos IL-4 que α -GalCer. La Figura 6 muestra la pureza de los NKT CD161⁺CD3⁺ humanos (parte superior) y la proporción de IFN- γ /IL-4, normalizada con respecto al control de DMSO (parte inferior). Cuando se expresaron como proporción de IFN- γ /IL-4, C9, C12, C13, C14 y todos los compuestos del Grupo III fueron más influidos por T_H1 ; mientras que C1, C3, C4, C5, C8 y C17 fueron más influidos por T_H2 . En la Figura 7, se enumera la inducción de las citocinas y quimiocinas desde los NKT CD161⁺CD3⁺ humanos. En negrita, se marcan los cinco valores más altos para cada citocina. Algunos de los análogos de α -GalCer ensayados mostraron

una mayor inducción de quimiocinas de lo que lo hizo α -GalCer; por ejemplo, C13 generó un aumento notable de quimiocinas tales como MIP-1 α , MCP-1 e IL-8. Los compuestos aromáticos C10, C11 y C16 mostraron una mayor inducción de IL-3, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) e IL-15.

La Figura 8 muestra más resultados *in vitro* de la capacidad de los análogos de α -GalCer para generar la producción de citocinas/quimiocinas en NKT humanos preinmunes primarios. Se cultivaron NKT humanos preinmunes primarios con DC inmaduras autólogas, y se pulsaron con control de DMSO, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados (C11 y C18-C29). Como se muestra en la Figura 8A, todos los análogos de α -GalCer ensayados indujeron niveles más altos de secreción de IFN- γ que C1. Los análogos de α -GalCer indujeron niveles comparables de IL-4 (véase la Figura 8B). Los análogos de α -GalCer indujeron proporciones de IFN- γ /IL4 más altas, es decir, influidas por T_H1/T_H2 que C1 (véase la Figura 80). Los análogos de α -GalCer C20, C24 y C26 fueron significativamente más potentes en generar la producción de IFN- γ , una mayor proporción de IFN- γ /IL4 y mayores niveles de IL-2 (véase la Figura 8D) que el análogo de α -GalCer C11. Los análogos de α -GalCer C20 y C24 indujeron la producción de IL-12 y también generaron mayor liberación de IL-6 que el resto de análogos de α -GalCer ensayados (véanse las Figuras 8E y 8F). La Figura 9 muestra la expansión de los NKT humanos realizada por los análogos de α -GalCer C11 y C18-C29. Los análogos de α -GalCer C20, C22-C24 y C26-C27 indujeron una expansión significativamente superior de linfocitos NKT humanos restringidos a CD1d que C1 y C11.

La Figura 10 muestra los diferentes niveles de secreción de IFN- γ entre NKT humanos preinmunes y pulsados con diversos análogos de α -GalCer. La Figura 10A muestra la secreción de IFN- γ desde NKT preinmunes humanos ($V\alpha24^+$) cultivados con DC CD14 $^+$ inmaduras, y pulsadas con el control de DMSO, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados. La Figura 10B-D muestra la secreción de IFN- γ en respuesta a los análogos de α -GalCer en tres fuentes diferentes de NKT : (B) NKT preinmunes humanas, (C) NKT pulsados con α -GalCer y (D) NKT pulsados con C11. Los NKT se cultivaron con células HeLa-CD1d, y se pulsaron con control de DMSO, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados durante 18 horas. La Figura 10E muestra diferentes niveles basales de IFN- γ en NKT preinmunes humanos, NKT pulsados con α -GalCer d NKT pulsados con C11.

La Figura 11 muestra la producción de citocinas T_H1/T_H2 por NKT preinmunes humanos invariante en respuesta a los análogos de α -GalCer. Se cultivaron NKT $V\alpha24^+$ humanos con DC CD14 $^+$ inmaduras autólogas pulsadas con control de DMSO, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados durante 18 horas. La Figura 11(A) muestra la inducción de IFN- γ , (B) muestra la inducción de IL-4 y (C) muestra la proporción de IFN- γ con respecto a IL-4, normalizada con respecto al control de DMSO. En la Figura 12, se muestra la inducción de citocinas y quimiocinas desde los NKT $V\alpha24^+$ humanos preinmunes.

EXPANSIÓN Y ACTIVACIÓN DE NKT USANDO ANÁLOGOS DE α -GalCer

En un aspecto, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer sintéticos son capaces de expandir y activar los NK e NKT . Debido a que se han documentado números reducidos de NKT en las células mononucleares de sangre periférica humana en pacientes con tumores malignos, la expansión y activación de los NKT de dichos pacientes con los análogos de α -GalCer puede ser terapéuticamente beneficiosa. En una realización ilustrativa, los análogos de α -GalCer son capaces de ampliar los NKT humanos *in vitro*.

Se describe un método de producción de una población de NKT expandida en cultivo, aislada, que comprende poner en contacto linfocitos $V\alpha14i$ o $V24\alpha i$ T con células dendríticas y un análogo de α -GalCer durante un período de tiempo que provoca la expansión de los linfocitos T específicos del análogo y aislar los linfocitos T expandidos así obtenidos, produciendo de este modo una población de NKT expandida en cultivo, aislada. El método de producción de una población de NKT expandida en cultivo aislada puede comprender además la etapa de añadir una citocina o un factor de crecimiento a la célula dendrítica, cultivo de linfocitos NKT .

Se cultivaron células CD56 $^+$ humanas (mezclas de células NK/ NKT) con DC CD14 $^+$ inmaduras autólogas y se pulsaron con DMSO, α -GalCer o diversos análogos de α -GalCer. El día 9 después de la exposición, se determinó la expansión/supervivencia de los NK y los NKT y de una subpoblación de NKT , NKT (CD161 $^+$ / $V\alpha24^+$ /CD56 $^+$ /CD3 $^+$), por citometría de flujo. Como se muestra en las Figuras 13 y 14, se observó un aumento significativo de los NKT frente al control tras la estimulación con C2, C8-C12 y C15-C16. Entre los análogos de α -GalCer ensayados, varios de los compuestos aromáticos del Grupo III, especialmente C11, C15 y C16, fueron más eficaces que C1.

Como se muestra en la Figura 15, se cultivaron células CD56 $^+$ humanas (mezclas de NK/ NKT) con DC CD14 $^+$ inmaduras autólogas y se pulsaron con DMSO, α -GalCer o varios análogos de α -GalCer a 10 o 100 ng/ml el día 2 durante 18 horas. Se analizó el porcentaje de células CD161 $^+$ / $V\alpha24^+$ TCR $^+$ en las mezclas de NK/ NKT por citometría de flujo el día 9. La Figura 15A muestra el porcentaje de NKT $V\alpha24$ en respuesta a 100 ng/ml. La Figura 15B muestra las veces de cambio en el número total de NKT $V\alpha24$ en respuesta a diferentes dosis. *, $p < 0,05$, en comparación con DMSO; #, $p < 0,05$, en comparación con C1.

MADURACIÓN Y ALARGAMIENTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS USANDO ANÁLOGOS DE α -GalCer

Las células presentadoras de antígeno (APC) más eficaces son las células dendríticas (DC) inmunológicamente competentes, maduras. Las DC son capaces de evolucionar de células de cebado de linfocitos T inmaduras, de captura del antígeno, a maduras, presentadoras de antígeno; de convertir antígenos en inmunógenos y expresar moléculas tales como citocinas, quimiocinas, moléculas coestimuladoras y proteasas para iniciar una respuesta inmune. Los tipos de respuestas inmunes mediadas por linfocitos T (tolerancia frente a inmunidad, T_H1 frente a T_H2) inducidas pueden variar, sin embargo, dependiendo del linaje y de la etapa de maduración específicos de las DC, además de las señales de activación recibidas del microambiente circundante.

La capacidad de las DC para regular la inmunidad depende de la maduración de las DC. Por consiguiente, la maduración de las DC es fundamental para el inicio de la respuesta inmune. Una variedad de factores puede producir la maduración después de la captación y el procesamiento del antígeno dentro de las DC. Durante su conversión de células inmaduras a células maduras, las DC experimentan una serie de cambios fenotípicos y funcionales. El proceso de maduración de las DC, en general, implica la redistribución de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) desde los compartimentos endocíticos intracelulares a la superficie de las DC, la regulación negativa de la interiorización del antígeno, el aumento de la expresión superficial de moléculas coestimuladoras, cambios morfológicos (por ejemplo, formación de dendritas), la reorganización del citoesqueleto, la secreción de quimiocinas, citocinas y proteasas, y la expresión superficial de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas.

En un aspecto, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer sintéticos son capaces de potenciar la maduración de las DC humanas. La maduración de las células dendríticas puede conducir a mejorar las respuestas inmunes adaptativas. Se desvela un método de maduración de las células dendríticas que incluye: proporcionar células dendríticas inmaduras; e incubar las células dendríticas inmaduras con una concentración de análogos de α -GalCer durante un período de tiempo de modo que las células dendríticas inmaduras se vuelvan maduras. En una realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que estas células dendríticas maduras se pueden usar luego como inmunoterapias tales como, por ejemplo, inmunoterapias contra el cáncer e inmunoterapias adyuvantes. En otra realización ilustrativa, el compuesto de la invención es para su uso en un método en el que los análogos de α -GalCer se pueden combinar con células dendríticas inmaduras o células dendríticas maduras, y luego usarlos como inmunoterapias tales como, por ejemplo, inmunoterapias contra el cáncer e inmunoterapias adyuvantes.

Los análogos de α -GalCer son capaces de inducir la maduración de las DC esplénicas de ratón. *In vitro*, los análogos de α -GalCer fueron capaces de aumentar directamente los niveles de expresión de diversos marcadores de maduración superficial, incluyendo CD40, CD54, CD80, CD83, CD86, CD209 y HLA-DR (molécula de MHC II) en DC humanas, junto con el alargamiento dendrítico. Como se muestra en la Figura 16, C13 (no de la presente invención) mostró un aumento significativo de los niveles de expresión de CD40, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR, y potenció la maduración de DC humanas derivadas de monocitos. La Figura 17A muestra histogramas para la expresión de CD40, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR en las DC en respuesta a C13. La Figura 17B muestra la morfología de las DC incubadas con C13 durante 48 horas.

ACTIVACIÓN DE TCR DEPENDIENTE DE CD1d DE NKT USANDO ANÁLOGOS DE α -GalCer

Como se describe en el presente documento, los análogos de α -GalCer sintéticos son capaces de inducir la activación de TCR dependiente de CD1d. La Figura 18 muestra una ilustración esquemática que resume las vías de señalización de TCR en los NKT. Los NKT reconocen los antígenos glucolipídicos presentados en el contexto de CD1d en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) a través de complejos de receptor de linfocitos T. La unión de los antígenos glucolipídicos activa las quinasas citosólicas en los NKT, incluyendo la fosforilación de ERK1/2, p38, IKB α , CREB, STAT3 y STAT5. Estas cascadas de señalización conducen a la proliferación de los NKT y a la producción de citocinas/quimiocinas.

Como se describe en el presente documento, los análogos de α -GalCer son capaces de inducir la activación de TCR dependiente de CD1d de los NKT humanos preinmunes. Para discernir si la activación de TCR es dependiente de CD1d, se determinaron los efectos de diversos análogos de α -GalCer presentados por HeLa-CD1d, que sobreexpresan CD1d humano, y células HeLa de control. Además, se comparó la capacidad de HeLa-CD1d (ARC no profesionales) con las DC inmaduras (APC profesionales) en la presentación de diversos análogos de α -GalCer a los NKT. Como se muestra en la Figura 19, C1 y los análogos de α -GalCer C11, C13 y C17 aumentaron los valores intracelulares de fosfo-CD3 ϵ 7,3, 10, 7,3 y 5,9 veces de control, respectivamente, cuando fueron presentados por células HeLa-CD1d, y 10,8, 21,3, 17,3 y 12 veces, respectivamente, cuando fueron presentados por DC. Para fosfo-ERK1/2, C1 y los análogos de α -GalCer C11, C13 y C17 indujeron un aumento de 6,6, 14,6, 6,6 y 3,3 veces, respectivamente, con las células HeLa-CD1d y 30, 48,3, 35 y 18,6 veces respectivamente, con las DC. La inducción de fosfo-CREB es aún más sorprendente; C1 y los análogos de α -GalCer C11, C13 y C17 indujeron 2, 117, 41 y 20 veces de expresión, respectivamente, cuando fueron presentados por las células HeLa-CD1d y un aumento de 68,

204, 158 y 49 veces, respectivamente, cuando fueron presentados por DC. Ninguno de los análogos de α -GalCer ensayados tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de Syk, una proteína quinasa, conocida por desempeñar un papel en la señalización del receptor de linfocitos B, pero no en la vía de TCR. Estos hallazgos sugieren que los análogos de α -GalCer aromáticos indujeron una potente activación de TCR de una manera dependiente de CD1d, siendo el grado de activación mucho mayor cuando fueron presentados por las APC profesionales en comparación con las APC no profesionales. Ninguno de los análogos de α -GalCer mostró ningún efecto sobre la fosforilación de CD3 ϵ , ERK1/2 o CREB en los linfocitos NKT cuando se cultivaron junto con células HeLa de control. En general, los compuestos C11 y C13 parecieron ser más potentes en la activación de TCR que los compuestos C1 y C17, que coincidieron con su mayor inducción del perfil de citocinas influida por T_H1 desencadenada por C11 en comparación con C1, porque se ha publicado que las activaciones de ERK1/2 y CREB desempeñan un papel en la inducción de muchas citocinas T_H1, tales como IL-12 e IFN- γ . C13 también provocó una activación significativa de TCR, presumiblemente como consecuencia de la capacidad única de C13 para mejorar la expresión de moléculas coestimuladoras en las DC. Para los cuatro análogos de α -GalCer examinados, el TCR fue activado de manera más potente cuando fueron presentados por DC que por las células HeLa-CD1d, especialmente con C13. Los niveles más altos de CD3 ϵ fosforilado, ERK1/2 y CREB inducidos por el análogo de α -GalCer C11 que por C1 coinciden con la noción de que la unión más fuerte de glucolípido a CD1d induce una mayor estimulación del TCR en los NKT.

La Figura 20 muestra cómo los análogos de α -GalCer son capaces de inducir la activación de TCR dependiente de CD1d. Varios análogos de α -GalCer (en concreto, C16, C23, C26, C8-5 y C8-6) son capaces de activar las vías de señalización de TCR en NKT humanos (linfocitos T V α 24⁺) con la fosforilación de ERK1/2, p38, I κ B α , CREB, STAT3 y STAT5. Para discernir si la activación de TCR es dependiente de CD1d, se determinaron los efectos de diversos análogos de α -GalCer presentados por HeLa-CD1d, que sobreexpresan CD1d humano, y células HeLa de control. La Figura 20A muestra la determinación de los linfocitos T V α 24⁺ aislados por citometría de flujo que contenían 92 % de linfocitos T V α 24⁺/CD3⁺ preinmunes. C1 y los análogos de α -GalCer, en concreto, C16, C23, C26, C8-5 y C8-6, aumentaron los valores intracelulares de (B) fosfo-CD3 ϵ (fosfo-tirosina), (C) fosfo-CREB (Ser133), (D) fosfo-ERK1/2 (Thr185/Tyr187), (E) fosfo-p38 (Thr180/Tyr182), (F) fosfo-I κ B α (Ser32), (G) fosfo-Lck, (H) fosfo-Lat, (I) fosfo-STAT3 (Ser727), (J) fosfo-STAT5 A/B (Tyr 694/699), (K) fosfo-Syk (fosfo-tirosina) y (L) fosfo-Zap-70 (fosfo-tirosina). *, p < 0,05, en comparación con DMSO; #, p < 0,05, en comparación con C1.

Los análogos de α -GalCer también muestran mayor afinidad de unión a NKT/T de ratón restringidos a CD1d *in vitro* (Figura 21) y la activación dependiente de CD1d de dos subconjuntos de NKT y NK *in vivo* (Figura 22). Como se muestra en la Figura 21, se extrajo el bazo de ratones BALB/c 72 horas después de la inyección intravenosa (IV) de 0,1 μ g/ratón de los análogos de α -GalCer indicados (C1, 7DW8-5, C26, C8, C17) o vehículo. Se tiñó un porcentaje de linfocitos NKT (Figura 21A) o linfocitos T (Figura 21B) de ratón con tetrámero mCD1d cargado con α -GalCer (10 moles por μ g). La Figura 21C muestra la afinidad de unión diferente de α -GalCer y un análogo de α -GalCer de fenol 7DW8-5 a los linfocitos NKT y T restringidos a CD1d. La Figura 22 muestra la expansión dependiente de CD1 dos subconjuntos de NKT. se extrajo el bazo de ratones BALB/c de tipo silvestre (WT) o con CD1 desactivado (KO) 72 h después de la inyección de control de DMSO, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados C8, C16, C22, C23, C26, 7DW8-5 y 7DW8-6 IV. Se evaluó el número total de NKT y de sus dos subtipos, designados como NKT de Tipo II (CD3⁺/NK⁺/CD49⁺/CD69) y NKT de Tipo I (CD3⁺/NK⁺/CD49⁺/CD69⁺) en ratones (B) de tipo silvestre o (C) con CD1 desactivado en respuesta a los análogos de α -GalCer indicados mediante FACS. (D) muestra la activación dependiente de CD1d de los NK. Se evaluó la expansión del número total de NK activos (CD3⁺/NK⁺/CD69⁺) en ratones WT o CD1KO en respuesta a los análogos de α -GalCer indicados mediante FACS. *, p < 0,05, en comparación con DMSO; #, p < 0,05, en comparación con C1.

ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T_H IN VIVO. EXPANSIÓN/ACTIVACIÓN DE ESPLENOCITOS Y ACTIVACIÓN DE TCR DEPENDIENTE DE CD1d DE NKT USANDO ANÁLOGOS DE α -GalCer

Como se describe en el presente documento, los análogos de α -GalCer son capaces de activar linfocitos T_H *in vivo*. Para evaluar el impacto de la vía de administración sobre la secreción de citocinas, se inyectaron α -GalCer y siete análogos de α -GalCer en ratones BALB/c bien por vía intravenosa (IV), subcutánea (SubQ) o intramuscular (IM), y se determinó el impacto en la producción de citocinas. Las Figuras 23A, 27A y 29A muestran el nivel en suero de IFN- γ en un período de 72 horas después de la inyección de varios análogos de α -GalCer a través de diferentes vías. En general, se detectó un aumento de la producción de citocinas tan temprano como en 2 horas, alcanzó un máximo a las 18 horas y descendió gradualmente hasta el nivel de línea basal en 48 horas. Cuando se introdujeron a través de la vía IV (Figura 23A), el análogo de α -GalCer C9 y el análogo de α -GalCer C16 mostraron un nivel de actividad similar al de C1, seguido por los análogos de α -GalCer C13, C11, C2, C14 y C3 (ninguno de los cuales son de la presente invención). En concreto, el nivel de IFN- γ inducido por la administración SubQ (Figura 27A) de los mismos análogos de α -GalCer fue mucho menor que el de la vía IV, mientras que el nivel de la vía IM (Figura 29A) fue intermedio. Aunque C indujo el mayor nivel de IFN- γ cuando se administró IV, el análogo de α -GalCer C9 superó a C1 cuando se administró por las vías SubQ e IM. Las Figuras 23B, 27B y 29B, muestran los niveles de IL-4 después de las inyecciones de análogos de α -GalCer a través de las diferentes vías. Todos los análogos de α -GalCer ensayados, así como α -GalCer, mostraron poca inducción de IL-4 cuando se introdujeron por vía SubQ,

mientras que se indujeron niveles intermedios de IL-4 mediante todos los análogos de α -GalCer cuando se administraron por vía IM. Cuando los datos se expresan como proporción de IFN- γ /IL-4 (Figura 23C, 27C y 29C) para reflejar la influencia de T_H1/T_H2 , los análogos de α -GalCer aromáticos C11, C13, C16 y C14 de origen bacteriano generaron menos respuestas T_H2 que C1 a las 2 horas por vía IV, y todos los análogos de α -GalCer indujeron respuestas influidas por T_H1 durante el período de 18-72 horas, como se muestra en las Figuras 23C, 27C y 29C. Además, cuando se administraron por la vía SubQ, todos los análogos de α -GalCer ensayados mostraron una mayor proporción de T_H1/T_H2 de C1 durante todo el período de 2-72 horas, excepto los análogos de α -GalCer C2 y C3. Por otro lado, cuando se administraron por inyección IM, todos los análogos de α -GalCer mostraron una respuesta influida por T_H2 a las 2 horas, que volvió a cambiar a una respuesta más influida por T_H1 durante el período de 18-72 horas excepto para C14. Este último mostró una respuesta más influida por T_H1 a las 2 horas y el resto de influencia de T_H1 durante todo el período de 2-72 horas. En otro punto de vista, la Figura 24 muestra los niveles en suero de ratón de (A) IFN- γ secretado, (B) IL-4 secretado y (C) Proporción secretada de IFN- γ /IL-4 a las 2 y 18 h después de la administración IV de los análogos de α -GalCer indicados.

Junto con IFN- γ e IL-4, otras citocinas y quimiocinas también aumentaron significativamente en los sueros en respuesta a estos análogos de α -GalCer. Estos incluyen IL-2, IL-6, KC, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, TNF α , RANTES, MCP-1 y MIP-1, que se enumeran en la tabla de la Figura 25. En la administración IV, estos análogos de α -GalCer provocan una mayor respuesta de citocinas y quimiocinas influida por T_H1 que C1. Por ejemplo, los análogos de α -GalCer aromáticos C11, C13 y C16 inducen aumentos notables en IL-2, IL-12, MIP-1 β y MCP-1, y C14 mostró mayores inducciones de IL-3, GM-CSF e IL-12.

Para determinar las poblaciones de células inmunes en los bazo de ratones BALB/c inyectados con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados, se inyectaron a los ratones BALB/c y luego se examinaron 72 horas después de la inyección. Como se muestra en la Figura 26, después de la administración IV, todos los análogos de α -GalCer ensayados indujeron la expansión significativa de (A) esplenocitos, mostrando C9, C13 y C16 una mayor potencia que C1; (B) DC, (C) NK, (D) NKT, (E) linfocitos B, (F) linfocitos T CD8 $^+$, (G) linfocitos T CD4 $^+$ y (H) proporciones de CD8 $^+$ /CD4 $^+$ activadas. Como se muestra en las Figuras 28, después de la administración SubQ, ninguno de los análogos de α -GalCer ensayados mostró un efecto significativo en la expansión de (A) los esplenocitos, en comparación con la de C1. Como se muestra en las Figuras 30, después de la administración IM, todos los análogos de α -GalCer ensayados indujeron la expansión de (A) los esplenocitos, teniendo C9, C13 y C14 mayores efectos que C1. Los análogos de α -GalCer aromáticos C12, C13 y C16 indujeron aumentos significativamente mayores de las DC totales y maduras que C1 (Figuras 26B, 28B y 30B). Los análogos de α -GalCer C9, C12, C13 y C16 mostraron una la mejor capacidad de expansión/activación de los NK y los NKT (Figuras 26C-D, 28C-D y 30C-D). El análogo de α -GalCer C16 fue más eficaz en la expansión de los linfocitos B, y los análogos de α -GalCer C2, C9, C10 y C11 también fueron más activos que C1 (Figuras 26E, 28E y 30E). Para los linfocitos T CD8 $^+$, el análogo de α -GalCer C14 fue más eficaz en la expansión/activación de células, aunque los análogos de α -GalCer C9, C11, C16, C12 y C13 también fueron más activos que C1 (Figuras 26F, 28F y 30F). El análogo de α -GalCer C9 fue más eficaz en la expansión/activación de los linfocitos T CD4 $^+$ que C1 (Figuras 26G, 28G y 30G). Entre las subpoblaciones de linfocitos T, todos los análogos de α -GalCer ensayados indujeron un aumento de la proporción de CD8 $^+$ /CD4 $^+$, siendo lo análogos de α -GalCer C11, C13, C14 y C16 más potente que C1 (Figuras 26H, 28H y 30H). En los ratones tratados con los análogos de α -GalCer por vía SubQ, el análogo de α -GalCer C9 indujo una expansión significativamente mayor de las DC totales y maduras que C1, mientras que el resto de análogos de α -GalCer fueron comparables con C1 (Figura 28B). Para la expansión/activación de los NK y NKT, los análogos de α -GalCer C9, C11, C13, C14 y C16 mostraron actividades comparables con C1, y el resto de análogos de α -GalCer parecieron menos activos (Figura 28C-D). Para la expansión/activación de linfocitos B, los análogos de α -GalCer C1, C9, C11 y C13 mostraron actividades significativas (Figura 28E). Para los linfocitos T CD8 $^+$, los análogos de α -GalCer C9, C11, C13, C14 y C16 mostraron más actividad que C1, y el resto de análogos de α -GalCer parecieron tener actividades comparables a C1 (Figura 28F). Para los linfocitos T CD4 $^+$, C1 fue más eficaz, aunque los análogos de α -GalCer C9, C11, C13, C14 y C16 también fueron más activos frente al control (Figura 28G). Para los linfocitos T, la mayoría de los análogos de α -GalCer ensayados provocó un mayor aumento de la proporción de CD8 $^+$ /CD4 $^+$ que C1 (Figura 28H). Cuando los análogos de α -GalCer se introdujeron por vía IM, todos indujeron aumentos significativos en DC, NK, NKT, linfocitos B y la proporción de CD8 $^+$ /CD4 $^+$. La mayoría de los nuevos análogos de α -GalCer provocó una mayor expansión de las DC que C1 (Figura 30B). Los análogos de α -GalCer C9 y C4 mostraron una inducción más potente de los linfocitos NK (Figura 30C) de C1, pero efectos comparables o inferiores sobre los linfocitos NKT (Figura 30D). Los análogos de α -GalCer C2, C11, C12 y C16 mostraron activaciones más potentes de los linfocitos B que C1 (Figura 30E). Para los linfocitos T CD8 $^+$, los análogos de α -GalCer C9 y C16 mostraron actividades comparables a C1 en la expansión/activación celular, y el resto de análogos de α -GalCer indujo aumentos significativos frente al control (Figura 30F). Para los linfocitos T CD4 $^+$, los análogos de α -GalCer C2 y C9 mostraron actividades comparables a C1 en la expansión/activación celular, y el resto de análogos de α -GalCer indujo aumentos significativos frente al control (Figura 30G). Los análogos de α -GalCer C9, C11 y C16 mostraron actividades similares a C1 en la elevación de la proporción de CD8 $^+$ /CD4 $^+$ (Figura 30H).

La Figura 31 muestra los efectos de la vía de administración de análogos de α -GalCer sobre la cinética de las

citocinas y la expansión/activación de los esplenocitos. La Figura 31(A-C) muestra la cinética de las citocinas en respuesta al vehículo DMSO, α -GalCer o análogo de α -GalCer C16 administrados por diferentes vías. Se administró por inyección a ratones BALB/c vehículo, C1 o C16 (2 μ g por ratón) IV, SubQ o IM. Las muestras de suero recogidas a las 0, 2, 18, 36, 48, 72 h se ensayaron en cuanto a las citocinas: (A) IFN- γ , (B) IL-4 y (C) la proporción de IFN- γ con respecto a IL-4, normalizado con respecto al vehículo DMSO. La Figura 31(D-K) muestra la expansión/activación de los esplenocitos en respuesta al vehículo, C1 y C16 administrados por diferentes vías. Se extrajo el bazo de ratones BALB/c 72 h después de la inyección de C1, C16 (2 μ g por ratón) o vehículo IV, SubQ o IM. (D) muestra el número total de células nucleadas, (E-G) muestran la población de células inmunes innatas incluyendo las células dendríticas maduras (CD11C⁺/CD80⁺/CD86⁺), NK activados (U5A2⁺13Ag/CD3⁺/CD69⁺), NKT activados (U5A2⁺13Ag/CD3⁺/CD69⁺), (H-J) muestran las células inmunes adaptativas incluyendo los linfocitos B activados (CD45R⁺/CD23⁺/CD69⁺), linfocitos T CD8 activados (CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺/CD69⁺) y los linfocitos T CD4 activados (CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺/CD69⁺), (K) muestra la proporción de CD8/CD4, normalizado con respecto a DMSO. **p < 0,05, en comparación con C1.

Como se describe en el presente documento, se administraron los análogos de α -GalCer a ratones a diversas dosis para determinar si era perceptible una dosis-respuesta para la expansión/activación de los esplenocitos. Como se muestra en la Figura 32A-H, se extrajo el bazo de ratones BALB/c 72 h después de la inyección IV de vehículo o análogo de α -GalCer C11 (2 o 0,1 μ g por ratón). (A) muestra el número total de células nucleadas, (B-H) muestran la población de células inmunes innatas incluyendo DC maduras (CD11C⁺/CD80⁺/CD86⁺), NK activados (U5A2⁺13Ag⁺/CD3⁺/CD69⁺), NKT activados (U5A2⁺13Ag⁺/CD3⁺/CD69⁺), monocitos (CD11b⁺Gr1⁺), granulocitos (CD11b⁺Gr1⁺); (F-H) muestran células inmunes adaptativas incluyendo linfocitos T CD4 activados (CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺/CD69⁺), linfocitos T CD8 activados (CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺/CD69⁺) y linfocitos B activados (CD45R⁺/CD23⁺/CD69⁺). *, p < 0,05, en comparación con DMSO, #, p < 0,05, en comparación con C11 (2 μ g por ratón).

Como se describe en el presente documento, se evaluó la cinética de las citocinas T_H1/T_H2 inducidas por diversos análogos de α -GalCer (Figura 33). Se aplicaron por inyección IV a ratones BALB/c vehículo, C1 o los análogos de α -GalCer indicados (véase A, 0,1 μ g por ratón). Se recogieron las muestras de suero a 0, 2, 12, 24, 48 y 72 h, y luego se evaluaron para las secreciones de (B) IFN- γ , (C) IL-4 y (D) la proporción de IFN- γ con respecto a IL-4, normalizado con respecto al control de DMSO. Estos potentes análogos de α -GalCer generaron citocinas/quimiocinas como puede verse en la tabla de la Figura 34 que muestra las muestras de suero recogidas a las 2 y 18 horas. Se administraron los análogos de α -GalCer de la presente divulgación IV a ratones BALB/c de tipo silvestre (WT) y con CD1d desactivado (CD1KO) (a 0,1 μ g por ratón), véase la Figura 35. Se recogieron las muestras de suero a las 2 y 18 horas, y luego se analizaron en cuanto a las citocinas/quimiocinas, incluyendo (A) IFN- γ , (B) IL-4, (C) proporción de IFN- γ /IL-4, (D) IL-10, (E) IL-12p70, (F) KC y (G) MCP-1. *, p < 0,05, en comparación con DMSO. Los resultados indican que los análogos de α -GalCer generan secreción de citocinas/quimiocinas dependiente de CD1 en ratones.

La Figura 36 muestra la expansión/activación de esplenocitos y la activación dependiente de CD1d de dos subconjuntos de NKT después de la inyección con diversos análogos de α -GalCer. (A-F) muestran la expansión/activación de esplenocitos en respuesta a los análogos de α -GalCer ensayados. Se extrajo el bazo de ratones C57BL/6 72 h después de la inyección IV de vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados (0,1 μ g por ratón). (A) muestra el número total de células nucleadas, (B-F) muestran la población de células dendríticas maduras (CD11C⁺/CD80⁺/CD86⁺), NK activados (NK1.1⁺/CD3⁺/CD69⁺), linfocitos T CD4 activados (CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺/CD69⁺), linfocitos T CD8 activados (CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺/CD69⁺) y la proporción de CD8/CD4, normalizado con respecto a DMSO. *, p < 0,05, en comparación con DMSO. (G-H) muestran la expansión dependiente de CD1 de dos subconjuntos de NKT. Se extrajo el bazo de ratones C57BL/6 de tipo silvestre (WT) o con CD1 desactivado (CD1KO) 72 h después de la inyección IV de vehículo, C1, 7DW8-5, C22, C23, C26, C34 (siendo C34 de la presente invención) y C17, 0,1 μ g por ratón. (G) muestra la determinación de los NKT de ratón por citometría de flujo (panel izquierdo inferior). En el tipo silvestre WT, se advirtió un aumento del número total de NKT (panel superior izquierdo) y sus dos subtipos que incluyen NKT de tipo II (CD3⁺/NK1.1⁺/CD49⁺/CD69⁺) (panel superior derecho) y NKT de Tipo I (CD3⁺/NK1.1⁺/CD49⁺/CD69⁺) (panel inferior derecho) mediante FACS. (H) muestra el número total de NKT en ratones CD1KO y (I) muestra el número total de linfocitos Treg (CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺) en ratones C57BL/6 en respuesta a los análogos de α -GalCer. *, p < 0,05, en comparación con DMSO; #, p < 0,05, en comparación con C1.

INMUNOTERAPIA

El sistema inmune evita eficazmente que nuestro organismo sea derrotado gracias al aclaramiento de los gérmenes. Sin un sistema inmune eficaz, las personas están sujetas a desarrollar todo tipo de infecciones de bacterias, virus, protozoos, parásitos y hongos. También son más propensas a desarrollar cáncer. Gracias al papel regulador de los NKT en el sistema inmune, estos son dianas atractivas para la inmunoterapia. Paradójicamente, la activación de los NKT puede conducir bien a la supresión o a la estimulación de las respuestas inmunes. Por ejemplo, se cree que la producción de citocinas T_H1 se correlaciona con las actividades antitumorales, antivirales/antibacterianas y adyuvantes, mientras que se cree que la producción de las citocinas T_H2 reduce las enfermedades autoinmunes.

INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL

Se sabe ahora que existe una firme conexión entre el sistema inmune y el cáncer, y que mediante la estimulación adecuada del sistema inmune, existe la posibilidad de combatir muchos tipos de cáncer. El tratamiento de ratones con α -GalCer ha mostrado suprimir la metástasis tumoral hacia el hígado, el pulmón y los ganglios linfáticos. En dos ensayos clínicos de fase I realizados en pacientes con cánceres avanzados que recibieron por inyección α -GalCer o iDC cargadas con α -GalCer, se observó una activación distinta del sistema inmune en los pacientes que tenían un número detectable de NKT V α 24⁺V β 11 antes del tratamiento. Aunque no hubo una regresión del tumor duradera, se observó la estabilización de la enfermedad en varios pacientes, sin ninguna toxicidad, y algunos pacientes incluso mostraron una reducción transitoria de los marcadores tumorales en suero o del tamaño del tumor. La falta de actividad anticancerígena significativa de α -GalCer en varios ensayos clínicos se puede deber al efecto de IFN- γ (una citocina T_H1) contrarrestado por IL-4 (una citocina T_H2), dando lugar a un beneficio neto nulo.

Como se describe en el presente documento, los análogos de α -GalCer sintéticos tienen uso como agentes activos de inmunoterapia antitumoral. Los análogos de α -GalCer se pueden diseñar de modo que sean influidos por T_H1. Estos análogos de α -GalCer influidos por T_H1 son capaces de provocar una respuesta de las citocinas T_H1, aumentar el tiempo de supervivencia de los animales que padecen cáncer, ralentizar el crecimiento tumoral en animales que padecen cáncer y aumentar los linfocitos infiltrantes en el tumor, incluyendo los linfocitos T, CD8T, NK y NKT.

Como se describe en el presente documento, los análogos de α -GalCer actúan como fármacos terapéuticos en la inmunoterapia antitumoral. Los análogos de α -GalCer se pueden administrar como vacunas contra el cáncer. Como se describe en el presente documento, los análogos de α -GalCer se pueden usar en la inmunoterapia combinada, donde los análogos de α -GalCer se combinan con una vacuna contra el cáncer ya existente. Un sujeto tratado con cualquiera de los análogos de α -GalCer puede padecer cáncer, puede estar en alto riesgo de padecer cáncer o puede tener precursores precancerosos.

También se describe en el presente documento una inmunoterapia antitumoral que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto o una sal o una mezcla de los mismos a un sujeto, estando el compuesto seleccionado del grupo que consiste en 03, C10-C17, C19-C28, C34 (siendo C34 de la presente invención) y C8-5.

Para determinar la eficacia contra el cáncer de los análogos de α -GalCer, se estudiaron modelos de ratón de cáncer de pulmón metastásico con la línea celular TC1 y el modelo de tumor SubQ de cáncer de mama con la línea celular 4T1 en ratones inmunocompetentes singénicos (C57BL/6 y BALB/c, respectivamente). La Figura 38A muestra el resultado de un experimento representativo con la reducción del número de nódulos tumorales sobre la superficie pulmonar de ratones tratados con el análogo de α -GalCer C11. En la Figura 37, se muestran los efectos de la administración IV de diversos análogos de α -GalCer de los grupos I-IV y C1 en la supervivencia de ratones portadores de tumores TC1. Se observaron la prolongación significativa de la supervivencia y la pérdida de peso reducida con muchos de los análogos de α -GalCer ensayados, a excepción de C4, C6, C7, C8 y C17. Además, ocho de los análogos de α -GalCer ensayados, C3, C10, C11, C12, C13, C14, C15 y C16, tienen eficacia contra el cáncer significativamente mayor que C1. A continuación, se evaluó la eficacia antitumoral de ocho análogos de α -GalCer y C1 administrados IV en ratones portadores de cáncer de mama 4T1. En la Figura 38B, se muestra el tamaño del tumor reducido de los ratones 16 días después del tratamiento con el análogo de α -GalCer C11 como un ejemplo. Todos los análogos de α -GalCer ensayados fueron capaces de suprimir el crecimiento tumoral y de prolongar la supervivencia en comparación con el control, y todos fueron más eficaces que C1, Figura 39A. Basándose en estos hallazgos, se ensayó el efecto de la administración SubQ de algunos de los análogos de α -GalCer más activos (C9, C11, C13, C14, C16) y C1. La administración SubQ de los análogos de α -GalCer ensayados pudo suprimir el crecimiento tumoral y prolongar la supervivencia en comparación con el control. Los análogos de α -GalCer C13, C14 y C16 lograron una supresión significativamente mayor del tamaño del tumor que C1, aunque sus efectos sobre la supervivencia no se diferenciaron significativamente de los de C1 (Figura 39B). C1 mostró una eficacia estadísticamente mejor con la administración SubQ frente a la vía IV (Figura 40), mientras que la vía de administración no afectó significativamente a los efectos antitumorales del resto de análogos de α -GalCer ensayados (Figura 39A-B). Los ratones que recibieron una inyección SubQ de los análogos de α -GalCer parecieron estar menos mórbidos que aquellos tratados por vía IV, lo que coincide con niveles en suero más bajos de las citocinas/quimiocinas tras la administración SubQ.

Para optimizar el protocolo terapéutico de estos nuevos análogos de α -GalCer, se evaluó la eficacia contra el cáncer en ratones portadores de tumores, con especial atención a las vías, la frecuencia y la dosis de administración (véanse las Figuras 41-44). Los resultados mostraron una pauta de dosificación óptima en la administración IV de 0,1 μ g de α -GalCer por los ratones, una vez a la semana. Esto es aplicable al tratamiento de los ratones portadores de cáncer de mama y de pulmón, así como de melanoma (véanse las Figuras 43 y 44). El tratamiento con análogos de α -GalCer produjo un aumento en los linfocitos de infiltración tumoral, incluyendo los linfocitos T, CD8T, NK y NKT (véase, Figura 45). Las Figuras 41A-B muestran los impactos de las diferentes vías de administración. (A) los

ratones BALB/c recibieron por inoculación SubQ células de cáncer de mama de ratón 4T-1. Tres días después de la inoculación del tumor, los ratones se trataron (IV o SubQ) con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados (2 μ g por ratón) dos veces a la semana durante cuatro semanas. Se registró el volumen del tumor cada 3 días durante 33 días y se monitorizó la supervivencia durante un máximo de 70 días. *Panel de la izquierda*, curva de supervivencia de Kaplan Meier de ratones portadores de cáncer de mama; *panel de la derecha*, curva de crecimiento tumoral (B) se aplicaron a ratones C57BL/6 por inoculación IV células de cáncer de pulmón de ratón TC-1, y luego se trataron (IV o SubQ) con el vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados (2 μ g por ratón) dos veces a la semana durante cuatro semanas. *Panel de la izquierda*, curva de supervivencia de Kaplan Meier de ratones portadores de cáncer de pulmón; *panel de la derecha*, cambios en el peso corporal.

(C) muestra los impactos de la frecuencia de administración. Se aplicaron a ratones C57BL/6 por inoculación IV células de cáncer de pulmón de ratón TC-1, y después se trataron (IV o SubQ) con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados (2 μ g por ratón) dos veces a la semana o una vez a la semana durante cuatro semanas. *Panel de la izquierda*, curva de supervivencia de Kaplan Meier de ratones portadores de cáncer de pulmón; *panel de la derecha*, cambios en el peso corporal.

Las Figuras 43 y 44 muestran la evaluación de la eficacia contra el cáncer de los análogos de α -GalCer con el protocolo optimizado. La Figura 43 muestra la inoculación en ratones C57BL/6 de células de cáncer de pulmón (TC1) IV o de melanoma (B16) SubQ y después el tratamiento IV (0,1 μ g por ratón) con el vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados (C23, C26, C34 (siendo C34 de la presente invención), 7DW8-5) una vez a la semana durante cuatro semanas. (A) muestra la curva de supervivencia de Kaplan Meier de ratones portadores de TC1; (B) muestra curvas de crecimiento del tumor B16. Todos los análogos de α -GalCer ensayados mostraron un aumento significativo en el tiempo de supervivencia de los ratones portadores de TC1. Además, cuando se trataron los ratones portadores de B16 con los análogos de α -GalCer, hubo una disminución significativa en el tamaño de los tumores. Las Figuras 44(A-B) muestran la evaluación en tiempo real del crecimiento tumoral en ratones. Los ratones C57BL/6 recibieron por inoculación SubQ (A) células de cáncer de pulmón (TC1-GFP-luciferasa) o (B) células de cáncer de mama (4T1-GFP-luciferasa), y después se trataron IV (0,1 μ g por ratón) con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados (C23, C34 (siendo C34 de la presente invención), 7DW8-5 y C17) una vez a la semana durante cuatro semanas. Se evaluó el píxel de la bioluminiscencia del tumor *in vivo* y se calculó mediante el sistema IVIS. *Panel de la izquierda*, datos cuantitativos de la bioluminiscencia; *Panel de la derecha*, imágenes representativas de los ratones portadores de tumor. *, $p < 0,05$, en comparación con DMSO; #, $p < 0,05$, en comparación con C1. En los ratones inoculados con cáncer de pulmón, los análogos de α -GalCer C34 (siendo C34 de la presente invención), C23 y C8-5 mostraron una disminución significativa en el crecimiento tumoral en comparación con el control y α -GalCer. Curiosamente, estos análogos de α -GalCer C34 (siendo C34 de la presente invención), C23 y C8-5, todos han demostrado producir una respuesta afectada por T_H1 , como se muestra en los resultados anteriores. En los ratones inoculados con cáncer de mama, el análogo de α -GalCer C8-5 mostró una disminución significativa en el crecimiento tumoral en comparación tanto con el control como con α -GalCer. El análogo de α -GalCer C17 mostró una disminución significativa en el crecimiento tumoral en comparación con el control, pero tuvo un resultado similar a α -GalCer. Curiosamente, el análogo de α -GalCer C17 se mostró producir una respuesta influida por T_H2 , como se muestra en los resultados anteriores. Estos resultados confirman la idea de que se cree que la producción de las citocinas T_H1 se correlaciona con actividades antitumorales.

La Figura 45 muestra, en una realización ilustrativa, cómo los análogos de α -GalCer provocan linfocitos de infiltración tumoral influidos por T_H1 en tumores de pulmón y melanoma. (A-D) muestran linfocitos de infiltración tumoral en el cáncer de pulmón. Se tiñeron suspensiones de células individuales de tumores extirpados el día 21 de los ratones C57BL/6 portadores de tumor TC1 tratados con vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados (C23, C34 (siendo C34 de la presente invención), C8-5; 0,1 μ g/ratón, una vez/semana) para (A) linfocitos T CD3⁺, (B) linfocitos T CD8 (CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺), (C) NK (NK1.1⁺/CD3) y (D) NKT (NK1.1⁺/CD3⁺), normalizado con respecto a DMSO. El análogo de α -GalCer C34 (de la invención), mostró un aumento significativamente significativo en el número de linfocitos infiltrantes de tumor influidos por T_H1 en el cáncer de pulmón, en comparación tanto con el control como con α -GalCer. Los análogos de α -GalCer C23 y C8-5 también mostraron un aumento significativamente significativo en el número de linfocitos infiltrantes de tumores en el cáncer de pulmón, en comparación con el control (para los linfocitos T CD3⁺) y en comparación tanto con el control como con α -GalCer (para los linfocitos T CD8, NK y NKT). (E-H) muestran linfocitos de infiltración tumoral en el melanoma. Se tiñeron suspensiones de células individuales de tumores extirpados el día 21 de ratones C57BL/6 portadores de melanoma B16 tratados con el vehículo, α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados (C23, C34, C8-5; 0,1 μ g/ratón, una vez/semana), para (E) linfocitos T CD3⁺, (F) linfocitos T CD8 (CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺), (G) NK (NK1.1⁺/CD3) y (H) NKT (NK1.1⁺/CD3⁺) y normalizado con respecto a DMSO. Todos los análogos de α -GalCer C23, C8-5 y C34 (siendo C34 de la presente invención) mostraron un aumento muy significativo en el número de linfocitos de infiltración tumoral influidos por T_H1 en el melanoma, en comparación tanto con el control como con α -GalCer. *, $p < 0,05$, en comparación con DMSO; #, $p < 0,05$, en comparación con C1.

INMUNOTERAPIA ADYUVANTE

Efectos adyuvantes en inmunógenos de péptido, proteína, polisacárido y ADN

Los adyuvantes son compuestos que, cuando se combinan con un antígeno, potencian una respuesta inmune en una especie inmunizada. Durante más de ochenta años, los adyuvantes se han usado para reforzar la eficacia de las vacunas. Las vacunas vivas, que contienen formas debilitadas de un organismo infeccioso, por lo general, funcionan bien por sí mismas. Pero las vacunas que contienen organismos muertos (vacunas inactivadas) o fragmentos de organismos infecciosos o sus toxinas (vacunas acelulares o recombinantes) generalmente necesitan adyuvantes para reforzar su eficacia. En la mayoría de los casos, el tipo de respuesta inducida (tipo 1 o tipo 2) tiene un impacto significativo sobre la eficacia protectora de la vacuna. Hay adyuvantes alternativos que tienden a favorecer determinados tipos de respuestas. Sin embargo, la selección del adyuvante se complica por hechos funcionales impredecibles, así como por restricciones comerciales y de disponibilidad.

Las sales de aluminio, conocidas como alumbre, son el único adyuvante aprobado para su uso en Estados Unidos para las vacunas preventivas habituales. Sin embargo, las sales de aluminio han mostrado aumentar en los seres humanos, así como en los animales, exclusivamente un cambio hacia las respuestas de tipo T_H2 (por ejemplo, producción de IL-4). La incapacidad de las sales de aluminio para provocar respuestas inmunes mediadas por células T_H1 (por ejemplo, producción de IFN- γ) es una importante limitación de su uso como adyuvante. En particular, para las vacunas contra infecciones virales y bacterianas intracelulares, la falta de respuestas citotóxicas de linfocitos T es fatal.

Los análogos de α -GalCer se pueden sintetizar de manera que se inicie una respuesta inmunogénica influida por T_H1 . Por lo tanto, usando los análogos de α -GalCer como adyuvantes, se pueden conseguir mejores vacunas que muestren una respuesta inmune dirigida de tipo T_H1 o vacunas que también permitan (además de una respuesta de tipo T_H2) un cambio de tipo T_H1 de la reacción inmune. Como tales, uno o más análogos de α -GalCer se administran como adyuvantes junto con la administración de una vacuna. Por otra parte, las vacunas ya disponibles se pueden proporcionar en una forma mejorada cuando se añaden los análogos de α -GalCer a las mismas, lo que permite la inducción de una respuesta de tipo T_H1 .

También se describe en el presente documento una vacuna que comprende una cantidad eficaz de un compuesto o una sal o una mezcla de los mismos seleccionado del grupo que consiste en C3, C11, C13-C14, C16-C18, C20, C22-C24, C26, C8-5 y C8-6; y un agente vacunal. En algunos casos, el agente vacunal se selecciona del grupo que consiste en un microorganismo muerto, un microorganismo viral vivo atenuado, un toxoide y un fragmento de un microorganismo inactivado o atenuado. En algunos casos, el microorganismo es una bacteria o un hongo. En algunos casos, se trata del toxoide tetánico o diftérico. En algunos casos, el agente vacunal es capaz de provocar una respuesta inmune en un sujeto a quien se administra la vacuna. En algunos casos, el compuesto actúa como un adyuvante inmunológico y es capaz de modificar o aumentar la respuesta inmune provocada por el agente vacunal estimulando el sistema inmune que da lugar a una respuesta más enérgica del sujeto a la vacuna que sin el compuesto.

En un aspecto, las vacunas apropiadas pueden comprender inmunógenos de péptido, de proteína, de polisacárido o de ADN. En otro aspecto, la vacuna se puede seleccionar entre una o más vacunas disponibles en el mercado tales como, pero sin limitación, vacunas contra la hepatitis A, hepatitis B, rotavirus, difteria, tétanos, pertussis, gripe por Haemophilus de tipo b, neumocócica, poliovirus, gripe, sarampión, paperas, rubéola, varicela, meningocócica, virus del papiloma humano, herpes zóster, *Borrelia burgdorferi*, fiebre tifoidea, encefalitis japonesa, rabia, encefalitis transmitida por garrapatas, cólera, fiebre amarilla, virus H5N1, virus del Nilo Occidental, parvovirus, rinotraqueitis felina, calicivirus, virus de la panleucopenia, *Chlamydia psittaci*, leucemia felina, moquillo, adenovirus canino, virus paragripal canino, *Bordetella bronchiseptica*, coronavirus canino, *Giardia lamblia*, *Leptospira bacterin*, virus infeccioso de rinotraqueitis bovina, virus paragripal 3, virus sincitial respiratorio bovino, virus de la diarrea viral bovina, *Clostridium chauvoei*, *Septicum haemolyticum*, *Septicum novi*, tétanos, *Sordellii perfringens*, *Moraxella bovis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

También se describe un método para aumentar la inmunogenicidad de un compuesto, de una composición o de una vacuna en un sujeto, incluyendo el método: administrar al sujeto un compuesto, una composición o una vacuna que comprende además un adyuvante de acuerdo con la presente divulgación, en el que el adyuvante potencia la inmunogenicidad del compuesto, de la composición o de la vacuna.

Efecto adyuvante en vacunas de proteínas

Se ensayaron α -GalCer y los análogos de α -GalCer para determinar su capacidad de mejorar la respuesta inmune a la vacuna a base de proteínas existentes, tal como la toxina inactivada del toxoide tetánico (TT). Los ratones fueron vacunados TT sin o con análogos de α -GalCer el día 0 y el día 28. Se extrajo suero semanalmente para determinar los anticuerpos específicos anti-TT. La Figura 46A muestra los efectos adyuvantes de los análogos de α -GalCer en la respuesta de los anticuerpos a TT. Como se muestra en la Figura 46A, la producción de anticuerpo IgG específico anti-TT fue reforzada por α -GalCer (C1) y el análogo de α -GalCer C11. Aunque la cinética de la producción de anti-

TT fue similar a la inducida por el adyuvante de alumbre convencional ("Alum"), C1 generó una producción significativamente mayor de anticuerpos que Alum. Cuando se combinó TT + Alum convencional con C1 o C11, la respuesta de los anticuerpos se aumentó aún más hasta ~2 veces de la vacuna convencional. Estos hallazgos indican que C1 y C11 tuvieron efectos adyuvantes que fueron sinérgicos con el alumbre para aumentar aún más la respuesta inmune. Los efectos adyuvantes del análogo de α -GalCer C11 fueron notablemente duraderos. Veinte semanas después de la segunda inmunización, una dosis de refuerzo de solo TT (sin alumbre ni análogo de α -GalCer C11) en ratones condujo a un rápido aumento de anticuerpo anti-TT 1 semana después. La Figura 46B muestra los efectos del análogo de α -GalCer C11 en el refuerzo antigénico retardado veinte semanas después de la segunda vacunación. El nivel de anticuerpo en ratones tratados con C1 o C11 fue el doble de elevado que los que recibieron TT + Alum, y más de 25 veces superior al de los inyectados solo con TT como se muestra en la Figura 46B. Estos resultados sugirieron que el C1 o el análogo de α -GalCer C11 tienen efectos sobre los linfocitos T y B de memoria que conducen a un aumento de la respuesta inmune de refuerzo.

Efecto adyuvante en vacunas de péptidos

Se evaluaron los efectos adyuvantes con la vacuna de péptido que contiene el dominio extracelular de la proteína M2 del subtipo H1N1 del virus de la gripe A. La secuencia de aminoácidos de la vacuna de péptido fue MSLLETVETPIRNEWGCRN. Se vacunaron ratones BALB/c hembra con 5 o 45 μ g de péptido M2e sin o con diversos análogos de α -GalCer (C9, C11, C14, C17) en las semanas 0, 3 y 6. La Figura 47 muestra los efectos adyuvantes de diversos análogos de α -GalCer en la vacuna de péptido M2e. Como se muestra en la Figura 47, dos semanas después de la tercera inmunización, el péptido M2e solo indujo un título de IgG específico anti-M2e de $1,8 \times 10^5$ y $5,4 \times 10^5$ para la administración de 5 y 45 μ g de antígeno, respectivamente. Cuando se combinaron con análogos de α -GalCer, se obtuvieron títulos de anticuerpos anti-M2 de 10 a 30 veces mayores. Entre los análogos de α -GalCer ensayados, C11 tuvo el mejor efecto adyuvante, que fue equivalente al adyuvante completo de Freund (CFA), pero un título 3 veces superior que C1. El resto de los análogos de α -GalCer (C09, C14 y C017) fueron equivalentes a C1. Estos hallazgos sugieren que α -GalCer y sus análogos tienen potentes actividades adyuvantes para los antígenos peptídicos, siendo los más potentes los que contienen anillo aromático en la cola acilo, tales como C11.

Efecto adyuvante en vacunas de ADN

Se preparó una construcción de ADN de H5 (pHA) como un plásmido que contenía toda la secuencia consenso de H5 del virus de la gripe aviar. En resumen, con el fin de cubrir la variabilidad genética e inducir, así, una protección cruzada a través de las diferentes cepas H5N1, se dedujo una secuencia consenso de HA a partir del gen HA de 500 cepas del virus H5N1, y se usó en un esfuerzo de desarrollar una vacuna. Las secuencias de consenso de HA se construyeron en un vector pVAX como candidatos de vacunas de ADN, basándose en una estrategia similar para ADVAX, una vacuna de ADN para el VIH, desarrollada por Ho *et al.* (Jin *et al.*, (2002) *J. Virol.* 76 (5): 2306-2216). En la Figura 48A, se muestran los efectos de la administración de la vacuna de ADN H5 (pHA) sin y con α -GalCer (C1) sobre los títulos de anti-H5 en ratones tres semanas después de la primera inmunización. La inmunización de ratones con 5-45 μ g de vacuna de ADN de H5 sin o con α -GalCer mostró que las respuestas anti-H5 fueron mejoradas por α -GalCer a 5-30 μ g de ADN de H5, pero que alcanzaron una meseta a 45 μ g. La Figura 48B muestra los efectos de una dosis baja de vacuna de ADN de H5 y un α -GalCer (C1) sobre los títulos anti-H5 dos semanas después de la segunda inmunización. Cuando la dosis de ADN de H5 se redujo hasta 0,2-5 μ g, el efecto adyuvante de α -GalCer fue evidente para todas las dosis bajas ensayadas. Figura 48C muestra la protección contra la exposición viral a la cepa de la gripe reagrupada de Vietnam NIBRG-14 dos semanas después de la vacuna de ADN de H5 de baja dosis con o sin C1. Ninguno de los animales tratados con $< 2 \mu$ g sobrevivió a la exposición viral con DL₅₀ de 20 de NIBRG-14 sin α -GalCer, mientras que se observó una protección del 80 % entre los tratados con 0,2 a 1 μ g de pHA con α -GalCer (Figura 48C). Estos resultados confirman los efectos adyuvantes de α -GalCer cuando se usa con la vacuna de pHA a baja dosis en la inducción de inmunidad protectora contra NIBRG-14.

También se ensayaron otros análogos de α -GalCer como adyuvantes con la vacuna de pHA en ratones con un protocolo y una pauta similares a los usados anteriormente, y se observan diferencias. Se vacunaron ratones hembra BALB/C de 6-7 semanas de vida por electrotransferencia en el músculo con α -GalCer o los análogos de α -GalCer indicados con pHA y se reforzaron una vez con la misma formulación cuatro semanas más tarde. Se extrajeron muestras de sangre a las 2 semanas de la segunda vacunación y se ensayaron para determinar los títulos de anticuerpos IgG específicos anti-HA por ELISA. La Figura 49A muestra los títulos de anticuerpos IgG específicos anti-HA (AY3) en ratones después de la inmunización con 0,2 μ g de pHA sin o con α -GalCer o análogo de α -GalCer C3, C11, C13, C14 y C16. La Figura 49B muestra los títulos de anticuerpos IgG específicos anti-HA (AY4) en ratones después de la inmunización con 0,2 μ g de pHA sin o con α -GalCer o análogo de α -GalCer C10, C13, C18, C19 y C20. La Figura 49C muestra el porcentaje de supervivencia de los ratones después de la exposición viral anterior para algunos de los análogos de α -GalCer ensayados. La Figura 50A muestra el anticuerpo IgG específico anti-HA (AY4) tras la inmunización con 0,5 μ g de pHA y los análogos de α -GalCer indicados. La Figura 50B muestra el porcentaje de supervivencia después de la exposición viral como se describe anteriormente. La Figura 51 muestra el título en los ratones de los anticuerpos IgG específicos anti-HA (AY5) después de la inmunización con (A) 0,1 μ g

de pHA (pHA_{0,1} frente a pHA_{0,1} + C26: $p < 0,01$ en la prueba de Kruskal-Wallis ANOVA de una vía) o (B) 0,2 µg de pHA (pHA_{0,2} frente a pHA_{0,2} + C17: $p < 0,01$, pHA_{0,2} frente a pHA_{0,2} + C26: $p < 0,05$ en la prueba de Kruskal-Wallis ANOVA de una vía) y los análogos de α -GalCer indicados. La Figura 52 muestra el título en los ratones de los anticuerpos IgG específicos anti-HA (AY6) después de la inmunización con (A) 0,1 µg de pHA o (B) 0,2 µg de pHA y el análogo de α -GalCer indicado a 0,1 µg o 1 µg. Los análogos de α -GalCer particularmente eficaces como adyuvantes a dosis de pHA de 0,2 µg fueron C13, C17, C20 y C26.

La Figura 53 muestra los títulos en los ratones de los anticuerpos IgG específicos anti-HA (A) AY3, (B) AY4, (C) AY5 y (D) AY15 tras la inmunización con 0,2 µg de pHA y α -GalCer o el análogo de α -GalCer indicado C3, C10, C11, C13, C14, C16, C17, C18, C19, C20, C23, C24, C26, 7DW8-5 y alumbre. Los resultados indican que C1, C13, C14, C17, C26 y 7DW8-5 tuvieron las mejores actividades coadyuvantes que el resto en el aumento del título de anticuerpos. Para investigar si la respuesta de los linfocitos T CD8 específica de HA se vería reforzada por el uso de un análogo de α -GalCer como adyuvante, se siguió evaluando C1, C26 y 7DW8-5. Como se muestra en la Figura 54, las células secretoras de IFN- γ aumentaron en los grupos con adyuvante de análogo de α -GalCer. Además, tras la exposición al virus NIBRG-14, el porcentaje de supervivencia de los grupos con adyuvante C1, C26 y 7DW8-5 fue superior al de los grupos con adyuvante de alumbre o de solo pHA (Figura 55).

Los efectos adyuvantes de los análogos de α -GalCer también fueron evidentes después de una sola dosis de la vacunación de pHA. A las tres semanas de la inmunización con una dosis, el anticuerpo IgG específico anti-HA era mayor en los ratones tratados con C26 y C1 como adyuvante (Figura 56). Los ratones tratados con C1, C26 o 7DW8-5 fueron protegidos eficazmente contra la exposición letal al virus NIBRG-14, variando las tasas de supervivencia del 87,5 % al 100 % Estos hallazgos indican que C1, C26 y 7DW8-5 tienen buenas actividades adyuvantes en el escenario del procedimiento de vacunación individual.

Efecto adyuvante sobre inmunógenos de polisacáridos

Se había observado que Globo H, un hexasacárido (Fuc α 1 $\rightarrow$ 2Gal β 1- 3GalNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal α 1 $\rightarrow$ 4Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1), se sobreexpresa en una variedad de tumores de células epiteliales tales como en cánceres de colon, de ovario, gástrico, de páncreas, de endometrio, de pulmón, de próstata y de mama, con el uso de anticuerpos monoclonales MBR1 (1gM) y VK-9 (IgG3). En los tejidos normales, globo H se limita a la superficie apical de las células epiteliales del borde luminal, un sitio que parece no ser accesible para el sistema inmune. Por lo tanto, globo H es un antígeno diana ideal para la inmunoterapia del cáncer de mama y otros cánceres epiteliales.

Se evaluaron los efectos adyuvantes de α -GalCer y de los análogos de α -GalCer C23 y 7DW8-5 para la vacuna de globo H conjugado con toxoide diftérico (GH-DT). Los ratones BALB/c recibieron por inyección IM globo H-DT/ α -GalCer o globo H-DT/análogos de α -GalCer tres veces en intervalos de dos semanas. Se extrajeron sueros dos semanas después de la tercera vacunación y se analizaron para determinar los títulos de anticuerpo IgG e IgM específicos anti-globo H en dilución 1:480 y 1:240, respectivamente, usando una micromatriz de glucano. Como se muestra en la Figura 57A, GH-DT solo no indujo ningún anticuerpo anti-globo H, pero la adición que C1 o 7DW8-5 provocó una producción significativa de anticuerpos IgG. Por otro lado, la producción de 1gM solo se observó en los grupos tratados con adyuvante 7DW8-5, pero no en los grupos tratados con C1 (Figura 57B). En conclusión, la adición de C1 o 7DW8-5 a la vacuna GH-DT podría aumentar la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno de hidratos de carbono.

INMUNOTERAPIA ANTIMICROBIANA

Como se describe en el presente documento, un análogo de α -GalCer tiene uso, por ejemplo, en métodos de tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas como consecuencia, por ejemplo, de la presencia de agentes microbianos patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos multicelulares y proteínas aberrantes (priones).

En el presente documento se describe una inmunoterapia antimicrobiana para un sujeto que comprende: administrar una cantidad eficaz de un compuesto o de una sal o de una mezcla de los mismos a un sujeto, estando el compuesto seleccionado del grupo que consiste en C9, C11, C13-C16, C23 y C34 (siendo C34 de la presente invención).

Efectos antivirales:

Los fármacos antivirales son una clase de medicamentos usados específicamente para el tratamiento de infecciones virales. Como los antibióticos, los antivirales específicos se usan para virus específicos. Son relativamente inocuos para el receptor y, por lo tanto, se pueden usar para tratar infecciones. Solo hay fármacos antivirales disponibles para tratar unas cuantas enfermedades virales. Dos antivirales útiles son: los análogos nucleósidos y los interferones. Hay tres clases de interferones: los interferones alfa y beta y los interferones gamma. Los interferones α y β son citocinas que son secretadas por las células infectadas por virus. Estos se unen a receptores específicos en las células adyacentes y las protegen de la infección por virus. Estos forman parte de la respuesta de protección

inmediata del hospedador a la invasión de los virus. Además de estos efectos antivirales directos, los interferones alfa y beta también aumentan la expresión de las moléculas MHC de clase I y clase II en la superficie de las células infectadas, mejorando, de este modo, la presentación de antígenos virales a células inmunes específicas. Su presencia se puede observar en los fluidos corporales durante la fase aguda de la infección por virus. Ahora hay disponibles interferones alfa y beta recombinantes, y se han usado para el tratamiento de las infecciones crónicas por el virus de la hepatitis B y C. Sin embargo, los efectos secundarios tales como la fiebre, el malestar general y la pérdida de peso han limitado el uso. El interferón gamma (interferón inmune) es una citocina secretada por los linfocitos CD4 T_H1. Su función es la de aumentar las respuestas inmunes mediadas por linfocitos T específicos.

El mecanismo de acción de los interferones incluye: 1) el aumento de la respuesta inmune específica. Mediante el aumento de la expresión de moléculas MHC de clase I en la superficie de las células infectadas, los interferones aumentan la oportunidad de que los linfocitos T citotóxicos específicos reconozcan y destruyan las células infectadas; y 2) el efecto antiviral directo: a) la degradación del ARNm viral y b) la inhibición de la síntesis de proteínas, lo que impide la infección de nuevas células.

En un aspecto, los análogos de α -GalCer sintéticos tienen uso en el tratamiento antiviral y en la profilaxis de varios virus infecciosos. Los ejemplos de virus infecciosos para los que es deseable la estimulación de una respuesta inmune protectora, que se puede generar utilizando los NKT, las vacunas o las composiciones de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como el VIH-1 (también conocidos como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV o VIH-III; y otros aislados tales como VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus Cocksackie humanos, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, las cepas que causan la gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus paragripal, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Ungaviridae* B (por ejemplo, virus Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (erg, reovirus, orbiviruses y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus de polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simplex (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (virus variólico, virus vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A y no B (clase 1 = transmitidos internamente; clase 2 = transmitidos parenteralmente (es decir, hepatitis C); virus de Norwalk y virus relacionados, y astrovirus).

Exposición viral - Infección por el virus de la gripe H1N1

Tratamiento mediante inyección IP de análogos de α -GalCer

La Figura 58 muestra la supervivencia de los ratones a los 0 a 12 días de la infección por el virus de la gripe H1N1. Los ratones se trataron (inyección IP) con 2 μ g de α -GalCer (C1) o los análogos de α -GalCer C2, C3, C9, C11, C13, C14 y C16, y en comparación con el control de DMSO. Se ensayaron tres pautas de tratamiento diferentes. La Figura 58A muestra la tasa de supervivencia cuando se trataron ratones BALB/c a los 30 minutos de la exposición al virus H1N1. Los valores de p en comparación con el control fueron C1: 0,4554; C2: 0,5149; C3: 0,5764; C9: 0,5466; C11: 0,2031; C16: 0,0359. La Figura 58B muestra la tasa de supervivencia cuando se trataron ratones BALB/c partiendo dos semanas antes de la exposición al virus H1N1 (WSN). Los ratones fueron tratados 14 días antes, 10 días antes, 3 días antes, y a las 0,5 horas, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días y 12 días con 2 μ g (inyección IP) de control, α -GalCer (C1) o los análogos de α -GalCer. Cuando el tratamiento comenzó dos semanas antes de la exposición al virus y se administró dos veces a la semana, los ratones mostraron una supervivencia significativamente mayor mediante el tratamiento con todos los análogos de α -GalCer ensayados (C9, C11, C13 y C14). Los valores de p en comparación con el control fueron C1: 0,000116; C9: 0,000126; C11: 0,02627; C13: 0,00027 y C14: 0,000147. La Figura 59 muestra la proporción acumulada de supervivencia con ratones que fueron infectados con una dosis más alta del virus de la gripe H1N1. En la Figura 59A, se trataron ratones BALB/c comenzando dos semanas antes de la exposición al virus de la gripe H1N1 (WSN). Los ratones fueron tratados en 14 días antes, 10 días antes, 3 días antes, y a las 0,5 h, 2 días, 4 días y 6 días con 2 μ g (inyección IP) de control, α -GalCer (C1) o análogos de α -GalCer. El Grupo 1 es el grupo de control. El Grupo 6 fue tratado con α -GalCer (C1). El Grupo 7 fue tratado con el análogo de α -GalCer C13. El Grupo 8 fue tratado con el análogo de α -GalCer C14. El Grupo 9 fue tratado con el análogo de α -GalCer C16. El análogo de α -GalCer C16 mostró una supervivencia prolongada, indicativo de que C16 tiene un efecto antiviral directo.

Tratamiento mediante administración intranasal de análogos de α -GalCer

La Figura 59B muestra la proporción acumulada de la supervivencia con ratones infectados con H1N1. Se trataron ratones BALB/c por vía intranasal con el control, α -GalCer (C1) o los análogos de α -GalCer C13, C14 o C16 una hora antes de la exposición al virus H1N1 (WSN). C13 mostró una supervivencia prolongada, lo que sugiere efectos antivirales directos. En general, ciertos análogos de α -GalCer pueden ejercer efectos antivirales directos o actuar indirectamente a través de la estimulación inmune. La Figura 60 muestra el efecto citopático (CPE) de las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) *in vitro*. Las células MDCK se trataron previamente con vehículo, α -GalCer o uno de los análogos de α -GalCer C13, C14 o C16 a 10 μ g/ml durante cuatro horas, seguido de la infección con el pseudotipo H1N1 del virus de la gripe A (WSN) A 10TCID50. Se determinó el título del virus en las células MDCK a las 48 horas de la infección (*panel de la derecha*). α -GalCer, así como los tres análogos de α -GalCer ensayados mostraron una ligera inhibición de la entrada/replicación del virus H1N1 *in vitro*.

Efectos antibacterianos:

Desde la introducción de la penicilina en el uso clínico en la década de los 40 del siglo pasado, los agentes antibacterianos han salvado millones de vidas. Sin embargo, la sombra alargada de la resistencia a los agentes antimicrobianos amenaza con regresar a la era preantibiótica. Los glucolípidos sintéticos tales como α -GalCer y glucolípidos bacterianos naturales demostraron ser ligandos de CD1-d que activan los linfocitos NKT y contribuyen a las funciones antibacterianas de los hospedadores. Se han documentado actividades antibacterianas de α -GalCer en la mejora de las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, la eliminación de la infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*. También se atenuaron las infecciones por *Sphingomonas capsulate* y *Ehrlichia muris* en ratones mediante la activación de los linfocitos NKT a través de glucolípidos.

Los ejemplos de bacterias infecciosas para las que es deseable la estimulación de una respuesta inmune protectora, que se puede conseguir utilizando los NKT, las vacunas o las composiciones de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, *Helicobacter pylori*, *Borellia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Mycobacteria* sp. (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Estreptococos del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (Estreptococos del grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sp. anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógena, *Enterococcus* sp., *Chlamidia* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Actinomyces israelii*, *Sphingomonas capsulate* y *Francisella tularensis*.

Aumento del aclaramiento bacteriano - Ratones infectados por *Sphingomonas capsulate*

Sphingomonas capsulate es una cepa bacteriana ambiental común que se encuentra en muchos lugares tales como el aire y el agua. Se puede identificar fácilmente en placas de agar de nutrientes debido al color amarillo de sus colonias. A diferencia de la mayoría de las bacterias Gram negativas, *Sphingomonas capsulate* no contiene el lipopolisacárido (LPS) que es usado por los animales para la activación de las actividades antibacterianas del hospedador. Dado que las actividades antibacterianas de los antígenos glucolipídicos son mediadas a través de la activación de los linfocitos NKT por las moléculas CD1-d unidas a glucolípidos, la evaluación de las eficacias antibacterianas usando el modelo de enfermedad de la infección por *Sphingomonas capsulate* se centrará en el impacto de la vía mediada por los NKT que se activa mediante las uniones de los glucolípidos. Se aplicaron por inyección IP a ratones C57BL/16 hembra de seis a ocho semanas de vida células con *Sphingomonas capsulate*. Cuatro horas después de la infección, se inyectó a los ratones por vía IP control, α -GalCer (C1) o los análogos de α -GalCer (C3, C9, C11, C14, C16 o C17) a 50 o 100 μ g/kg. Veinticuatro horas después de la infección bacteriana, se extirpó el hígado de los ratones y se homogenizó. Se determinaron las unidades de formación de colonias (UFC) de *Sphingomonas capsulate* en los homogenizados hepáticos mediante la siembra de muestras diluidas en placas de nutrientes. Las colonias se contaron después de la incubación durante 48 horas a 37 °C. La Figura 61A muestra que los números de UFC de los grupos tratados con α -GalCer y C11, C14 y C16 a 100 μ g/kg, 24 horas después de las infecciones bacterianas, son significativamente inferiores a las del grupo de control. Para confirmar las eficacias antibacterianas de estos análogos de α -GalCer, se llevó a cabo otro estudio para repetir el estudio mediante el tratamiento de ratones infectados con 50 μ g/kg en el mismo modelo de enfermedad. La Figura 61B muestra que las eficacias antibacterianas de los ratones tratados con C11, C14, C16 y también C15 son significativas en comparación con el grupo no tratado. Entre los tres grupos eficaces, C1, C11 y C15, la diferencia en los valores de UFC por gramo de hígado no es estadísticamente significativa. La Figura 63 muestra que los números de UFC (en los pulmones) de los grupos tratados con C23 y C34 (siendo C34 de la presente invención) a 50 μ g/kg, son significativos en comparación con el grupo no tratado. Se encontraron resultados similares en los números de UFC en el hígado de los ratones que fueron tratados con C23 y C34.

Aumento del aclaramiento bacteriano - Ratones infectados por *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es una bacteria Gram negativa que causa absceso hepático y se está convirtiendo en una enfermedad grave en Taiwán entre los pacientes diabéticos. La Figura 62 muestra que tanto C1 como C14 pueden reducir significativamente la carga bacteriana en el pulmón y el hígado de ratón tras su inyección. Se administró a ratones hembra BALB/cByl una sola dosis de *K. pneumoniae* vivo por sonda oral. Los ratones recibieron por inyección el control, α -GalCer o el análogo de α -GalCer C14 a 100 μ g/kg dos veces, a las 4 horas y 8 horas de la infección bacteriana. Veinticuatro horas después de la infección, se extrajeron tanto el hígado como los pulmones de cada ratón, y se homogenizaron. Los recuentos bacterianos se determinaron de manera similar a la descrita anteriormente.

Como se muestra en la Figura 62, grado de aclaramiento bacteriano realizado por C14 resultó ser superior al aclaramiento realizado por C1.

Efectos antifúngicos:

La inmunidad mediada por células de tipo linfocito T auxiliar 1 (T_H1) desempeña un papel fundamental en la protección contra diversos hongos infecciosos. En otro aspecto más, los análogos de α -GalCer se pueden usar en terapias antifúngicas. Los fármacos antifúngicos se usan para tratar las infecciones causadas por hongos y para prevenir el desarrollo de infecciones fúngicas en pacientes con sistemas inmunes debilitados. Las infecciones por hongos se han convertido en uno de los principales factores que contribuyen a la morbilidad y a la mortalidad en los pacientes inmunodeprimidos.

La defensa innata del hospedador frente a enfermedades fúngicas se basa en la acción de las células fagocíticas (PMN y macrófagos); y tanto el número como la función de estas células pueden ser regulados por los factores estimulantes de colonias (CSF). Por otro lado, la defensa adquirida implica la inmunidad celular y humoral que requiere interacciones entre las células presentadoras de antígeno, los linfocitos T, los linfocitos B y los NK, que son impulsados y regulados por citocinas tales como IL-2 e IFN- γ . La importancia potencial de la activación inmune a través de las citocinas en la defensa del hospedador contra los hongos oportunistas ha sido objeto de varios estudios, y ha planteado algunas preguntas intrigantes sobre nuevas estrategias antifúngicas contra las infecciones de *Candida* y *Aspergillus*. Se han descrito diferentes roles posibles de las citocinas. En primer lugar, la exposición a hongos y sus antígenos puede inducir la liberación de IL-2, IFN- γ , factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). A su vez, estas citocinas pueden activar o mejorar la función de los fagocitos antifúngicos contra las especies de *Candida* y *Aspergillus*.

Los ejemplos de hongos infecciosos para los que es deseable la estimulación de una respuesta inmune protectora, que se puede conseguir mediante la administración de un análogo de α -GalCer solo o en combinación con un fármaco antifúngico incluyen, pero sin limitación, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen: *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp., *Schistosoma* sp. y *Toxoplasma* sp.

SUPRESIÓN DE INFECCIONES BACTERIANAS Y VIRALES MEDIANTE ANÁLOGOS DE α -GALACTOSIL-CERAMIDA SINTÉTICOS EN MODELES DE ENFERMEDAD MURINOS

Los linfocitos T citolíticos naturales contribuyen a una variedad de procesos inmunológicos mediante el reconocimiento de los antígenos lipídicos y glucolipídicos presentados a las moléculas CD1-d. Las CD1-d son proteínas de tipo complejo de histocompatibilidad principal de clase I, y se expresan en la mayoría de los monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, así como en las células no linfoides. CD1-d presenta antígenos glucolipídicos a los linfocitos T restringidos a CD1d (o linfocitos NKT) que participan en el sistema de defensa innata del hospedador a través de la producción de los tipos Th1 y Th2 de citocinas, tales como IFN- γ e IL-4. Entre la variedad de ligandos que se unen a CD1-d, el ligando mejor estudiado es α -galactosil-ceramida (α -GalCer), que es el glucoesfingolípido ligado a α estructuralmente optimizado, sintético, de la esponja marina *Agelas mauritanus*. Los glucolípidos sintéticos tales como alfa-galactosil-ceramida (α -GalCer) y los glucolípidos bacterianos naturales se han publicado como ligandos de CD1-d que activan los linfocitos NKT. Los ratones tratados con α -GalCer generaron la protección de una variedad de infecciones. Se sintetizaron muchos análogos de α -GalCer. Sus actividades de modulación inmune mostraron estar relacionadas con la unión a CD1-d. Estudios recientes usando la unión a la matriz CD1-d establecieron que las secreciones de IFN- γ e IL-4 por los linfocitos NKT se determinan por las constantes de unión de los análogos de α -GalCer al bolsillo de unión de CD1-d, y las proporciones de las citocinas Th1 y Th2 secretadas son uno de los factores dominantes para las propiedades de la modulación inmune de estas moléculas.

Se determinaron las eficacias de algunos de los glucolípidos sintéticos para la protección de infecciones tanto bacterianas como virales usando varios modelos murinos de enfermedades infecciosas. Entre todos los análogos de α -GalCer sintéticos ensayados, la α -GalCer modificada con 4-(4-fluorofenoxi)fenil-octanoilo (C34, siendo de la

presente invención) es el más activo en la protección contra las infecciones bacterianas y virales en modelos murinos. Los efectos protectores de C34 son más eficaces cuando se administra de manera profiláctica o poco después de las infecciones.

5 Eficacia antibacteriana de los análogos de α -GalCer usando ratones infectados con *Sphingomonas capsulate*

Se usaron ratones infectados con *Sphingomonas capsulate* como modelo de infección para evaluar la eficacia antibacteriana de algunos de los glucolípidos sintéticos. *Sphingomonas capsulate* es una cepa bacteriana ambiental común que se encuentra en muchos lugares tales como el aire y el agua. Se puede identificar fácilmente en placas de agar de nutrientes debido al color amarillo de sus colonias. A diferencia de la mayoría de las bacterias Gram negativas, *Sphingomonas capsulate* no contiene el lipopolisacárido (LPS) que es usado por los animales para la activación de las actividades antibacterianas del hospedador. Las actividades antibacterianas de los glucolípidos son mediadas a través de la activación de los linfocitos NKT por las moléculas CD1-d unidas a glucolípidos, y la evaluación de las eficacias antibacterianas usando el modelo de enfermedad de la infección por *Sphingomonas capsulate* se centrará en el impacto de la vía mediada por los NKT que se activa mediante las uniones de los glucolípidos. La Figura 65 muestra que los números de UFC de los grupos tratados con 100 μ g/kg de C1, C11, C14 o C16 a las 24 horas de las infecciones bacterianas son significativamente inferiores a los del grupo de control. Por el contrario, las diferencias en las UFC de los grupos tratados con C3, C9 y C17 no son significativas en comparación con las UFC encontradas entre los ratones del grupo de control. Se realizaron estudios de eficacia antibacteriana adicionales de estos glucolípidos para tratar ratones infectados con 50 μ g/kg de glucolípidos en el mismo modelo de enfermedad. También se observaron valores de UFC significativamente reducidos en los hígados de los ratones tratados con C1, C11, C14 y C16 en comparación con el grupo sin tratamiento (datos no mostrados). α -GalCer pareció ser más potente en la supresión de *S. capsulate in vivo* que C11, C14 y C16; aunque las diferencias no fueron significativas.

Se cree que la producción de citocinas Th1 se correlaciona con los efectos antitumorales, antibacterianos y antivirales de los glucolípidos, mientras que la capacidad de inducir las citocinas Th2 se cree que se correlaciona con la mejora de ciertas enfermedades autoinmunes, tales como la diabetes de tipo 1. Recientemente, se han sintetizado muchos análogos de α -GalCer, y se caracterizaron sus perfiles de inducción de citocinas *in vitro* o *in vivo*. Se estudiaron las propiedades antibacterianas y antivirales de α -GalCer y de tres análogos, 7DW8-5, C23 y C34 (siendo C34 de la presente invención) que se sabe que inducen niveles más altos de secreciones de IFN- γ en los linfocitos NKT. Estos cuatro glucolípidos se evaluaron primero usando el modelo de infección por *S. capsulate* en ratones C57/b. La tabla de la Figura 72 muestra que los cuatro glucolípidos a 50 μ g/kg son capaces de suprimir la infección por *S. capsulate* a mayores grados que los ratones tratados con vehículo, con valores de p inferiores a 0,001. Sin embargo, entre los cuatro glucolípidos, sus eficacias no fueron significativamente diferentes en el modelo de infección por *S. capsulate*.

40 Actividades antibacterianas de los análogos de α -GalCer en el modelo de ratón de herida en el muslo usando *Staphylococcus aureus* luminiscente (Xen29)

La inyección intraperitoneal de *S. capsulate* en ratones C57/B a menudo produce infecciones transitorias, y los tratamientos con glucolípidos aceleran el aclaramiento de la infección después de 24 horas. Sin embargo, en ausencia de tratamiento, las infecciones se suelen aclarar en 2-3 días. Para evaluar la eficacia antibacteriana de los análogos de α -GalCer, se usó un modelo de enfermedad de ratón más relevante, de heridas profundas en el muslo por inyección en el músculo del muslo trasero del ratón con *S. aureus* luminiscente Xen29. La infección por *S. aureus* Xen29 se puede monitorizar mediante el análisis de imágenes de ratones vivos para reducir el número de ratones experimentales y permitir la repetición del examen sobre el grado de infección a través de estudios antibacterianos. La Figura 66(A-B) muestra que el tratamiento con α -GalCer y sus análogos de ratones infectados en el músculo del muslo resultó en el aclaramiento profundo de la mayoría de los ratones tratados. Sin embargo, solo se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en comparación con el grupo tratado con vehículo en el grupo que recibió C34 (siendo C34 de la presente invención). Por lo tanto, este resultado sugiere que el tratamiento con C34 puede tener una alta probabilidad de ser beneficioso para el aclaramiento bacteriano en este modelo de enfermedad.

55 Evaluación antiviral de análogos de α -GalCer usando el modelo animal de infección por el virus de la encefalitis japonesa (JEV)

Para determinar si los glucolípidos generan inmunidad protectora contra la infección por el virus de la encefalitis japonesa (JEV), se usó un protocolo de dos dosis, en el que el glucolípido se administró un día antes y un día después de la exposición viral en ratones. El glucolípido prototipo, α -GalCer (C1), y un derivado del glucolípido, C23, aumentaron la supervivencia de los ratones del 21 % al 57 % en comparación con el control de disolvente (Figura 67). Por otra parte, los efectos protectores fueron aún más intensos en los ratones que recibieron glucolípidos tales como C34 (siendo C34 de la presente invención) y 7DW8-5, con una tasa de supervivencia del 64 % y 71 %, respectivamente (Fig. 67). Estos resultados sugieren con fuerza que los linfocitos NKT estimulados con glucolípidos

probablemente contribuyen a la defensa del hospedador contra la infección por JEV. Del mismo modo, dichos análogos eficaces en la protección contra infecciones por JEV también demostraron prolongar la supervivencia de los ratones Balb/c infectados por el virus de la gripe (datos no mostrados). Para estudiar más exhaustivamente el requisito de la protección inmune mediada por glucolípidos, se realizaron ensayos para determinar si todavía se observaban los efectos beneficiosos de C34 y 7DW8-5 en ciertos ratones inmunodeficientes. Al parecer, se requieren los componentes inmunes tanto innato como adaptativo para que estos glucolípidos generen una inmunidad protectora contra JEV, pues no se observó ningún efecto beneficioso en los ratones que carecían de Stat-1, la cadena μ de inmunoglobulina o la cadena α de CD8 (Figura 68 (A-C)).

Las actividades antiinfecciosas de los análogos de α -GalCer son más eficaces cuando se administran de forma profiláctica

Se realizaron evaluaciones para determinar si estos glucolípidos podrían generar inmunidad protectora en caso de administrarse después de la infección viral. Además del protocolo de dos dosis descrito anteriormente, también se ensayaron otros varios protocolos de una sola dosis. Los glucolípidos C34 (siendo C34 de la presente invención) y 7DW8-5 administrados solo una vez un día antes o el mismo día de la infección viral provocaron un efecto protector más débil en comparación con el protocolo de dos dosis (Fig. 69 (A-B)). Sin embargo, cuando los glucolípidos se administraron un día después de la infección viral, no se pudo observar ninguna protección contra la exposición a JEV (Fig. 69(A-B)), lo que sugiere que la modulación inmune mediada por glucolípidos depende del momento de la infección. También se evaluaron los efectos de los momentos de la administración de C34 frente al momento de la infección viral en ratones Balb/C infectados por gripe. La administración de C34 un día antes de la infección por gripe fue más beneficiosa para la supervivencia del ratón (valor de $p < 0,0001$). El tratamiento con dos dosis de C34 administradas ambas un día antes y un día después de la infección por gripe también pudieron prolongar significativamente la supervivencia (valor de $p = 0,0002$) en comparación con el grupo tratado con vehículo. Al igual que la infección por JEV, una sola dosis de C34 administrada un día después de la infección por gripe no fue beneficiosa para la supervivencia (Fig. 7). También se estudiaron los efectos de los momentos de la administración de C34 en el aclaramiento bacteriano en el modelo de infección en el muslo con *S. aureus*. Cuando se examinaron las infecciones de los ratones 48 horas después de la infección, el aclaramiento bacteriano más intenso se produjo en el grupo de ratones que habían recibido C34 inmediatamente después de la introducción de las infecciones en el muslo. Para el grupo que recibió C34 6 h después de la infección en el muslo, se observó una mejora del aclaramiento bacteriano, no siendo significativa la diferencia con el grupo tratado con vehículo (Figura 71). Se observaron perfiles de aclaramiento bacteriano similares cuando se examinaron 72 horas después de la infección (datos no mostrados).

Se usaron ambos modelos murinos de infección bacteriana y viral para evaluar las eficacias de supresión de la infección de varios análogos de α -GalCer, y resultó que α -GalCer modificada con 4-(4-fluorofenoxi)fenil-octanoilo (C34, siendo C34 de la presente invención) es el más eficaz en los presentes modelos. Estudios previos mostraron que los tratamientos con α -GalCer se complican con la asociación de efectos secundarios perjudiciales, y la eficacia del tratamiento se vio afectada por una variedad de parámetros. Las células citolíticas naturales (NKT) responden a las estimulaciones de los glucolípidos asociados a las infecciones, así como mediante las citocinas producidas por las células dendríticas activadas por microorganismos. Por lo tanto, en los ratones experimentales que recibieron tanto glucolípidos como exposiciones a la infección, se esperaba una estimulación compleja en el sistema inmune murino. Se han documentado respuestas de las citocinas en ratones infectados, tratados con α -GalCer, o tanto infectados de gripe como tratados con α -GalCer. Se encontraron mayores niveles de citocinas en suero en los muchos ratones doblemente estimulados. Sin embargo, los perfiles son complicados y variados en diferentes momentos de observación.

Se encontró que la eficacia de α -GalCer en la protección contra el choque inducido por lipopolisacáridos es fundamental para el momento de la administración, mientras que el glucolípido se ha de administrar antes o en el transcurso de 2 h después de la exposición al LPS. Los presentes estudios *in vivo* usando modelos de infección bacteriana y viral también mostraron que C34 (siendo C34 de la presente invención) es más eficaz en la supresión de las infecciones cuando se administra antes o poco después de la infección. Las infecciones producen una variedad de estimulaciones inmunes con diferentes cinéticas que están íntimamente relacionadas con la progresión de la enfermedad. Cabe pensar que, para la protección contra las infecciones, se han de ajustar tanto las dosis como los momentos de administración de los glucolípidos para que sean beneficiosos.

INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La autoinmunidad se produce como consecuencia de un problema en la regulación del sistema inmune que da lugar a una respuesta inflamatoria dirigida a antígenos propios y a tejidos. Las enfermedades autoinmunes son la tercera categoría más común de enfermedad en Estados Unidos después del cáncer y de las enfermedades del corazón. Afectan a aproximadamente del 5 % al 8 % de la población o de 14 a 22 millones de personas. Las enfermedades autoinmunes que implican la destrucción del antígeno propio por los linfocitos T incluyen, pero sin limitación, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de la insulina y artritis reumatoide.

De acuerdo con el dogma actual, las enfermedades autoinmunes inflamatorias tales como la miocarditis son principalmente atribuibles a las respuestas T_H1 , siendo $IFN-\gamma$ la citocina prototípica; respuestas T_H2 donde se cree que la IL-4 domina para reducir la autoinmunidad. Debido a que los análogos de α -GalCer descritos en el presente documento se pueden diseñar de modo que se inicie una respuesta inmunogénica influida por T_H2 , estos análogos de α -GalCer se pueden usar como inmunoterapias para las enfermedades autoinmunes.

ACTIVIDADES ADYUVANTES DE ANÁLOGOS DE α -GalCer

Actividades adyuvantes de análogos de α -GalCer para la vacuna pCHA5 administrada por vía intramuscular

Previamente, se había demostrado que la inmunización de ratones con 30 μ g de pCHA5 por vía electroporación/intramuscular (EP/IM) indujo altos títulos de anticuerpos anti-HA y confirió una protección del 100 % a la exposición letal del virus NIBRG-14. Con dicha alta dosis de pCHA5 administrada por EP/IM, la adición de glucolípidos no podía mejorar más las respuestas inmunes. Por lo tanto, se ensayaron los efectos adyuvantes de los glucolípidos para la vacuna pCHA5 administrada por vía intramuscular en lugar de EP/IM. Los ratones recibieron por inyección 30 μ g de pCHA5 con/sin 2 μ g de glucolípidos (C1, C23, C26, C34 y 7DW8-5) por vía intramuscular y recibieron el refuerzo de pCHA5 solo dos semanas después. Se extrajeron los sueros y se expusieron los ratones al virus de NIBRG-14 2 semanas después de la segunda vacunación. En los ratones que solo recibieron pCHA5, se observaron anticuerpos IgG específicos anti-HA significativos, mientras que no se detectó ninguno en los ratones que habían recibido pVAX. En comparación con el grupo de solo pCHA5 (16.180 ± 5.261), los sueros de los ratones mostraron títulos de anticuerpos ligeramente más altos en el grupo que había recibido C1 (24.250 ± 3.206) o C34 (23.622 ± 5.516) como adyuvante y un nivel similar en el grupo de C23 (14.538 ± 3.223) y de C26 (16.350 ± 2.193) (Figura 73A). Tras la exposición al virus, ninguno de los ratones que había recibido vehículo de pVAX sobrevivió, pero sobrevivieron todos los ratones que habían recibido C1, C23, C26, C34 como adyuvante. Aunque la supervivencia del grupo de solo pCHA5 (80 %) no fue tan buena como la de los grupos con adyuvante de glucolípido, las diferencias en la supervivencia no fueron estadísticamente significativas (Figura 73B). Por lo tanto, los efectos adyuvantes de estos glucolípidos no se definieron claramente en este régimen. Sin embargo, no se había evaluado la vía de inyección intramuscular para la administración de las vacunas.

A continuación, se evaluaron los efectos adyuvantes de los glucolípidos sobre una sola dosis de pCHA5 administrada por inyección IM. Los ratones fueron vacunados por vía intramuscular con una dosis de 50 microgramos de pCHA5 con/sin glucolípidos o alumbre. Tres semanas más tarde, se extrajeron los sueros y se expusieron los ratones al virus NIBRG-14. Se observó la inducción de la respuesta de los anticuerpos específicos de HA en los ratones vacunados con pCHA5 ($3.692 \pm 897,5$), y el adyuvante de alumbre tradicional ($2.192 \pm 547,5$) no mostró un mejor efecto. Sin embargo, se observó un aumento de los títulos en presencia de los grupos tratados con adyuvante de glucolípido C34 (7.208 ± 1.482) (Figura 74A). Del mismo modo, se detectó una mayor inmunidad celular determinada mediante el análisis ELISPOT de $IFN-\gamma$ funcional en presencia de glucolípido como adyuvante (Figura 74B). Las células secretoras de $IFN-\gamma$ en pCHA5 resultaron ser $29,5 \pm 0,5$ por 2×10^5 células y aumentó significativamente ($p < 0,05$) en los grupos con adyuvante de glucolípido tales como $66,33 \pm 5,3$ en el grupo de C1, $176,7 \pm 2,3$ en C34, $69,17 \pm 1,5$ en 7DW8-5 y $68,56 \pm 8,72$ en alumbre. Tras la exposición a la dosis letal del virus NIBRG-14, ninguno de los animales del grupo de control (pVAX) y el 20 % de los animales del grupo de solo pCHA5 sobrevivió. La supervivencia de los ratones con adyuvantes fue del 40 % para el grupo de C1 y 7DW8-5, del 60 % de supervivencia para el grupo de C34 y del 0 % de supervivencia para el de alumbre. La diferencia en la supervivencia entre el grupo de alumbre y el de adyuvante de glucolípido es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 74C). En general, los glucolípidos podrían mejorar los títulos de los anticuerpos específicos de HA, aumentar el número de células de producción de $IFN-\gamma$ y mejorar la supervivencia tras la exposición letal al virus H5N1.

Actividades adyuvantes de los análogos de α -GalCer para la vacuna pCHA5-II

Dado que las secuencias consenso de ADN de pCHA5 se obtuvieron de 467 cepas de virus H5N1 hace dos años, podrían no tener validez. Se recogieron 1.192 secuencias de HA de longitud completa y se obtuvo una nueva secuencia consenso de HA, denominada pCHA5-II. Hay 5 restos mutados en pCHA5-II en comparación con pCHA5. Se comparó el efecto adyuvante de los glucolípidos en estas dos vacunas de ADN de HA consenso. Los grupos de ratones recibieron inyección EP/IM bien de 30 microgramos de pCHA5 o pCHA5-II en presencia/ausencia de glucolípidos como adyuvante. Los ratones recibieron dos vacunaciones a intervalos de 3 semanas y se extrajeron los sueros dos semanas después de la última inmunización. Se ensayaron los títulos de los anticuerpos anti-HA por ELISA, y no se observaron diferencias significativas entre pCHA5 y pCHA5-II con o sin glucolípidos como adyuvante (Figura 75A). Sin embargo, hubo diferencias significativas entre pCHA5 y pCHA5-II cuando se expusieron al virus de la gripe H5N1 de tipo silvestre altamente patógeno (E319). Independientemente del glucolípido que se añadió como adyuvante, la protección conferida por pCHA5 no fue notable (Figura 75B). No sobrevivió ningún ratón del grupo de solo pCHA5, mientras que sobrevivió aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 % de los ratones del grupo de adyuvante de 7DW8-5 y C34, respectivamente. En los grupos vacunados con pCHA5-II, los glucolípidos C34 y 7DW8-5 podrían mejorar la tasa de supervivencia del aproximadamente 20 % al aproximadamente 50 % y aproximadamente 40 %, respectivamente (Figura 75C). En conclusión, aunque los títulos de anticuerpos fueron similares entre pCHA5 y pCHA5-II con o sin glucolípidos, pCHA5-II confirió una mejor protección que pCHA5, y la

capacidad de protección de pCHA5II fue reforzada por los adyuvantes de glucolípidos.

Además, en algunas realizaciones, se evaluaron las dosis óptimas en ciertas condiciones, y se sugirió que una dosis de pCHA5-II y C34 administrada por IM como una sola vacunación, en algunas circunstancias, es óptima. Se usaron varias dosis de pCHA5-II (50, 75 y 100 μg) y C34 (0,5, 1, 2 y 4 μg) en la determinación de las formulaciones para la vacuna de pCHA5-II/C34. 3 semanas después de la vacunación, se extrajeron los sueros y se ensayaron los títulos de los anticuerpos anti-HA por ELISA. En los grupos tratados con pCHA5-II, solamente se detectaron anticuerpos anti-HA débiles y no se observaron los efectos obvios de las dosis. Las respuestas contra HA se aumentaron aproximadamente 8~9 veces mediante la adición de 2 μg de C34 como adyuvante. A 100 μg de pCHA5-II, 0,5 y 2 μg de C34 generaron títulos de anticuerpos más altos que 1 y 4 μg (Figura 76A) ($p < 0,01$). Por otra parte, en el ensayo ELISPOT de secreción de IFN- γ funcional, 100 μg de pCHA5-II produjeron un mayor número de células productoras de IFN- γ ($136,5 \pm 11,26$) que bien 50 μg ($31,33 \pm 11,95$) o 75 μg ($40 \pm 3,67$) de pCHA5-II ($p < 0,01$). Dichas respuestas inmunes mediadas por células se aumentaron mediante la adición de C34 como adyuvante. Las células secretoras de IFN- γ a 1 μg ($151,2 \pm 22,58$) y 4 μg ($146,5 \pm 19,41$) de los grupos con adyuvante C34 fueron mejores que 0,5 μg ($106,7 \pm 19,31$) y 2 μg ($95,56 \pm 10,06$) de los grupos de C34, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 76B). Tras la exposición intranasal a la dosis letal de NIBRG-14, se observaron los efectos de las dosis de pCHA5-II en la protección de los ratones contra la exposición al virus. Las supervivencias de los ratones se aumentaron del 10 % (50 μg) al 40 % (75 μg) y 70 % (100 μg) en los grupos de pCHA5-II. Además, la adición de 2 μg de C34 a 50 μg y 75 μg de los grupos de pCHA5-II pudo aumentar las supervivencias de los ratones del 10 % al 100 % y del 40 % al 100 %, respectivamente (Figura 76C). Aunque las supervivencias de los ratones no fueron tan buenas en C34 a 0,5 μg (80 %) y 2 μg (75 %), no aparecieron diferencias, basándose en estos ensayos, que fueran estadísticamente significativas (Figura 76D) en las condiciones experimentales en el tiempo. La adición de 1 μg de C34 como adyuvante a 100 μg de pCHA5-II aumentó la supervivencia de los ratones del 70 % al 100 %. Estos datos sugieren que 50 μg de pCHA5-II con 2 μg de C34 en una sola vacunación podría proporcionar una buena protección contra la exposición al virus. Para garantizar el efecto de protección, aproximadamente 100 μg de pCHA5-II con aproximadamente 1-2 μg de C34, en algunas realizaciones, parece proporcionar una formulación segura.

Para examinar la capacidad de neutralización cruzada de los antisueros en ratones inmunizados con pCHA5 con/sin C34, se usó la dosis subóptima de pCHA5 y se aplicó el mismo esquema de vacunación. Dos semanas después de la última vacunación, se extrajeron sueros de los ratones y se evaluaron mediante el ensayo de neutralización de virus de pseudotipo HA. Se seleccionaron cuatro virus de la gripe H5N1 de clase 1 (VN1194), 2.1 (ID05), 2.2 (TK05) y 2.3.4 (Anhui05). Se incubaron los diversos virus de pseudotipo HA con antisueros de los ratones de control, de solo pCHA5 y de pCHA5 con adyuvante C34. Se midieron los títulos neutralizantes mediante la actividad de la luciferasa, y los datos se presentaron como diluciones de suero que daban el 50 % de la neutralización del virus de pseudotipo HA (DI_{50}). Como se muestra mediante DI_{50} (Figura 77), los antisueros del grupo de solo pCHA5 mostraron mayores anticuerpos neutralizantes contra los virus de pseudotipo HA VN1194 ($\text{DI}_{50} = 0,005862$) y TK05 ($\text{DI}_{50} = 0,005953$) que el grupo de pVAX ($\text{DI}_{50} = 0,0277$ y $0,02668$, respectivamente). Por otra parte, la eficacia de neutralización del grupo de adyuvante C34 contra VN1194 ($\text{DI}_{50} = 0,00408$) y TK ($\text{DI}_{50} = 0,003054$) se pudo mejorar de manera significativa. No se observaron diferencias entre el grupo de pVAX y pCHA5 con/sin C34 sobre la neutralización de los virus de pseudotipo HA ID05 y Anhui05. Estos resultados sugieren que C34 como adyuvante, en algunas realizaciones, puede actuar para aumentar la capacidad de neutralización frente a diversas cepas de virus en la dosis subóptima de vacuna pCHA5.

Todavía se desconocen los mecanismos responsables del efecto adyuvante de C34 por vía IM/EP. Para examinar los mecanismos del efecto adyuvante de C34, se extrajeron sueros a las 0 horas y 20 horas del refuerzo, y se ensayaron las citocinas por luminex. El análisis reveló que (Figura 78) se encontraron niveles de muy bajos a indetectables de IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-15 y TNF- α en los grupos de pCHA5 con o sin adyuvante C34. Los niveles en suero de IFN- γ , G-CSF, IL-5, IL-17, KC, MIP-1 β , y RANTES se aumentaron significativamente después del refuerzo en el grupo de adyuvante C34. Además, IL-2, IL-5, IL-12p40, IL-13, IL-17, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , KC, RNATES y G-CSF resultaron ser sustancialmente superiores en el grupo con adyuvante C34 que en el grupo de solo pCHA5. Es más, se encontraron niveles reducidos de IL-1 β en el grupo de pCHA5 que contenía C34 en comparación con el grupo de solo pCHA5. Los datos muestran que, en algunas realizaciones ilustrativas, el efecto adyuvante de C34 se correlaciona con una mayor producción de citocinas proinflamatorias, citocinas auxiliares T de tipo I y II y quimiocinas implicadas en la proliferación celular y la quimiotaxis.

También se ensayó la capacidad de neutralización cruzada de los antisueros de ratones inmunizados con la vacuna de pCHA5-II con/sin C34, donde se usaron 50 μg de pCHA5 y se aplicó una sola vacunación. Tres semanas después de la vacunación, se extrajeron los sueros de los ratones y se evaluaron mediante el ensayo de neutralización del virus de pseudotipo HA. Se usaron cuatro virus de la gripe H5N1 y se determinaron los antisueros de los ratones de control, de solo pCHA5-II y de pCHA5-II con adyuvante C34. Los datos presentados en la Figura 79, los antisueros del grupo de solo pCHA5-II mostraron más anticuerpos neutralizantes contra el virus de pseudotipo HA TK05 ($\text{DI}_{50} = 0,05376$) que el grupo de pVAX ($\text{DI}_{50} = 0,144$). A diferencia del grupo de solo pCHA5-II, la eficacia de neutralización (DI_{50}) del grupo de adyuvante C34 contra VN1194 (0,003), TK05 (0,004), Anhui05 (0,0027) e ID05 (0,002) se mejoró de manera significativa. Tomados en conjunto, estos resultados indican que el

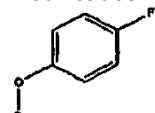
adyuvante C34 no solo aumenta la potencia de neutralización, sino que también puede actuar para ampliar el espectro contra diversos virus.

Ejemplos

Análogos glucolipídicos de α -GalCer, reactivos y ratones

Se sintetizaron α -GalCer (C1) y análogos de α -GalCer sintéticos y se purificaron mediante cromatografía en columna por técnicas descritas previamente en Fujio *et al.* (2006) *J. Am. Chem. Soc.* 128:9022-9023; Xing *et al.* (2005) *Bioorg. Med. Chem.* 13:2907-2916; Kinjo *et al.* (2005) *Nature* 434:520-525; Wu *et al.* (2006) *Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 103:3972-3977; y Wu *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 102:1351-1356; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia.

Se separaron los análogos de α -GalCer sintéticos, como se muestra en la Figura 2, en cuatro grupos basándose en sus estructuras químicas. Grupo I: C2, C3 y C14 son de origen bacteriano; Grupo II: C4, C5 y C9 contienen modificación de azufre del enlace de O a la ceramida (C4) o un grupo sulfato en 3"-OH del resto de galactosa (C5, C9); Grupo III: C6-C8, C8-5, C8-6, C10-C11, C15-C16 y C18-C34 (siendo C34 de la presente invención) están modificados con un anillo aromático en su cola de acilo; y Grupo IV: C12, C13 y C17 contienen fitoesfingosina troncada. Entre estos nuevos análogos, C10, C11, C16, C27, C28, C29 están modificados con un grupo fenilo en diversas longitudes de la cadena de amida grasa (Ph); C18, C22 están modificados con un grupo metoxi (-OMe) en el anillo de fenilo; C19, C23, 7DW8-5 están modificados con un grupo de fluoruro (-F) en el anillo de fenilo; C20, C24, 7DW8-6 están modificados con un grupo trifluorometilo (-CF₃) en el anillo de fenilo; C21, C25, C26 están modificados con el grupo fenilo (Ph) en el anillo de fenilo; C34 es 1'-oxi-4-fluorofenilo modificado (O-Ph-F)



en el anillo de fenilo. Sin embargo, la sustitución del *para*-oxi-fluorofenilo (1'-oxi-4'-fluorofenilo) en el anillo de fenilo con un oxi-fluorofenilo con el grupo F en una posición no *para* o uno de entre difluoro-, trifluoro-, tetrafluoro- y pentafluoro-fenilo también puede producir propiedades útiles; y C17 contiene una fitoesfingosina troncada.

En el Esquema 1, se resume la síntesis de los compuestos glucoesfingolipídicos C12 y C13 (Figura 3). Los datos de caracterización para estos compuestos se describen a continuación.

Compuesto C13 (lote MFJ3-017-1): RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃-MeOH 4:1) δ : 7,26 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 2H), 7,18-7,14 (m, 1H), 4,90 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 4,24-4,19 (m, 1H), 3,86 (dd, J = 10,8; 5,2 Hz, 1H), 3,82-3,62 (m, 7H), 3,58-3,53 (m, 2H), 2,92-2,84 (m, 1H), 2,67 (ddd, J = 13,7; 9,3; 7,5 Hz, 1H), 2,16 (m, 2H), 2,06-1,98 (m, 1H), 1,74-1,65 (m, 1H), 1,62-1,53 (m, 2H), 1,33-1,19 (m, 44H), 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 3H), RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃-MeOH 4:1) δ : 174,06; 141,93; 128,25; 128,01; 125,43; 99,48; 74,60; 70,75; 70,44; 69,99; 69,52; 68,66; 67,03; 61,69; 50,15; 50,06; 36,27; 34,13; 31,67; 31,59; 29,43; 29,31; 29,15; 29,09; 25,55; 22,41; 17,60; 13,76, HRMS (ESI-TOF) para C₄₄H₈₀NO₉⁺ [M + H]⁺ calc.: 766,5827, encont: 766,5813.

Compuesto C12 (lote MFJ3-018-1): RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃-MeOH 4:1) δ : 7,26 (m, 2H), 7,19-7,13 (m, 3H), 4,91 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 4,20 (c, J = 4,4 Hz, 1H), 3,95-3,85 (m, 2H), 3,83-3,61 (m, 6H), 3,59-3,50 (m, 2H), 2,63 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,20 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 1,78-1,54 (m, 6H), 1,47-1,17 (m, 46H), 0,89 (t, J = 6,9 Hz, 3H), RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃-MeOH 4:1) δ : 174,16; 142,27; 127,91; 127,77; 125,14; 99,33; 74,28; 71,38; 70,42; 69,86; 69,33; 68,51; 66,84; 61,40; 50,02; 36,04; 35,52; 31,93; 31,51; 31,21; 29,26; 29,14; 28,99; 28,94; 25,47; 25,08; 22,25; 13,51, HRMS (ESI-TOF) para C₄₆H₈₄NO₉⁺ [M + H]⁺ calc.: 794,6140, encont.: 794,6129.

Todos los análogos de α -GalCer sintéticos se disolvieron inicialmente en DMSO al 100 % a una concentración de 1-2 mg/ml. Para los experimentos *in vivo*, se diluyeron los análogos de α -GalCer sintéticos a 20 o 1 pg/ml en solución salina justo antes de la inyección a ratones. Se adquirieron ratones hembra BALB/c (de tipo silvestre o con CD1d desactivado) y C57BL/6 exentos de patógenos de 6-10 semanas de vida en el National Laboratory Animal Center (Taipei, Taiwán). Los ratones BALB/c y C57BL/6 deficientes en CD1d se obtuvieron del Laboratorio Jackson (C.12952-CD1tm1Gru/J, EE.UU.) y fueron proporcionados por el Dr. Steve R. Roffler (Academia Sinica, Taiwán), respectivamente. Todos los ratones se mantuvieron en instalaciones de animales exentas de patógenos.

En el Esquema 2, se resume la síntesis del compuesto glucoesfingolipídico C34 (siendo C34 de la presente invención) (Figura 80). Se sintetizó derivado de fitoesfingosina a partir de D-lixosa. Se protegieron selectivamente los grupos 2,3-dihidroxi de D-lixosa por 2-metoxipropeno en presencia de ácido, dando actónido intermedio, y luego se sometió el grupo hidroxilo primario de este producto intermedio a cloruro de tritilo y condiciones básicas, dando tritiléter. Seguido por la olefinación de Wittig, se hizo reaccionar el posterior producto intermedio con C₁₃H₂₇⁺PPh₃⁻Br en presencia de hexametildisilazida de litio (LHMDS) para producir alqueno con la proporción *E/Z* de 2:1 según la caracterización mediante espectrometría de RMN de ¹H. Tras la hidrogenación catalítica del alqueno insaturado intermedio, dando alceno, se activó el grupo hidroxilo mediante anhídrido de triflato y 2,6-lutidina para dar un triflato

intermedio. La reacción S_N2 del triflato intermedio con azida de tetrametilguanidinio (TMGA) dio el compuesto azido con la configuración invertida. Se retiró selectivamente el grupo tritilo de C1 mediante el uso de ácido trifluoroacético (TFA).

La glucosilación de derivado de galactosa donante y fitoesfingosina aceptora se sometió a una condición en la que se usó anhídrido trifluorometanosulfónico (TF_2O) y sulfuro de dimetilo (Me_2S) como promotores para obtener el producto intermedio clave. Entonces, se redujo el grupo azido de este producto intermedio clave usando la reacción de Staudinger para dar el producto intermedio de amina. Se acopló la amina con ácido graso recién preparado usando EDC y HBTU, y luego se desprotegió globalmente, dando el compuesto C34.

A continuación, se describen los datos de caracterización de este compuesto.

Compuesto C34: RMN de 1H (600 MHz, piridina- d^5) δ : 8,53 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H), 7,27 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,14 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,05-7,09 (m, 4H), 5,59 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H), 5,27 (m, 1H), 4,70-4,65 (m, 2H), 4,55 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 4,52 (t, $J = 6,0$ Hz, 1 H), 4,45-4,39 (m, 4H), 4,35-4,30 (m, 1H), 2,59 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,45 (t, 2H), 2,30 (m, 1H), 1,91 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,68 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,47-1,15 (m, 42H), 0,87 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H), RMN de ^{13}C (150 MHz, piridina- d^5) δ : 173,79; 160,19; 158,60; 156,32; 154,53; 138,89; 130,73; 123,65; 121,06; 121,01; 119,46; 117,25; 117,09; 102,00; 77,17; 73,53; 72,96; 72,09; 71,46; 71,29; 70,79; 69,07; 63,12; 51,95; 37,27; 35,86; 34,82; 32,60; 32,47; 30,84; 30,63; 30,48; 30,41; 30,35; 30,28; 30,25; 30,20; 30,10; 30,03; 26,99; 26,87; 23,42; 14,77. HRMS (ESI-TOF) para $C_{47}H_{76}FNO_{10}Na^+$ $[M + Na]^+$ calc.: 856,5345; encont.: 856,5362.

Aislamiento y generación de líneas de linfocitos NK humanos, células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos y NK/NKT

Se separaron los linfocitos NKT $V\alpha 24i$ preinmunes usando microperlas anti- $V\alpha 24i$ TCR conjugadas indirectamente (Miltenyl Biotec, EE.UU.). Se incubaron las células aisladas en presencia de 50 U/ml de IL-2 (sistema R & D) y se renovaron de medio recién preparado cada 3 días. La generación de NKT $V\alpha 24i$ pulsados con α -GalCer o con glucolípidos de fenilo se realizó de la siguiente manera. Se usaron anticuerpos TCR anti- $V\alpha 24i$ y anti-CD14, cada uno acoplado a perlas magnéticas (Miltenyl Biotec, Auburn, CA), de forma secuencial para aislar los linfocitos NKT $V\alpha 24i$ y las células CD14 de leukopaks. Se generaron células dendríticas inmaduras a partir de las células CD14 después de una incubación de 2 días en presencia de 300 U/ml de GM-CSF (R & D Systems) y 100 U/ml de IL-4 (R & D Systems). Después de la irradiación con 2.000 rad, se cultivaron las células dendríticas inmaduras junto con células CD161 singénicas en presencia de 100 ng/ml de α -GalCer o C11 y 50 U/ml de IL-2 (Invitrogen) durante 10-14 días. Tras la estimulación de los linfocitos NKT $V\alpha 24i$ una segunda vez con 100 ng/ml de células dendríticas inmaduras irradiadas pulsadas con α -GalCer o C11 para generar linfocitos iNKT pulsados con α -GalCer o pulsados con glucolípidos de fenilo, respectivamente. Se mostraron todas las líneas de linfocitos iNKT (preinmunes, pulsadas con α -GalCer o pulsadas con glucolípidos de fenilo) mediante citometría de flujo para expresar el receptor de antígeno de linfocitos T $V\alpha 24i$ (95 % de pureza). Se aislaron los linfocitos NK y NKT de leukopaks humanos usando microperlas anti-CD56 (Miltenyl Biotec, EE.UU.).

Se realizó la generación de las líneas de linfocitos NKT humanos pulsados con análogo de α -GalCer de acuerdo con los métodos de Fujio *et al*, y se usaron estas células para evaluar la respuesta de las citocinas a los análogos de α -GalCer estudiados (véanse las Figuras 5 y 6). Se obtuvieron células DC inmaduras de células CD14 $^+$ de leukopaks después de una incubación de dos días con 300 U/ml de GM-CSF y 100 U/ml de IL-4. Después de la irradiación (3.000 rad), se cultivaron las DC inmaduras junto con células CD161 $^+$ autólogas en presencia de 100 ng/ml de α -GalCer y 10 U/ml de IL-2 durante 10 días. Después de repetir esta estimulación, se generaron líneas de linfocitos NK y mostraron expresar CD161 $^+$ /CD3 $^+$ / $V\alpha 24i$ TCR $^+$ (99 % de pureza). Para generar DC derivadas de monocitos humanas inmaduras, se cultivaron células CD14 $^+$ en leukopaks en presencia de 300 U/ml de GM-CSF y 100 U/ml de IL-4 durante 6 días. Estas DC tenían un fenotipo inmaduro (CD14 $^+$ CD80 $^+$ CD86 $^+$ CD83 debil HLA $^+$ DR $^+$) y mostró una mayor expresión de CD1d que las DC maduras. Se pulsaron las DC inmaduras con diversos análogos de α -GalCer a 3 μ g/ml, y se examinaron su fenotipo y morfología 48 horas más tarde.

Se aislaron los NKT preinmunes (CD161 $^+$ /CD3 $^+$) usados para los experimentos de activación de TCR (véase la Figura 19) mediante el uso microperlas de múltiple clasificación anti-CD161 conjugadas indirectamente y se separaron adicionalmente mediante microperlas anti-CD3. Se incubaron las células aisladas en presencia de 100 U/ml de IL-2 y renovaron con medio recién preparado cada 3 días.

Ensayo de secreción de citocinas de linfocitos NKT humanos *in vitro*

Se cultivaron linfocitos NKT humanos $V\alpha 24i$ (1×10^5) junto con 5×10^4 células DC CD14 $^+$ inmaduras irradiadas en presencia de los análogos de α -GalCer a 10 μ g/ml en una placa de fondo plano de 96 pocillos. Se cuantificaron las citocinas/quimiocinas del sobrenadante recogido a las 18 h con el sistema de detección de múltiples citocinas Beadlyte $^{\text{®}}$ 22-plex para seres humanos y se determinaron con el sistema Luminex $^{\text{®}}$ 100TM.

Expansión *in vitro* de los iNKT

Se aislaron las células CD56⁺ humanas (mezclas NK/NKT) usadas para los experimentos de expansión de linfocitos iNKT (véanse las Figuras 13 y 14) de leukopaks humanos usando microperlas anti-CD56. Se cultivaron células CD56⁺ humanas (mezclas NK/NKT) con 4×10^5 DC CD14⁺ inmaduras autólogas pulsadas con los análogos de α -GalCer indicados a 3 μ g/ml o DMSO al 0,3 % el día 2 durante 18 horas (véanse las Figuras 13 y 14) o a 10 ng/ml el día 2 durante 18 horas (véase la Figura 15). El día 3, se transfirieron las células en suspensión a una nueva placa, se cultivaron en presencia de 100 U/ml de IL-2 y se renovaron con medio recién preparado cada 3 días. Se analizó la población de células CD161⁺/V α 24TCR⁺ de las mezclas NK/NKT por citometría de flujo el día 9, y se contó el número total de NKT V α 24i.

Activación de TCR de NKT humano

Se incubaron células HeLa, HeLa-CD1d o iDC autólogas en placas de 24 pocillos con C1, C11, C13 o C17 a 10 μ g/ml o con DMSO durante 2 h, y luego se añadieron 3×10^5 NKT CD161⁺/CD3⁺ preinmunes (véase la Figura 19). En otra realización ilustrativa, se cargaron células HeLa o HeLa-CD1d con C1, C16, C23, C8-5, C8-6 o C26 a 100 ng/ml o con DMSO durante 2 horas, y luego se añadieron 3×10^5 NKT CD161⁺/CD3⁺ preinmunes (véase la Figura 20). Después de 5-10 minutos de estimulación, se transfirieron las células en suspensión a tubos, se lavaron con PBS y se lisaron con tampón de lisis universal de señalización celular Beadlyte[®] a 4 °C. Se evaluaron las concentraciones de fosfo-CD3 ϵ (fosfo-tirosina), fosfo-ERK1/2 (Thr185/Tyr187), fosfo-CREB (Ser133), fosfo-Syk (fosfo-tirosina), fosfo-p38 (Thr180/Tyr 182), fosfo-I κ B α (Ser32), fosfo-Lck, fosfo-Lat, fosfo-STAT3 (Ser727), fosfo-STAT5 A/B (Tyr 694/699) y fosfo-Dap-70 (fosfo-tirosina) de los lisados mediante el sistema de detección de fosfoproteínas Beadlyte[®] de acuerdo con el protocolo de ensayo, y se determinaron mediante un sistema Luminex100. El valor se normalizó con la cantidad de proteína total de entrada.

Ensayo *in vitro* de tetrámero de CD1d

Se incubó 1 μ g proteína de fusión CD1d-IgG1 de ratón divalente soluble (tetrámeros de CD1d-IgG1 de ratón, BD Pharmingen) durante la noche con 10 mol de cada análogo de α -GalCer a 37 °C y a pH neutro de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se incubaron tetrámeros de CD1d-IgG1 cargados de glucolípido con NKT de ratón a 4 °C durante 60 min, tras lo que se incubaron con anticuerpo monoclonal IgG1 anti-ratón acoplado a FITC (A85-1). Los linfocitos también se tiñeron superficialmente con un anticuerpo monoclonal anti-NK acoplado a PE y anti-CD3 acoplado a APC (BD Pharmingen).

Preparación de esplenocitos de ratón

Se sacrificaron ratones BALB/c tratados con los análogos de α -GalCer indicados o vehículo a las 72 h después de la inyección. Se extirparon los bazo. En resumen, tras presionar el bazo a través de un filtro de 70 μ m y la lisis de los eritrocitos, se volvieron a suspender las células nucleadas en solución salina equilibrada de Hank y se centrifugaron a 300 g durante 5 min a 4 °C, y luego se sometieron a análisis FACS.

Determinación de subpoblaciones de esplenocitos de ratones

Se trataron ratones BALB/c con los análogos de α -GalCer indicados (2 μ g por ratón) o vehículo (DMSO al 1 % en PBS) y se sacrificaron a las 72 h y se extirparon los bazo. En resumen, tras presionar el bazo a través de un filtro de 70 μ m y la lisis de los eritrocitos, se volvieron a suspender las células nucleadas en solución salina equilibrada de Hank y se centrifugaron a 300 g durante 5 min a 4 °C, y luego se sometieron a análisis FACS. El anti-CD3e-aloficocianina, anti-CD4-PE, anti-CD8 α -aloficocianina-cianuro-colorante 7, anti-DC11c-aloficocianina, anti-CD23-PE, anti-45R-aloficocianina, anti-CD69-FITC, anti-CD80-FITC, anti-CD86-PE, anti-Ly6G-PE y U5A2-13Ag⁺-PE se obtuvieron de BD Bioscience-Pharmingen.

Determinación de subpoblaciones de NKT y NK de esplenocitos de ratón

Se trataron ratones BALB/c con los análogos de α -GalCer indicados (0,1 μ g/ratón) o vehículo (DMSO al 0,1 % en PBS), y se sacrificaron a las 72 h, y se extrajo el bazo. En resumen, tras presionar el bazo a través de un filtro de 70 μ m y la lisis de los eritrocitos, se volvieron a suspender las células nucleadas en solución salina equilibrada de Hank y se centrifugaron a 300 g durante 5 min a 4 °C, y luego se sometieron a análisis FACS. El anti-CD3e-aloficocianina y marcador de NK U5A2-13Ag⁺-PE se obtuvieron de BD Bioscience-Pharmingen.

Citocinas/quimiocinas en suero

Se recogieron muestras de suero de ratón a las 0, 2, 18, 36, 48 y 72 h de la administración de vehículo o análogos de α -GalCer sintéticos. Se midieron las concentraciones en suero de diversas citocinas/quimiocinas mediante el sistema de detección de múltiples citocinas Beadlyte[®] 21-plex para ratón y se leyeron con el sistema Luminex[®].

100TM.

Modelo cáncer de pulmón en ratones

- 5 Ratones C57BL/6 (6-8 semanas, hembra) recibieron por inyección IV 2×10^5 células de cáncer de pulmón singénicas (TC1) suspendidas en 0,1 ml de PBS. A la hora, se trataron los grupos de ratones C57BL/6 ($n = 5$) con los análogos de α -GalCer indicados IV ($2 \mu\text{g}$ por ratón) o vehículo dos veces a la semana durante cuatro semanas. Se registró el peso corporal durante un mes y se monitorizó la supervivencia durante 50 días.

Modelo cáncer de mama en ratones

- 10 Ratones BALB/C (6-8 semanas, hembra) recibieron por inoculación 2×10^5 células de cáncer de mama singénicas (4T1) SubQ en la parte lumbar derecha. Se trataron los grupos de ratones BALB/c ($n = 6$) IV o SubQ con los análogos de α -GalCer indicados o vehículo dos veces a la semana durante cuatro semanas 3 días después de la inoculación del tumor. Los análogos de α -GalCer se inyectaron en un sitio distal al sitio de la inoculación del tumor.
- 15 Se registró el volumen del tumor cada 3 días durante un mes midiendo con un calibrador a lo largo del eje largo (a), del eje corto (b) y de la altura (c). Los volúmenes tumorales (mm^3) se calcularon mediante la fórmula: $a \times b \times c$, y la supervivencia se monitorizó durante 70 días.

Evaluación en tiempo real del crecimiento tumoral en ratones

- Se obtuvieron imágenes de los ratones y se analizaron con la serie IVIS[®] 200 y el programa informático Living Image[®] de Xenogen (Xenogen, EE.UU.). En el modelo de melanoma, los ratones C57BL/6 (6-8 semanas, hembra) recibieron por inyección intravenosa 2×10^5 células de melanoma singénico (B16) suspendidas en 0,1 ml de PBS.
- 25 Después de 3 días, se trataron los grupos de ratones C57BL/6 ($n = 5$) por vía intravenosa con glucolípidos bajo el protocolo terapéutico indicado. Se registró el volumen del tumor cada tres días durante 24 días.

Infiltración de linfocitos mediante análisis de citometría de flujo

- 30 Se extirparon, en condiciones asépticas, los tumores de los ratones tratados con el control y con glucolípidos 21 días después de la implantación del tumor, y se cortaron manualmente en pedazos de 2-3 mm en una placa de cultivo de Petri. A continuación, se digirieron los pequeños fragmentos de tejido con DNasa al 0,01 %, hialuranidasa al 0,01 % y colagenasa al 0,1 % (todos de Sigma Chemical Co.) en medio RPMI 1640 durante 2-3 horas a 37 °C con agitación continua. Se lavaron las suspensiones de células individuales resultantes dos veces con FCS al 0,1 % en PBS y se
- 35 tiñeron por métodos convencionales de citometría de flujo. Para detectar las subpoblaciones de linfocitos infiltrantes en estos tejidos, se usaron los siguientes anticuerpos conjugados para FACS: FITC-anti-CD3, PE-anti-NK, APCCy7-anti-CD8 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA).

Tinción inmunohistoquímica

- 40 Se extrajeron los nódulos pulmonares de ratones B6 que habían recibido por inyección i.v. 2×10^5 linfocitos tumorales TC1 durante 3 semanas, y luego se sacrificaron para hacer cortes introducidos en parafina. Se trataron los cortes de 3 μm de espesor en horno a 56 °C durante la noche seguido de la desparafinación y de la recuperación de los antígenos mediada por calor (en tampón Tris-EDTA a pH 9 a 121 °C durante 7,5 minutos), y se incubaron con anticuerpo anti-CD45RA (clon RA3-6B2; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) como un indicativo de antígenos de linfocitos común a una titulación de 1:100 a 4 °C durante la noche. Se detectó el anticuerpo primario unido mediante la adición de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante y sustrato DAB. Todas las secciones se contratiñeron con hematoxilina antes del montaje.

Análisis estadístico

- Se usó ensayo t de student de dos colas para muestras no relacionadas para analizar los datos con el programa PRISM. Los gráficos muestran los valores medios de los experimentos por triplicado, y las barras de error representan la DE. Se analizaron las diferencias en la protección del tumor de cada grupo mediante la prueba de rangos logarítmicos. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.
- 55

Estudios de la eficacia antibacteriana

Análogos de α -GalCer glucolípidicos

- 60 En la Figura 2, se muestran las estructuras de los análogos de α -GalCer usados en los estudios antibacterianos, C3, C9, C11 y C14-C17. Se prepararon soluciones madre de análogos de α -GalCer como soluciones de 1 mg/ml de DMSO. Los análogos de α -GalCer se diluyeron con tampón fosfato salino (PBS) a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antes de su uso.

65

Animales y bacterias

Para los estudios, se usaron ratones C57L/6 y BALB/c-Byl hembra de 6-8 semanas de vida. Los animales fueron alojados en jaulas de plástico con acceso libre a comida y agua, y se dejaron aclimatar al menos una semana antes del inicio de los experimentos. La cepa bacteriana de *Sphingomonas capsulate* (ATCC 14666) se obtuvo de BCRC, Taiwán. La cepa bacteriana de *Klebsiella pneumoniae* (NTUH-KP2044) fue un obsequio del Dr. J. T. Wang, National Taiwan University Hospital, Taiwán.

Estudio de eficacia antibacteriana usando ratones infectados por *Sphingomonas capsulate*

Ratones C57BL/6 hembra de seis a ocho semanas de vida recibieron por inyección IP 5×10^8 células de *Sphingomonas capsulate*. Los ratones se agrupan en grupos de tratamiento y de control con 4-6 ratones por grupo. Cuatro horas después de la infección, los ratones del grupo de tratamiento recibieron por inyección IP los análogos de α -GalCer de ensayo a 50 o 100 $\mu\text{g/kg}$, y los ratones del grupo de control recibieron por inyección los mismos volúmenes de PBS. Veinticuatro horas después de la infección bacteriana, se sacrificaron los ratones de todos los grupos. Se extirpó el hígado de los ratones y se homogenizaron en NaCl al 0,9 %, Tween 80 al 0,02 % usando homogeneizadores de tejidos. Se determinaron las unidades de formación de colonias (UFC) de *Sphingomonas capsulate* en homogenizados de hígado mediante la siembra de muestras diluidas en placas de nutrientes. El recuento de las colonias se realizó después de la incubación durante 48 horas a 37 °C.

Estudio de eficacia antibacteriana usando ratones infectados por *K. pneumoniae*

Ratones hembra BALB/c-Byl (diez ratones por grupo) recibieron una sola dosis (10^6 UFC) de *K. pneumoniae* vivas por sonda oral. Los ratones de los grupos de tratamiento recibieron por inyección los análogos de α -GalCer de ensayo a 100 $\mu\text{g/kg}$ dos veces a las 4 horas y a las 8 horas de la infección bacteriana. Los ratones del grupo de control recibieron por inyección PBS a las 4 y 8 horas. Veinticuatro horas después de la infección, se sacrificaron todos los ratones. Se extirparon tanto el hígado como los pulmones de cada ratón, y se homogenizaron. Los recuentos bacterianos se determinaron de manera similar a la descrita anteriormente.

Análisis estadístico

Las eficacias comparativas de los análogos de α -GalCer ensayados se ilustraron mediante la comparación de los valores de UFC de los órganos de los grupos de tratamiento con los de los grupos de control, y la significación de la eficacia se indicó en los valores de p de $< 0,05$ o $< 0,01$, respectivamente.

Agentes de ensayo de glucolípidos

En la Figura 64 (A-B), se muestran las estructuras de los glucolípidos y sus nombres de código usados. Se prepararon soluciones madre de glucolípidos como 1 mg/ml de soluciones de DMSO. Se diluyeron los compuestos con tampón fosfato salino (PBS) a 10-30 $\mu\text{g/ml}$ y se usaron para los estudios con animales.

Ratones, virus y bacterias usados

Para los estudios, se usaron ratones C57L/6 y BALB/c de 6-8 semanas de vida. Los ratones fueron alojados en jaulas de plástico con acceso libre a comida y agua, y se dejaron aclimatar al menos una semana antes del inicio de los experimentos. Los virus usados en este estudio son la cepa WSN de la gripe (A/WSN/1933/H1N1) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV, cepa RP-9) como se ha descrito previamente. La cepa bacteriana *Sphingomonas capsulate* (ATCC 14666) se obtuvo de BCRC, Taiwán. La *Staphylococcus aureus* luminiscente Xen29 se adquirió en Xenogen Corporation (CA, EE.UU.). Todos los estudios con animales fueron aprobados por el Comité de estudios con animales de la Academia Sinica, y se realizaron de acuerdo con las directrices. Los ratones inmunodeficientes usados en este estudio son como se han descrito anteriormente.

Estudio de eficacia antibacteriana usando ratones infectados por *Sphingomonas capsulate*

Ratones C57BL/6 hembra de seis a ocho semanas de vida recibieron por inyección intraperitoneal 5×10^8 células de *Sphingomonas capsulate*. Los ratones se agrupan en grupos de tratamiento y de control con 5-10 ratones por grupo. De tres a cuatro horas después de la infección, los ratones del grupo de tratamiento recibieron por inyección intraperitoneal los glucolípidos de ensayo a 50 o 100 $\mu\text{g/kg}$, y los ratones del grupo de control recibieron por inyección los mismos volúmenes de PBS. Veinticuatro horas después de la infección bacteriana, se sacrificaron los ratones de todos los grupos. Se extirpó el hígado de los ratones y se homogenizaron en NaCl al 0,9 %, Tween 80 al 0,02 % usando homogeneizadores de tejidos. Se determinaron las unidades de formación de colonias (UFC) de *Sphingomonas capsulate* en homogenizados de hígado mediante la siembra de muestras diluidas en placas de nutrientes. El recuento de las colonias se realizó después de la incubación durante 48 horas a 37 °C. Los resultados antibacterianos se analizaron mediante ANOVA de una vía para evaluar la significación de la diferencia en el grupo de tratamiento seguido por la prueba de Turkey posterior.

Estudio de eficacia antibacteriana usando *Staphylococcus aureus* luminiscente (X29) mediante análisis de imágenes

Se pesaron ratones Balb/C hembra, se agrupan y recibieron por inyección en el músculo cuádriceps posterior del muslo izquierdo 200 µl de PBS que contenía 3×10^8 UFC de *S. aureus* Xen29. En diferentes momentos después de la infección con Xen29, los ratones recibieron por inyección IP vehículo o glucolípidos como se describe. Se tomaron imágenes periódicas de los ratones usando el sistema de generación de imágenes IVIS (Xenogen Corporation, CA, EE.UU.) como se describe. Los resultados de las imágenes, en luminiscencia relativa, se analizaron mediante ANOVA de una vía para evaluar la significación de la diferencia en el grupo de tratamiento seguido por la prueba posterior de Turkey.

Modelo animal de infección por el virus de la encefalitis japonesa (JEV)

Se agruparon ratones C57/B56 de siete semanas de vida y se administraron por inyección glucolípidos en varios momentos a los ratones infectados por JEV. La infección se realizó mediante inyección IP con 5×10^5 UFP de la cepa RP-9 del JEV en 500 µl de PBS y la inyección simultánea por vía intracerebral de 50 µl de PBS (la vía IP más la vía IC) como se describe anteriormente. La supervivencia de los ratones se monitorizó diariamente. Se compararon las curvas de supervivencia de los grupos tratados con glucolípidos con el grupo de control usando el programa Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

Estudio en modelo animal contra la gripe

Para la evaluación de la eficacia *in vivo* de los análogos de α -GalCer, se trataron ratones Balb/c con C34 (siendo C34 de la presente invención) en diferentes momentos con respecto a la infección nasal usando DL_{50} de 10 del virus WSN. Se examinaron las supervivencias de los ratones de todos los grupos diariamente durante 14 días después de la infección. Se compararon las curvas de supervivencia de los grupos tratados con glucolípidos con el grupo de control usando el programa Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

Inmunoprotección contra la infección por el virus de la gripe aviar mediante inyección intramuscular de dos dosis de la vacuna pCHA5 ± glucolípido

Se vacunaron los ratones con pCHA5 (30 µg) ± glucolípidos (1 µg) por vía IM y recibieron un refuerzo de pCHA5 solo dos semanas más tarde. Dos semanas después de la inyección de refuerzo, se extrajeron los sueros y se ensayaron para determinar los títulos de anticuerpos específicos de HA mediante ELISA (Fig. 73A), y se expusieron los ratones a una DL_{50} de 200 del virus NIBRG-14, y se monitorizó su supervivencia (Fig. 73B).

Vacunación intramuscular individual de pCHA5 con y sin glucolípidos

Se potenciaron las respuestas inmunes y la supervivencia de los ratones tras una sola dosis IM de pCHA5 usando glucolípidos como adyuvantes. Se vacunaron los ratones con pCHA5 (50 µg) ± glucolípidos (2 µg) o alumbre por vía IM. Tres semanas después de la vacunación, se extrajeron los sueros y se analizaron los títulos de anticuerpos específicos de HA mediante ELISA (Fig. 74A). Al mismo tiempo, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los esplenocitos para el ensayo de ELISPOT (Fig. 74B). Otro grupo de ratones se expuso a una DL_{50} de 200 de virus NIBRG-14 y se monitorizó su supervivencia (Fig. 74C).

Comparación de los efectos adyuvantes de los glucolípidos para la vacuna de pCHA5 y de pCHA5-II

Se vacunaron los ratones con pCHA5 o pCHA5-II (30 µg) ± glucolípidos (2 µg) por vía IM/EP en las 0 y tres semanas. Dos semanas después de la inyección de refuerzo, se extrajeron los sueros y se ensayaron los títulos de anticuerpos anti-HA por ELISA (Fig. 75A), y los ratones que fueron vacunados con pCHA5 (Fig. 75B) y pCHA5-II (Fig. 75C) fueron expuestos al virus E319, monitorizándose su supervivencia.

Efectos de la dosis de pCHA5-II y C34 sobre la producción de anticuerpos específicos de HA y la protección inmune en ratones

Se vacunaron los ratones con una sola dosis de pCHA5-II (100, 75, 50 µg) con o sin C34 (0,5, 1, 2, 4 µg) como adyuvante por vía IM. Tres semanas después de la vacunación, se extrajeron los sueros y se ensayaron los títulos de los anticuerpos específicos de HA mediante ELISA (Fig. 76A). Al mismo tiempo, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los esplenocitos para el ensayo de ELISPOT (Fig. 76B). Mientras tanto, otros grupos de ratones fueron expuestos al virus NIBRG-14 y se monitorizaron las supervivencias. La Fig. 76C muestra las supervivencias de los ratones tratados con diferentes dosis de pCHA5-II y 2 µg de adyuvante C34. La Fig. 76D muestra las supervivencias de los ratones tratados con 100 µg de pCHA5-II y C34 a varias dosis.

Efecto adyuvante de C34 en la producción de anticuerpos de neutralización contra varios virus de pseudotipo HA

- 5 Se vacunaron ratones BALB/c hembra IM/EP con 0,2 µg de pCHA5 disuelto en PBS que contenía 2 µg de C34 en las semanas 0 y 3. Se extrajeron los sueros 2 semanas después de la última vacunación y se examinaron mediante ensayo de neutralización de los virus de pseudotipo HA. Los datos se presentaron como diluciones de suero que daban el 50 % de neutralización de los virus de pseudotipo HA (DI₅₀). En este ensayo, se usaron los virus de pseudotipo HA TK (Fig. 77A), VN1194 (Fig. 77B), ID05 (Fig. 77C) y Anhui05 (Fig. 77D). Se usó un análisis de regresión lineal para examinar el ajuste de los datos. El valor de p fue la comparación de los ajustes. *p < 0,05, presentando significación estadística al comparar el grupo de adyuvante C34 con el grupo de solo pCHA5.

Perfiles de expresión de las citocinas en suero en ratones que recibieron pCHA5 con o sin C34 como adyuvante

- 15 Se vacunaron ratones BALB/c hembra con 0,2 µg de pCHA5 con o sin C34 por vía IM/EP en la semana 0 y 3. Se extrajeron los sueros antes (0 h) y 20 h después de la segunda vacunación. Se ensayaron las concentraciones en suero de las citocinas mediante el sistema Luminex 200. *p < 0,05 mediante el ensayo t de student de dos colas para muestras no relacionadas cuando se comparó el grupo de adyuvante C34 con el grupo de solo pCHA5. #p < 0,05 mediante el ensayo t de student de dos colas para muestras no relacionadas al comparar las 0 h con las 20 h.
- 20 Los resultados se muestran con respecto a IL-2 (Fig. 78A), IL-5 (Fig. 78B), IL-13 (Fig. 78C), RANTES (Fig. 78D), MIP-1α (Fig. 78E), MIP-1β (Fig. 78F), KC (Fig. 78G), IL-1β (Fig. 78H), IL-17 (Fig. 78I), IL-12p40 (Fig. 78J), G-CSF (Fig. 78K) e IFN-γ (Fig. 78L).

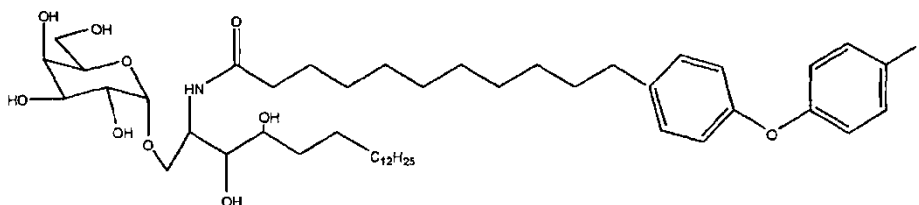
Capacidades de neutralización de los antisueros con inducción de C34 a través de la inyección intramuscular de una sola dosis

- 25 Se vacunaron ratones BALB/c hembra IM con 50 µg de pCHA5-II disuelto en PBS que contenía 2 µg de C34. Tres semanas más tarde, se recogieron los sueros y se examinaron mediante el ensayo de neutralización de los virus de pseudotipo HA. En este ensayo, se usaron los virus de pseudotipo HA TK, VN1194, ID5 y RG5. Los datos se representaron como DI₅₀. Se usó un análisis de regresión lineal para examinar el ajuste de los datos. El valor de p fue la comparación de los ajustes. *p < 0,05, presentando significación estadística al comparar el grupo de adyuvante C34 con el grupo de solo pCHA5-II. Los resultados se muestran con respecto a Anhui05 (Fig. 79A), TK05 (Fig. 79B), ID05 (Fig. 79C) y VN1194 (Fig. 79D).
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la estructura de fórmula 1:

(1)



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para su uso en medicina.

2. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 3. La composición de la reivindicación 2, en la que la composición está en forma de una vacuna y el compuesto de fórmula 1 funciona como un adyuvante.

4. La composición de la reivindicación 3, en la que la vacuna comprende un agente vacunal y en la que el agente vacunal se selecciona del grupo que consiste en: un microorganismo muerto; un microorganismo viral vivo atenuado; un toxoide; un fragmento de microorganismo inactivado o atenuado; ADN; una proteína; una glucoproteína; un
15 sacárido; una combinación de los marcadores en células cancerosas; y una combinación de los marcadores en microorganismos.

5. La composición de las reivindicaciones 3 y 4, en la que la composición genera una eficacia de neutralización
20 contra el virus de la gripe H5N1, en la que el virus de la gripe H5N1 se selecciona preferentemente entre al menos uno de: virus de la gripe H5N1 de tipo silvestre (E319); TK05; VN1194; ID05; Anhui05; pCHA5; y pCHA5-II.

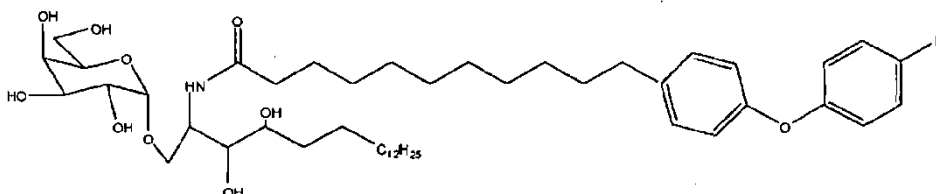
6. La composición de la reivindicación 2 para su uso en inmunoterapia antitumoral, en la que la composición está
25 preferentemente en forma de una vacuna contra el cáncer y en la que el cáncer se selecciona preferentemente del grupo que consiste en: cáncer de pulmón; cáncer de mama; hepatoma; leucemia; tumor sólido y carcinoma.

7. La composición de la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento o en la profilaxis de una infección viral o
bacteriana, en la que la infección está causada preferentemente por uno del grupo seleccionado entre: *Sphingomonas capsulate*; virus de la encefalitis japonesa; *Staphylococcus aureus*; y gripe.
30

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en la que la composición está formulada para que sea
adecuada para su administración por una vía seleccionada entre: subcutánea, intravenosa, intranasal, intramuscular
y oral.

35 9. Un método de síntesis de un compuesto representado por la estructura de fórmula 1:

(1)



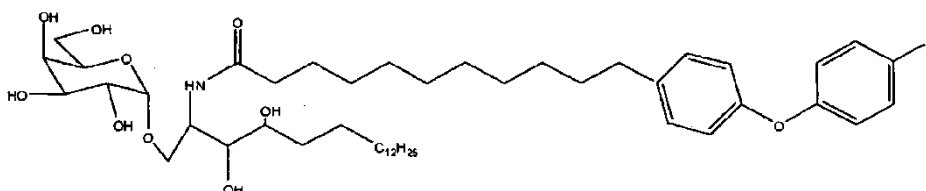
que comprende:

40 proteger selectivamente los grupos 2,3-dihidroxi de D-lixosa con 2-metoxipropeno en presencia de ácido, dando un producto intermedio de actónido;
someter un grupo hidroxilo primario del producto intermedio de actónido a cloruro de tritilo y condiciones básicas, dando un producto intermedio de tritiléter;
hacer reaccionar el producto intermedio de tritiléter con $C_{13}H_{27}^+PPh_3^-Br$ mediante olefinación de Wittig en presencia de hexametildisilazida de litio (LHMDS), mediante lo que se produce un producto intermedio de

alqueno con una proporción de *E/Z* de 2:1 según la caracterización por espectrometría de RMN de ^1H ;
 hidrogenar el producto intermedio de alqueno, dando un alcano;
 activar un grupo hidroxilo del alcano mediante anhídrido de triflato y 2,6-lutidina, dando un producto intermedio de triflato;
 5 hacer reaccionar el producto intermedio de triflato con azida de tetrametilguanidinio (TMGA) mediante la reacción de $\text{S}_{\text{N}}2$, dando un compuesto de azido con la configuración invertida;
 retirar el grupo tritilo del compuesto de azido mediante el uso de ácido trifluoroacético (TFA), dando fitoesfingosina;
 10 efectuar la glucosilación del derivado de galactosa donante y la fitoesfingosina aceptora usando anhídrido trifluorometanosulfónico (Tf_2O) y sulfuro de dimetilo (Me_2S) como potenciadores, dando un producto intermedio clave que tenga un grupo azido;
 reducir el grupo azido del producto intermedio clave usando una reacción de Staudinger, dando un producto intermedio de amina; y
 15 acoplar el producto intermedio de amina con ácido graso usando EDC y HBTU.

10. Un compuesto de fórmula 1:

(1)

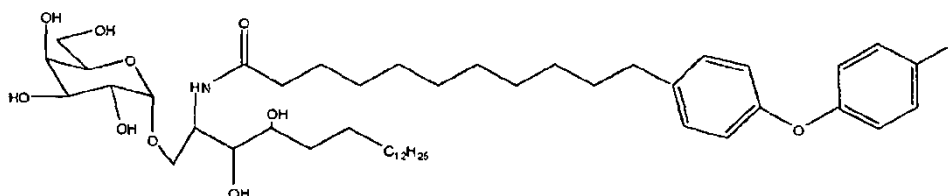


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento o en la profilaxis de una infección viral o bacteriana.

11. El compuesto de la reivindicación 10, en el que la infección está causada por uno del grupo seleccionado entre: *Sphingomonas capsulate*; virus de la encefalitis japonesa; *Staphylococcus aureus*; y gripe.

12. Un compuesto de fórmula 1:

(1)

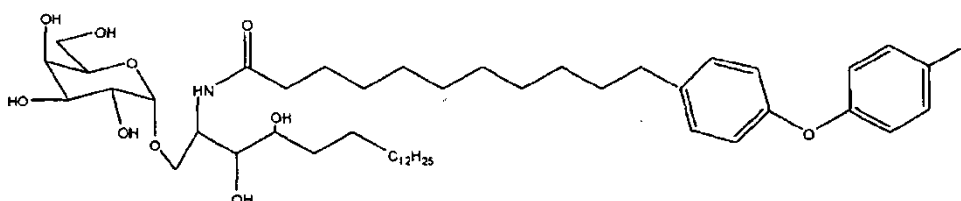


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer.

13. El compuesto de la reivindicación 12, en el que el cáncer se selecciona preferentemente del grupo que consiste en: cáncer de pulmón; cáncer de mama; hepatoma; leucemia; tumor sólido y carcinoma.

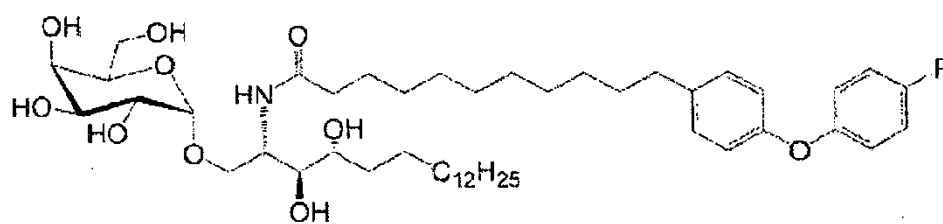
14. Un compuesto representado por la estructura de fórmula 1:

(1)

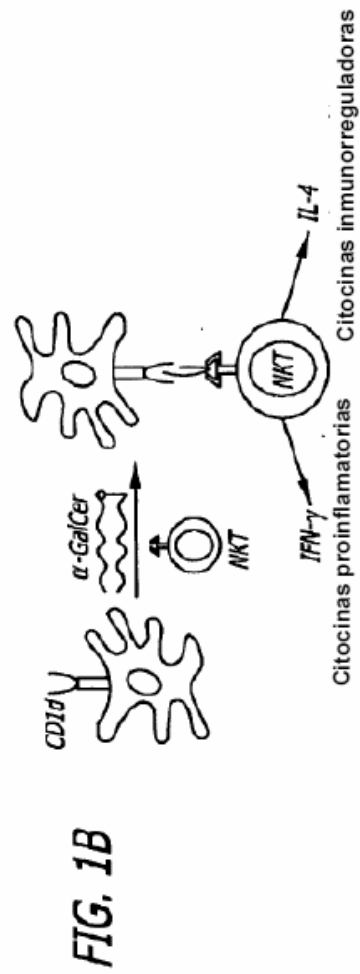
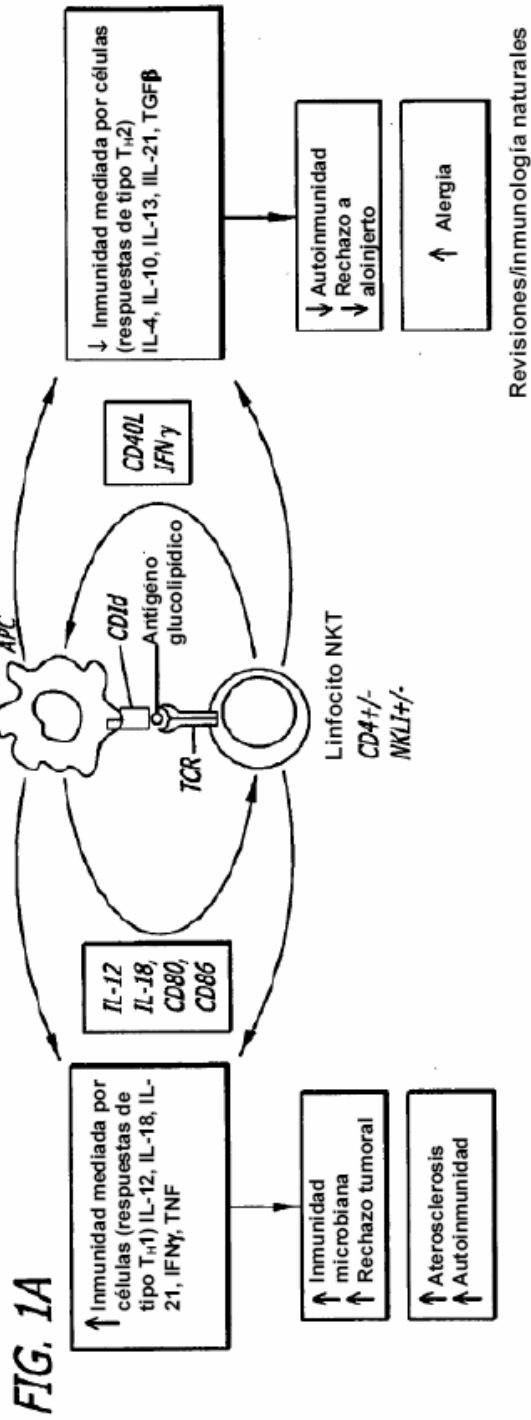


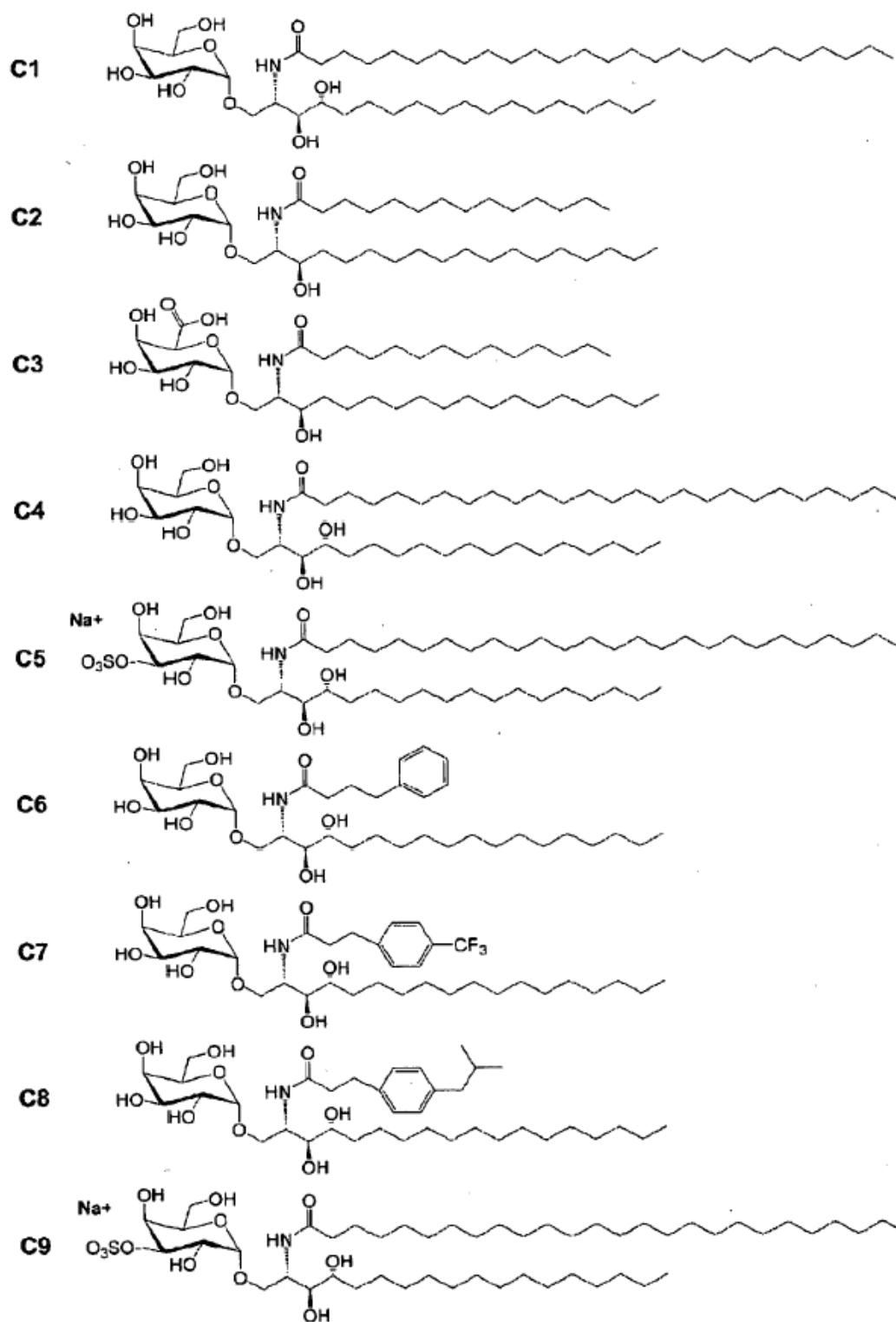
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 14 representado por la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



**FIG. 2-1**

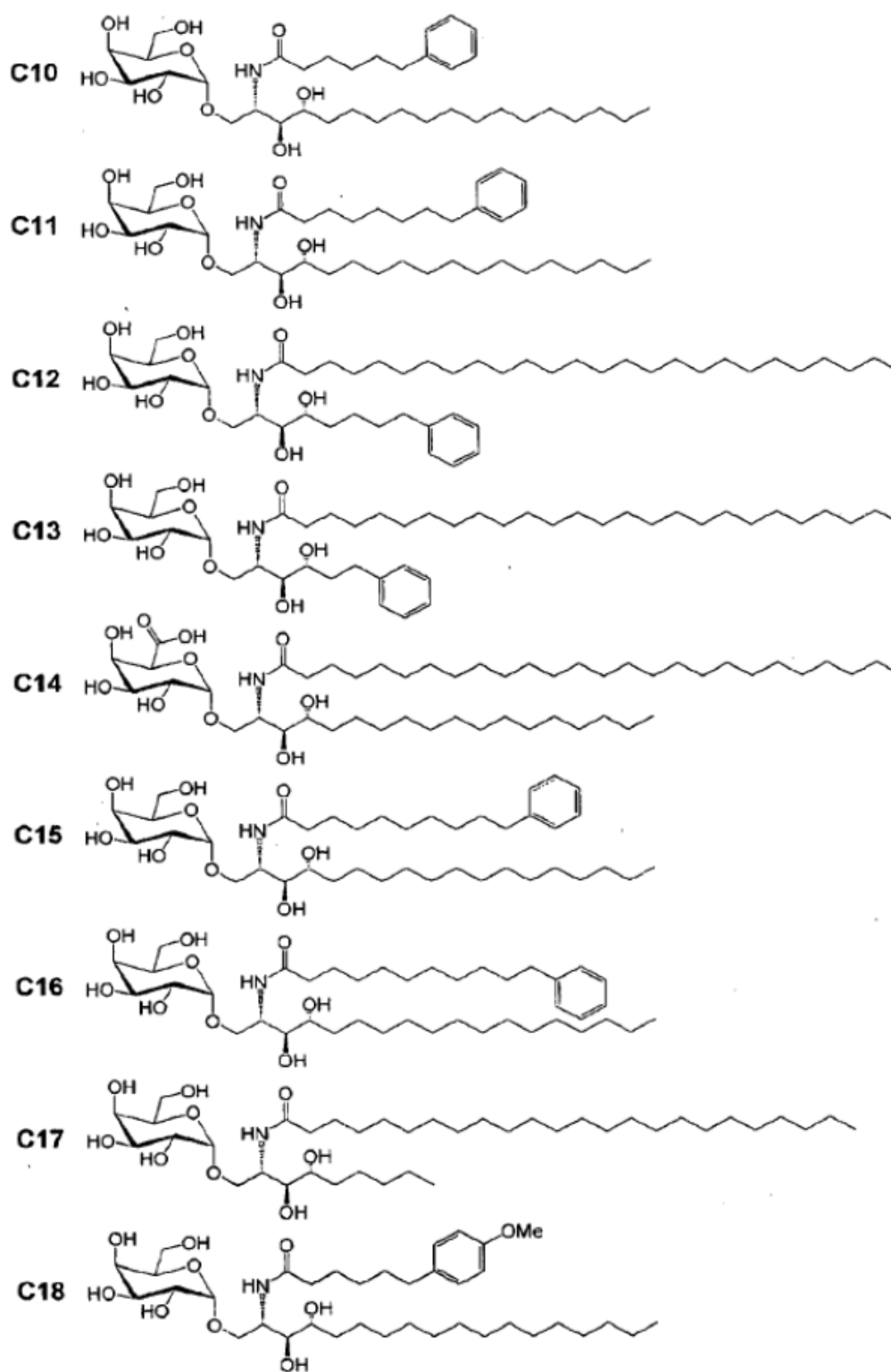


FIG. 2-2

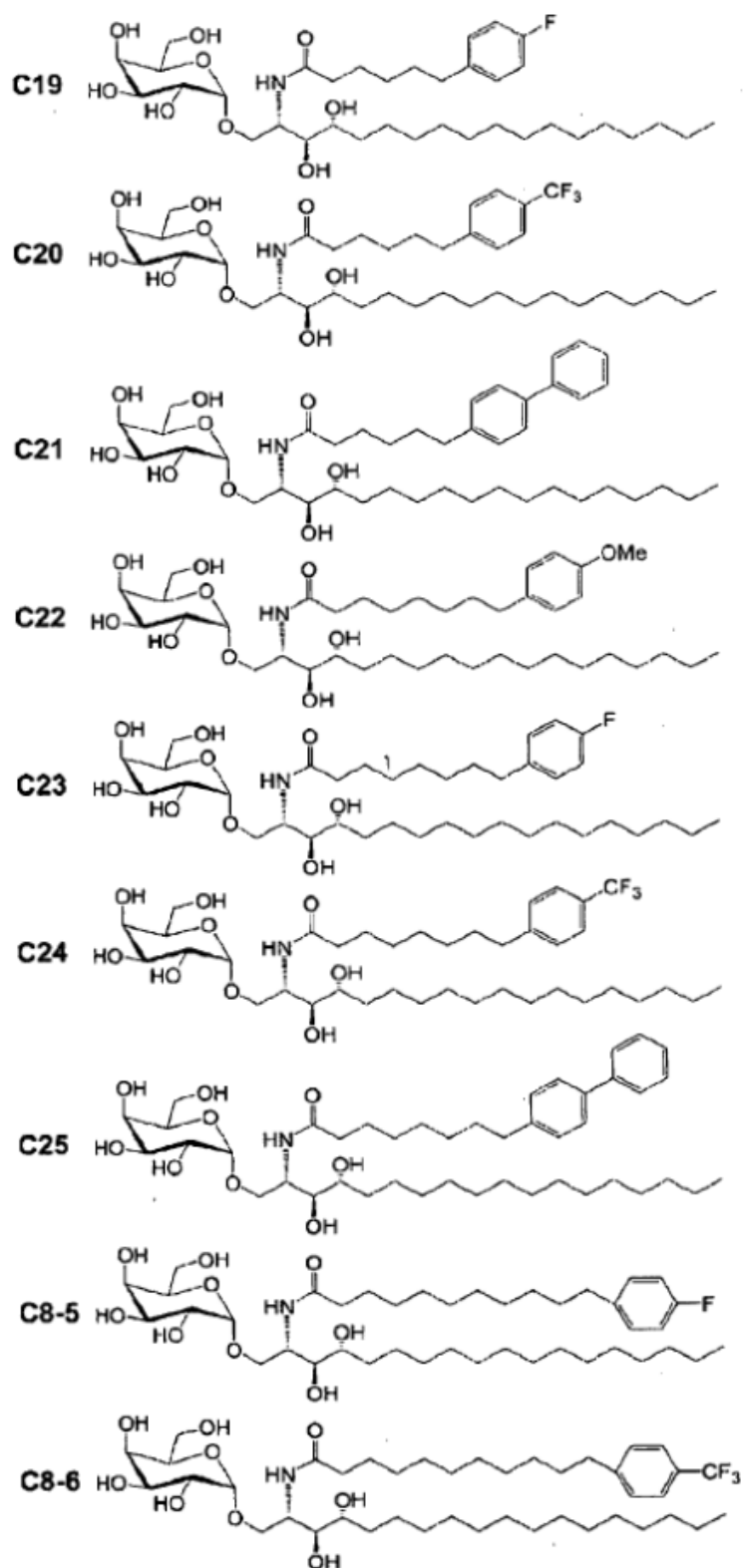


FIG. 2-3

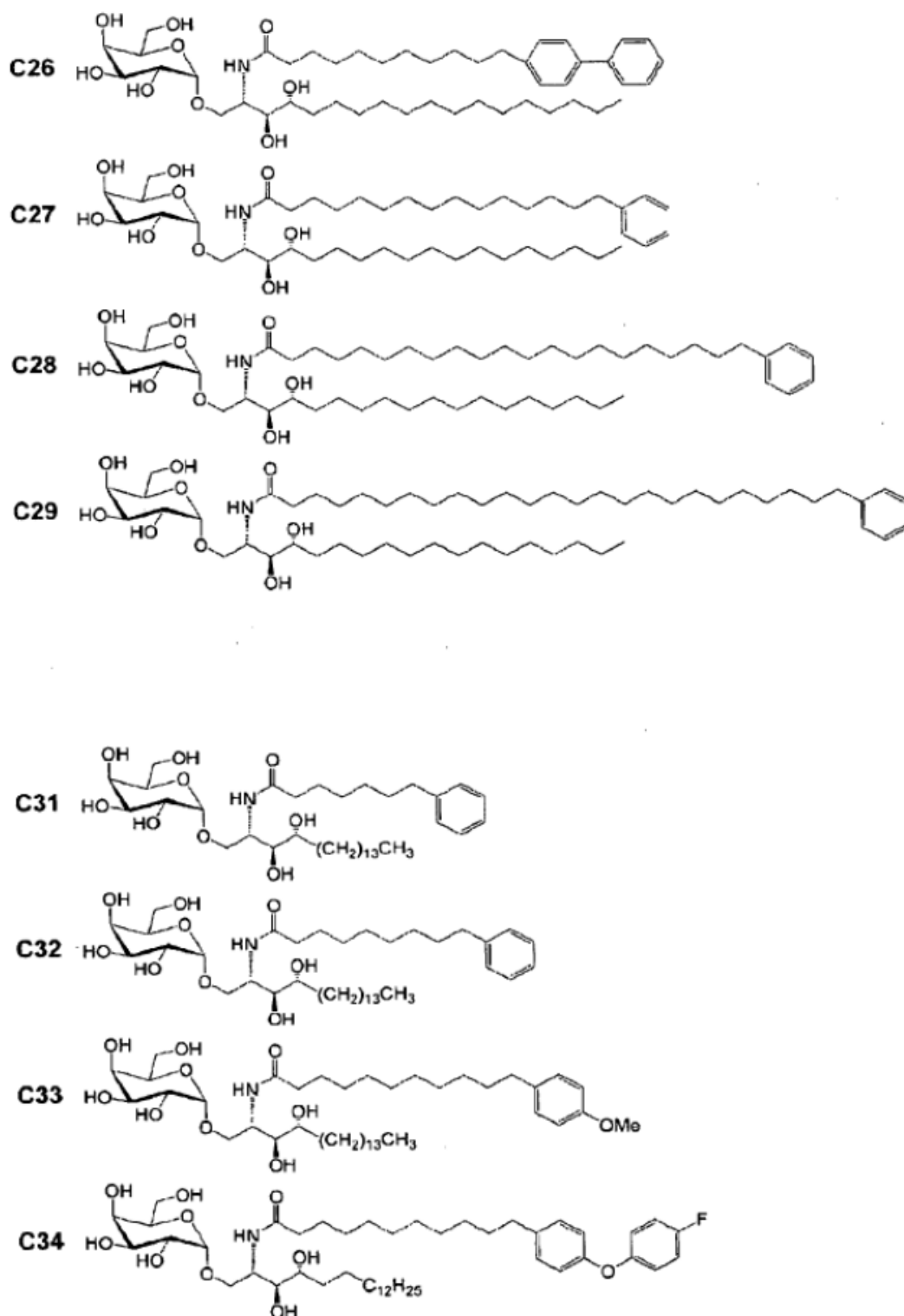
**FIG. 2-4**

FIG. 3

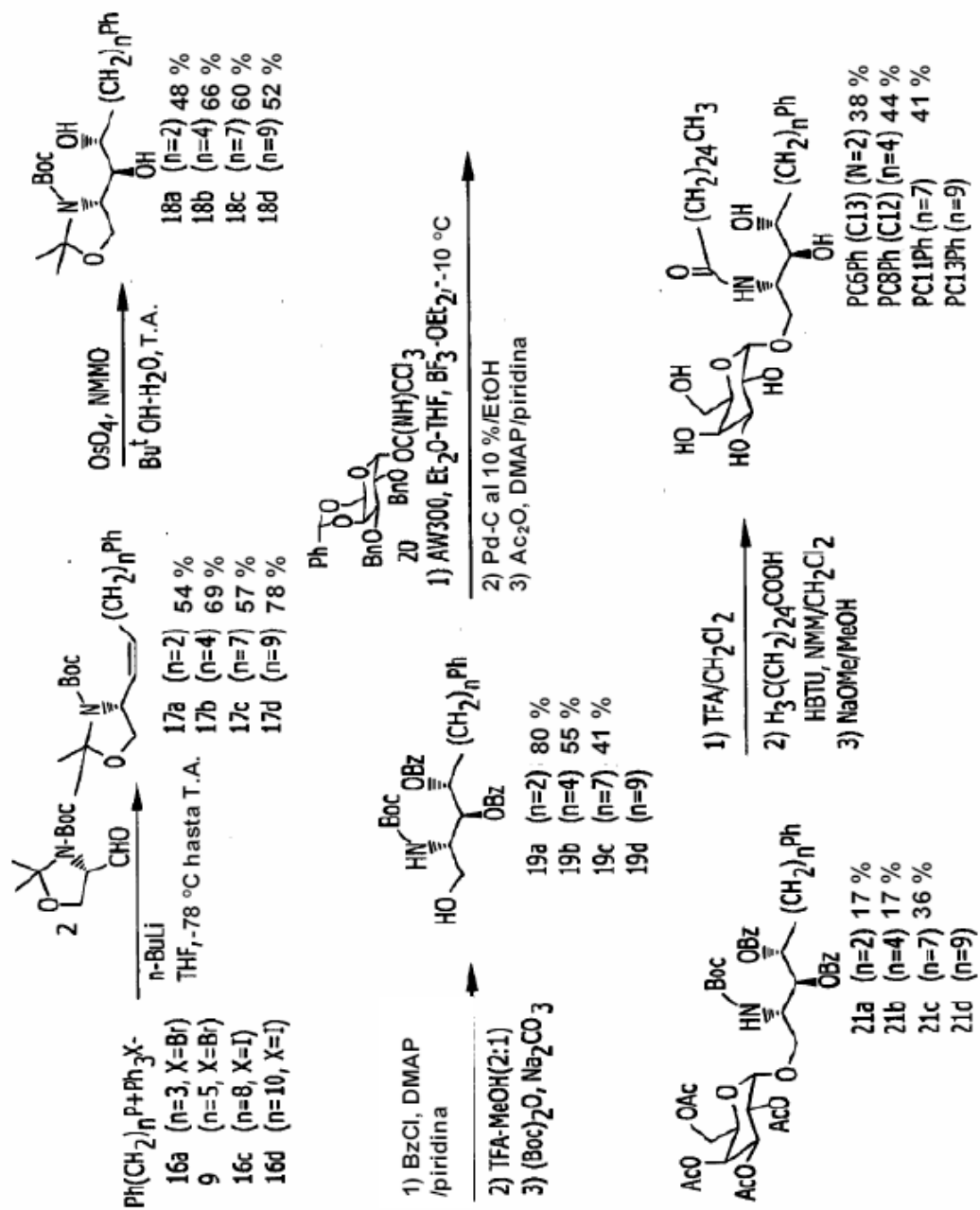
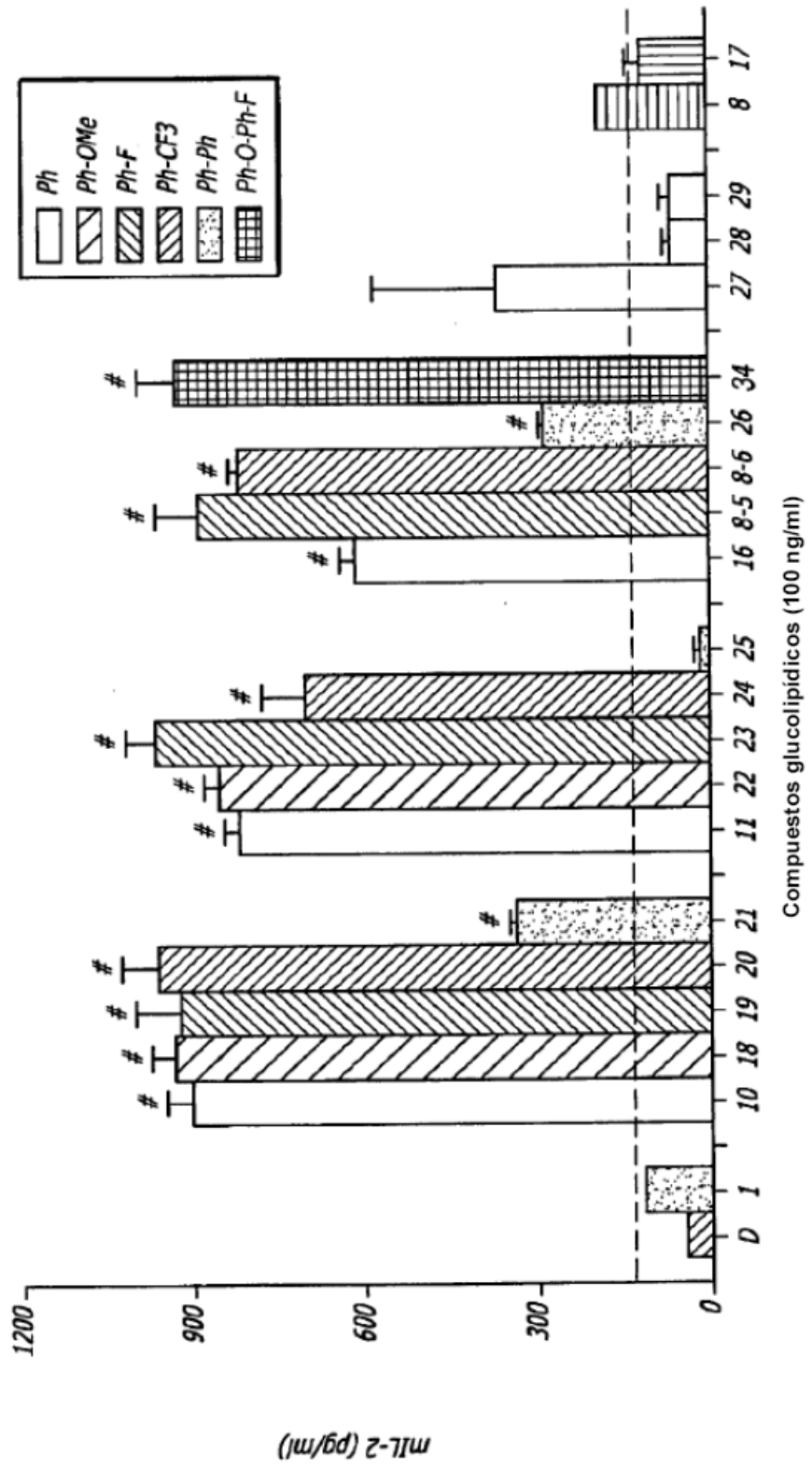


FIG. 4



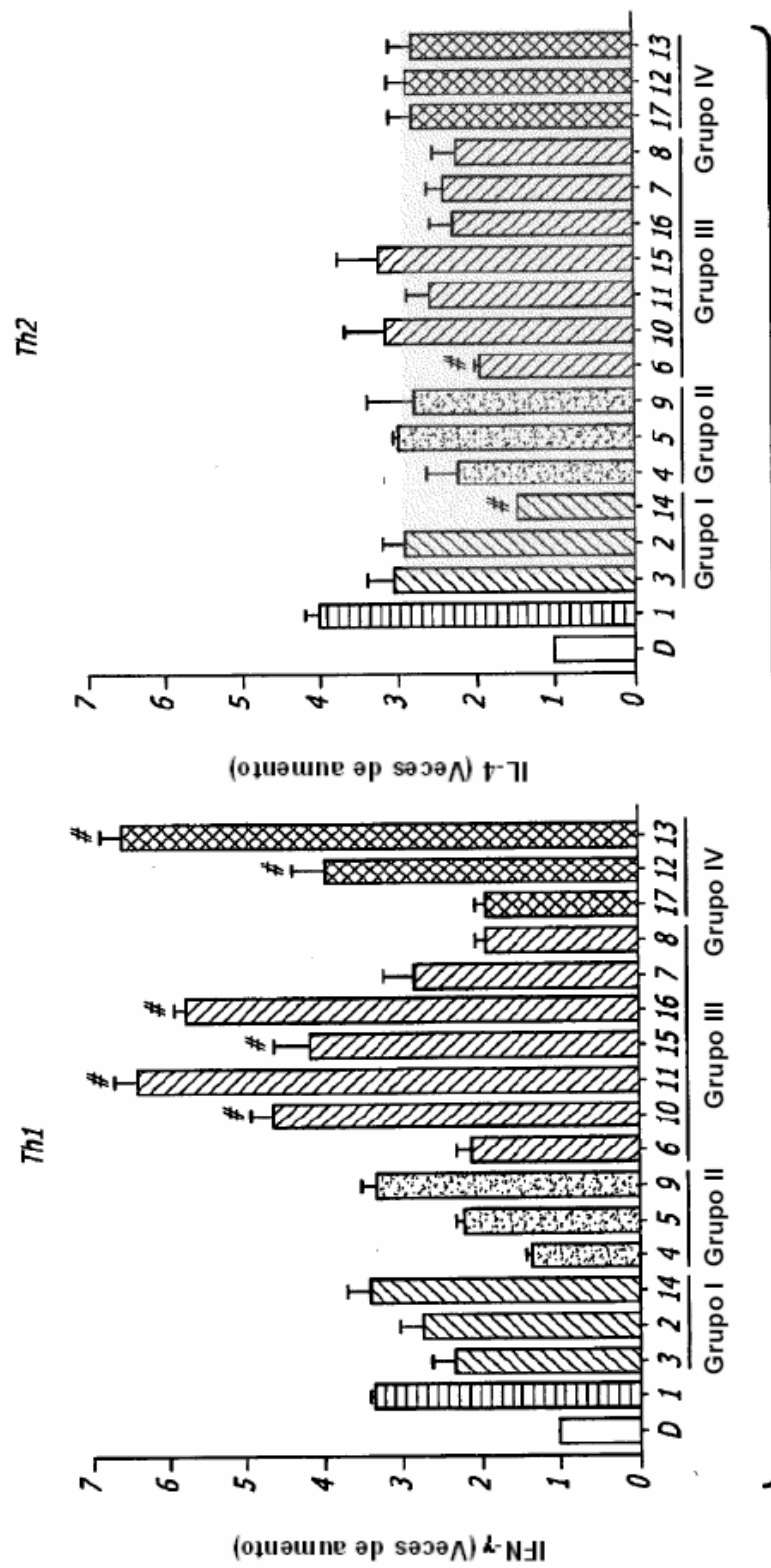


FIG. 5A

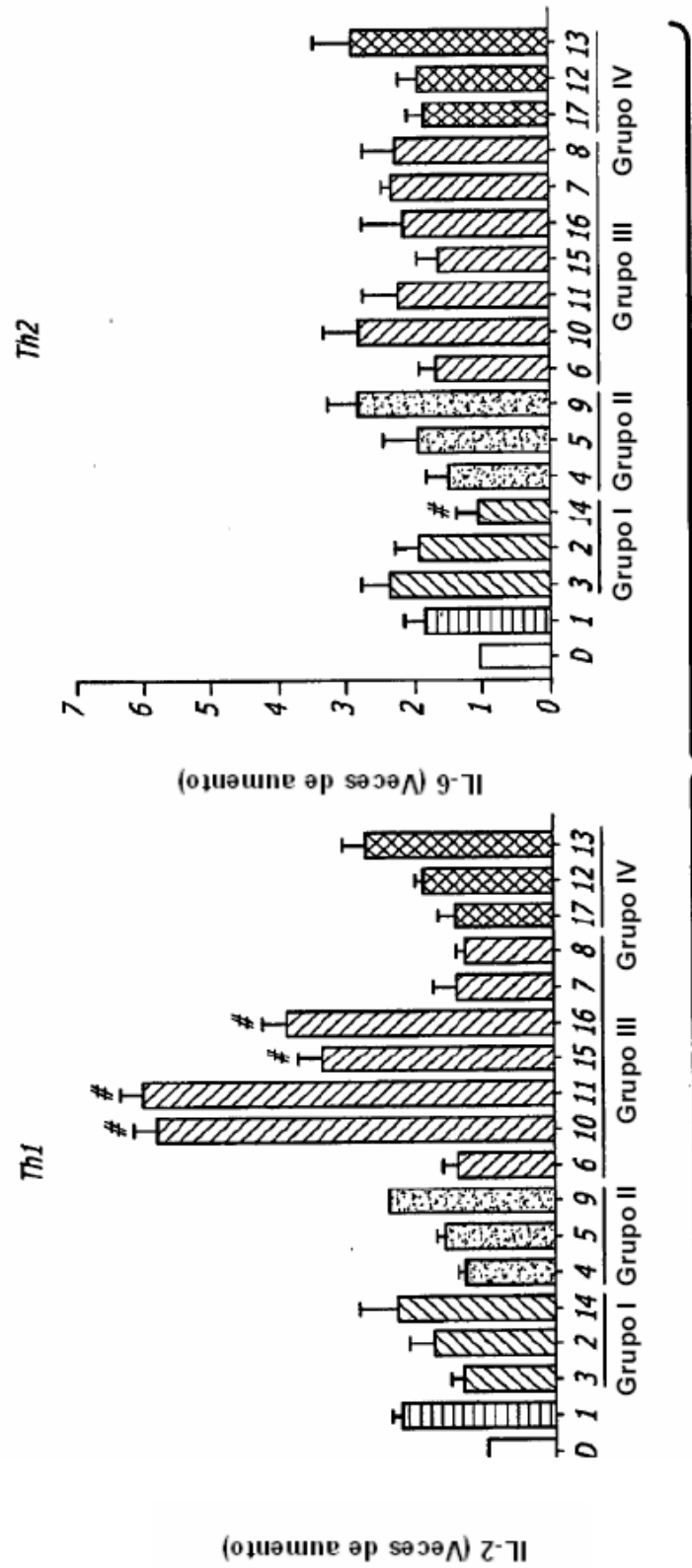


FIG. 5B

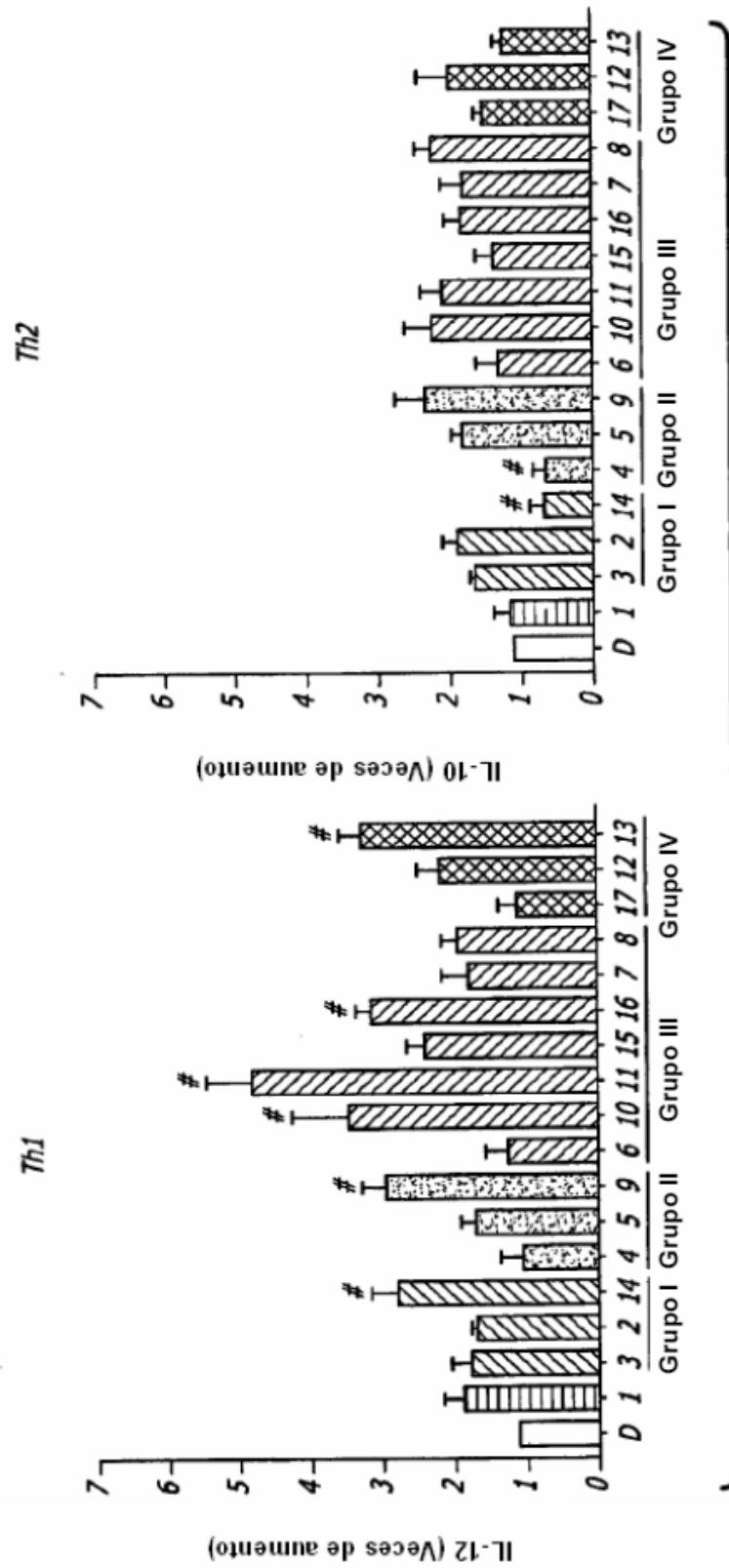


FIG. 5C

FIG. 6A

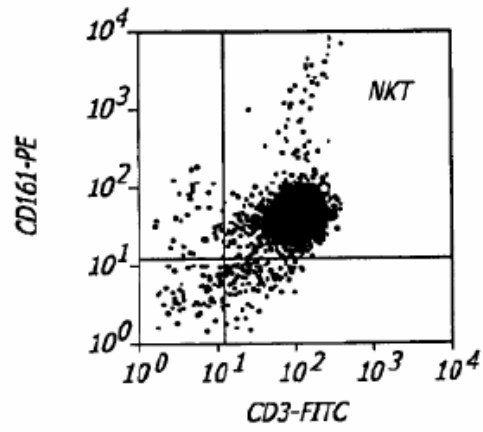


FIG. 6B

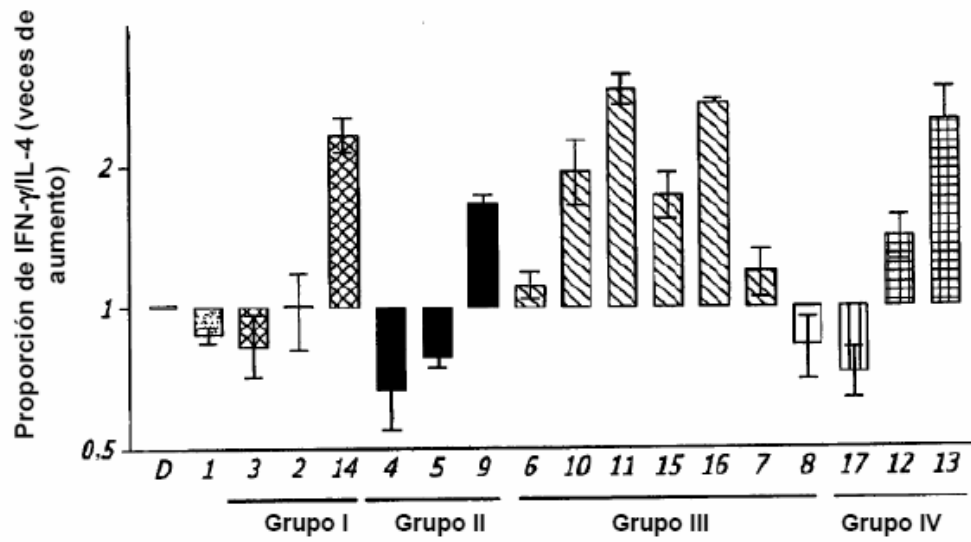


FIG. 7

Humano	basal	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
Influido por TH1	pg/ml	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces	Veces
IFN- γ	4613	3,4	2,7	2,4	1,3	2,2	2,1	2,8	1,9	3,3	4,6	6,4	3,9	6,6	3,4	4,2	5,2	1,9
IL-2	20,5	2,3	1,8	1,3	1,2	1,6	1,4	1,5	1,3	2,4	5,9	6,1	1,9	2,8	2,3	3,4	3,9	1,5
IL-12 p70	22	1,8	1,6	1,7	1	1,6	1,2	1,7	1,8	2,8	3,3	4,7	2,1	3,2	2,7	2,3	3	1
IL-12 p40	396	1,4	1,7	1,9	1,7	1,8	1,4	1,9	1,8	2	2,4	2,3	1,8	1,8	1,8	1,4	2,1	1,4
RAINES	6413	1,6	2	2,4	1,5	1,5	1,5	1,7	1,3	1,6	1,8	1,7	2	2,5	1,6	2,1	1,6	1,8
MIP- α	13365	2,9	3,5	3,5	1,5	3,2	3,2	3,4	2,8	3,4	3	3,3	3,5	3,6	3,3	3,4	3,4	2,7
MCP-1	10768	0,9	1,4	1,7	1,4	1,5	1	1,4	0,9	1,4	1,3	1	1,8	2	1,2	1,5	0,6	1,3
IL-8	4325	1,7	2,2	2,3	1,9	1,9	1,6	2,4	1,9	2,2	2,2	1,8	2,3	3	1,4	2,2	1,8	1,6
TNF- α	193,5	7,7	3	5,5	2,5	3,7	3,3	3,3	5,5	8,4	8,7	8,1	3,4	7,6	1,7	5,6	7,4	2,2
IL-3	57	1,9	1,7	1,7	1,1	2,3	1,8	1,6	1,9	3,3	4,1	4,2	2,6	1,7	1,3	1,8	2,5	1,4
GM-CSF	511	3,5	3	2,9	1,6	4,1	2,8	3,5	3,8	6,6	5,6	6,7	5,8	4,3	2	3,4	5,4	4,7
IL-15	150	2,6	2,4	2	1,8	2,2	2,2	2,1	2,2	2,3	2,6	2,8	2,3	2,3	1,7	2,3	2,7	2,1
Influido por TH2																		
IL-4	825	3,9	2,8	2,9	2,1	2,9	1,9	2,4	2,2	2,7	3	2,6	2,8	2,7	1,5	3,2	1,9	2,7
IL-6	630	1,8	1,9	2,3	1,5	1,9	1,6	2,3	2,1	2,7	2,7	2,2	1,9	2,8	1	1,6	2,1	1,8
IL-10	1530	1,2	1,9	1,7	0,6	1,8	1,3	1,7	2,2	2,5	2,4	2,3	2	1,2	0,7	1,4	1,8	1,5
IL-13	803	1,8	1,9	2	1,6	2,4	1,6	2,1	1,4	1,6	2,6	1,7	1,8	2,3	1,1	1,6	1,6	1,6

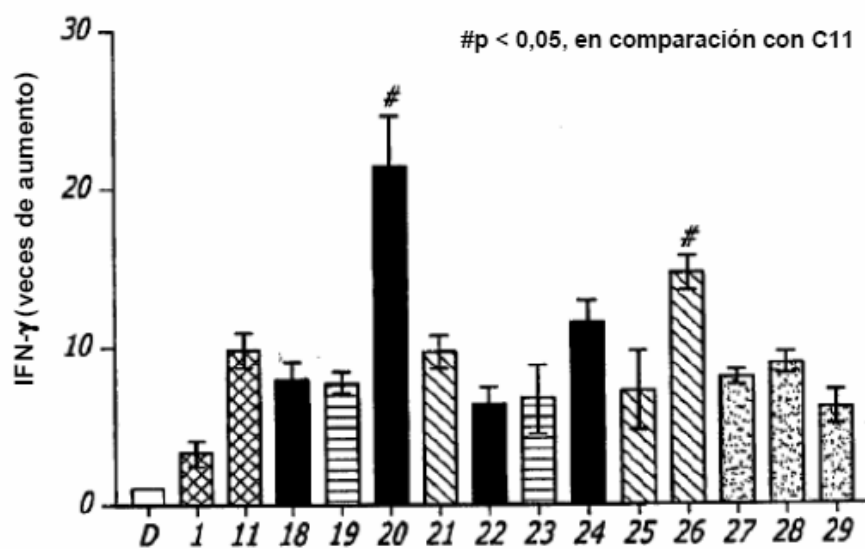


FIG. 8A

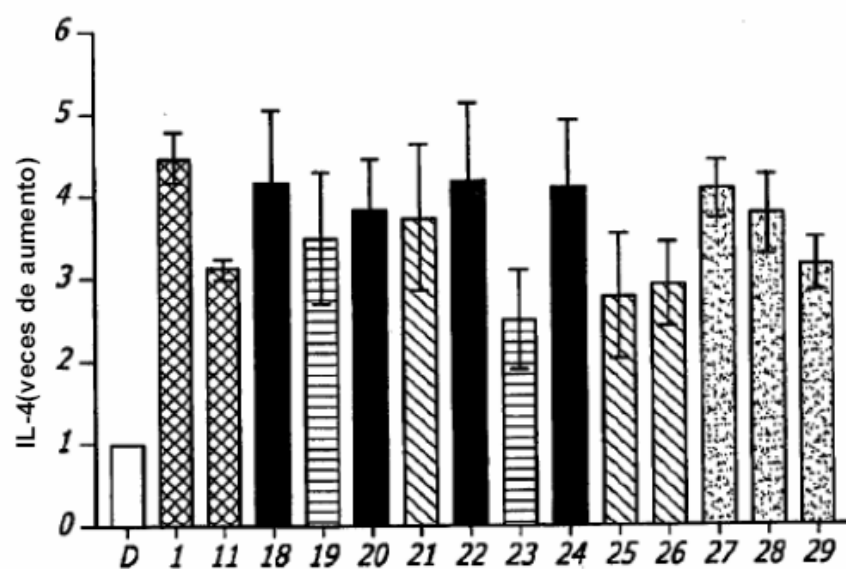


FIG. 8B

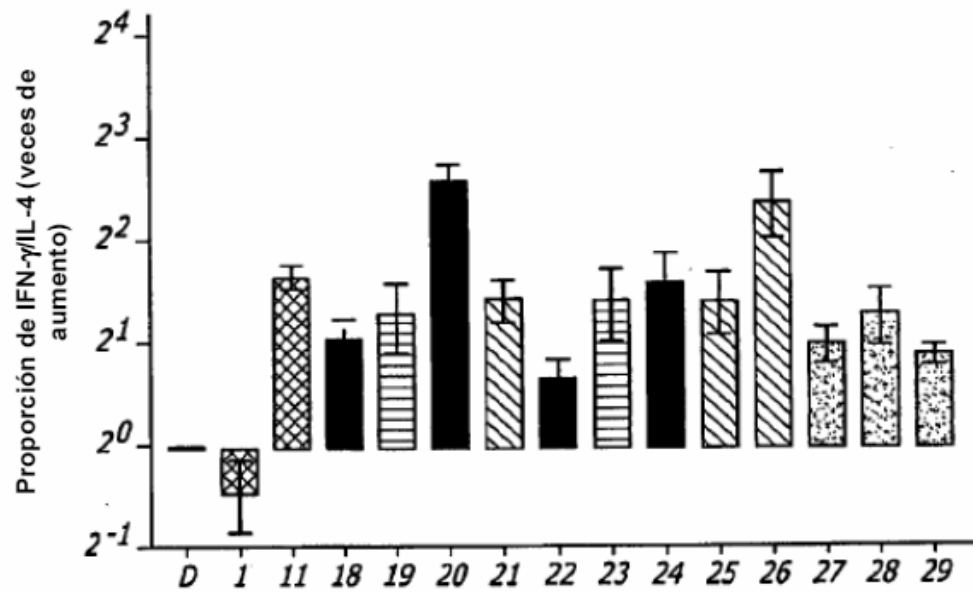


FIG. 8C

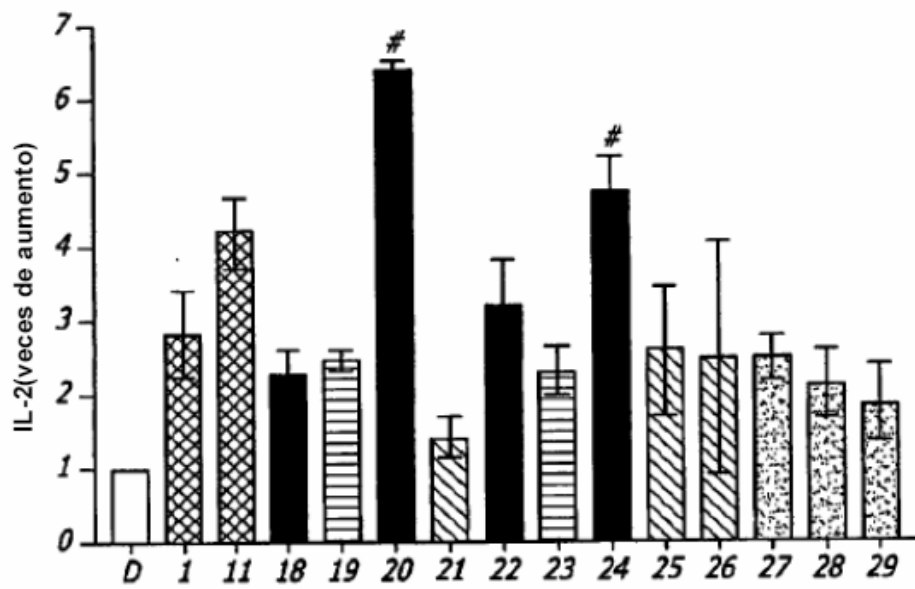


FIG. 8D

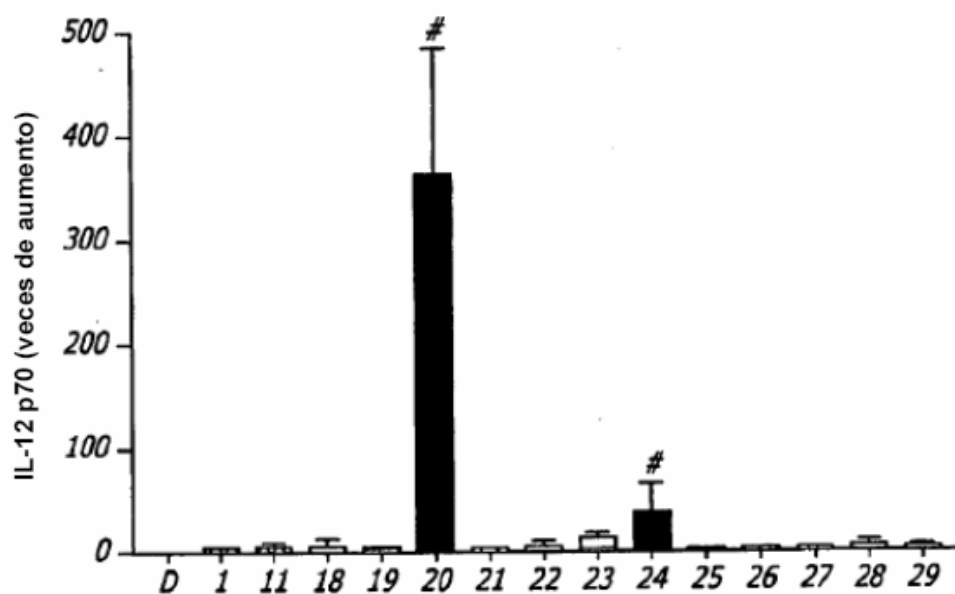


FIG. 8E

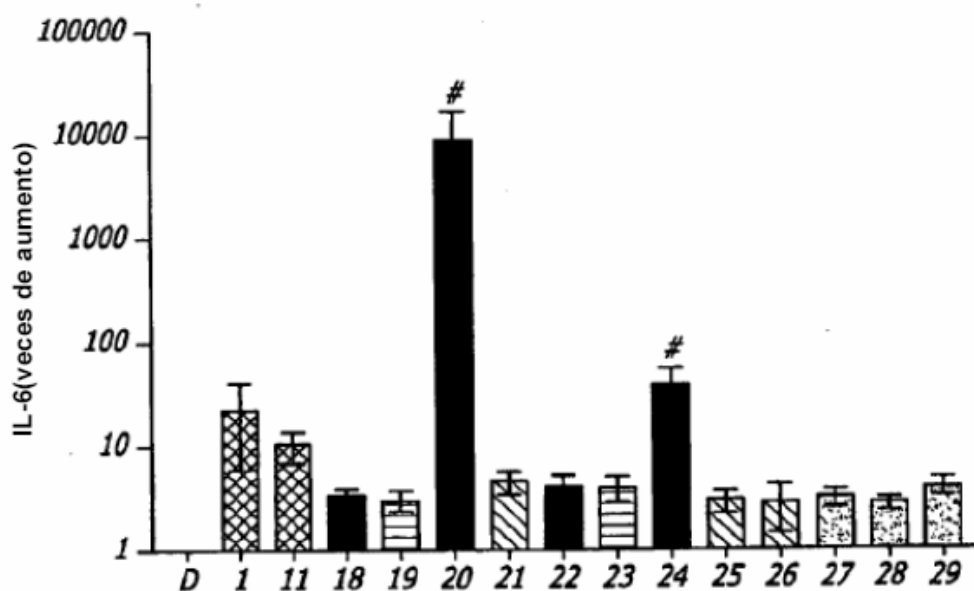


FIG. 8F

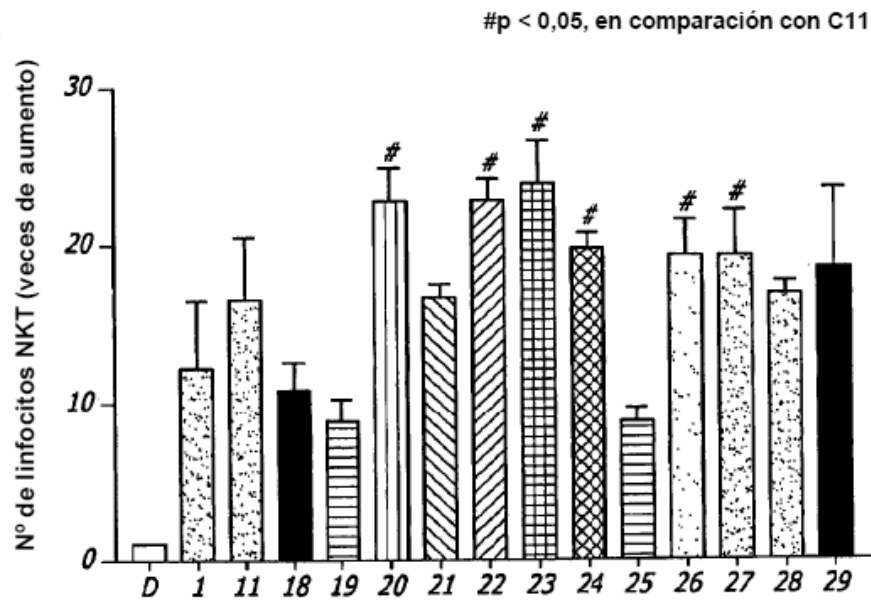


FIG. 9

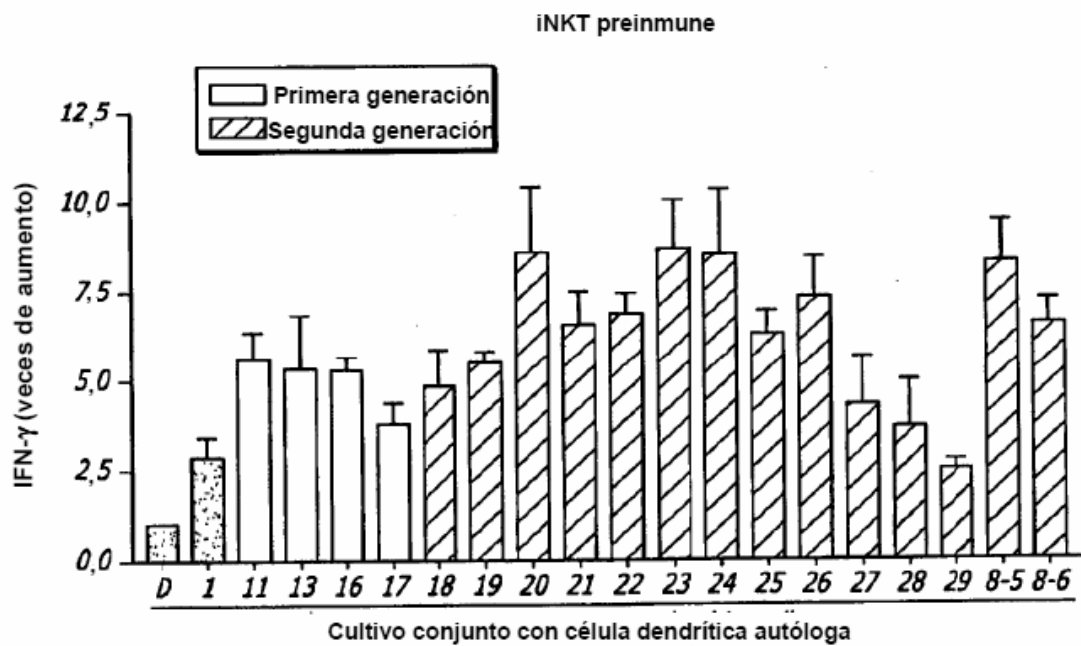


FIG. 10A

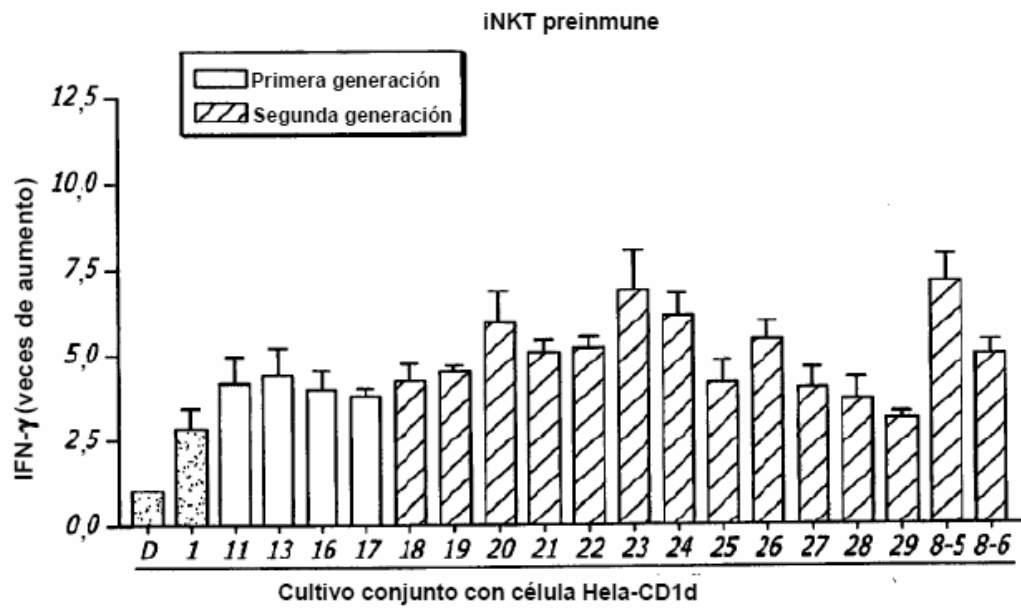


FIG. 10B

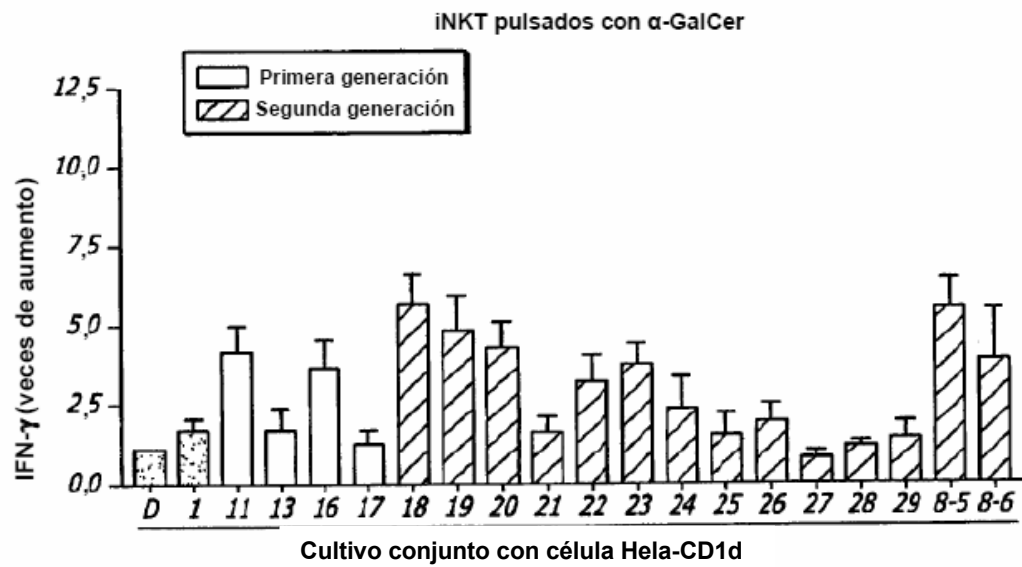


FIG. 10C

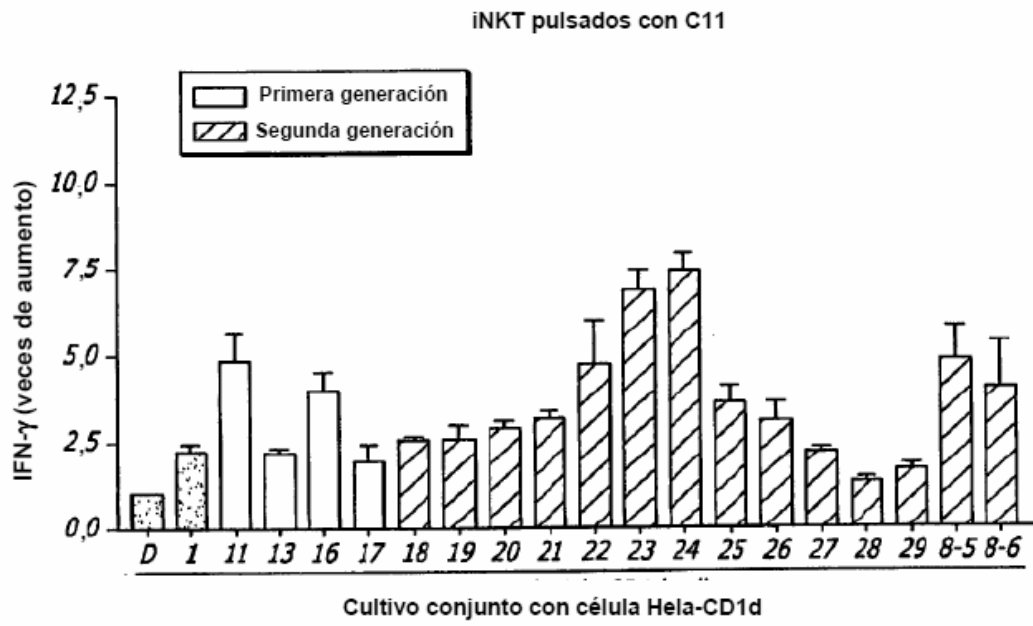


FIG. 10D

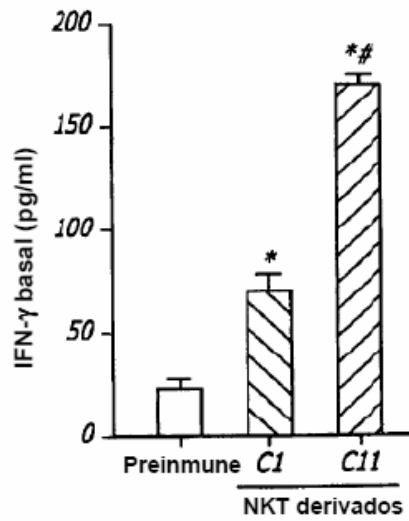
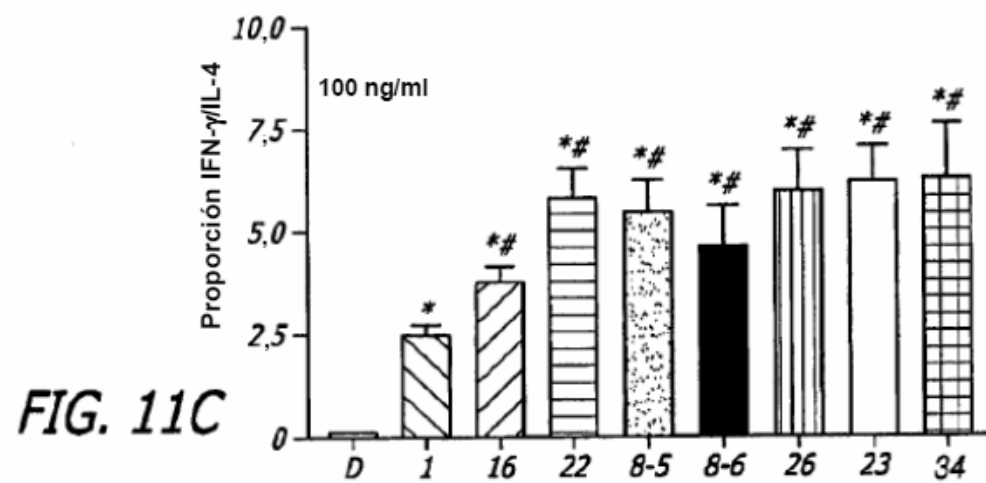
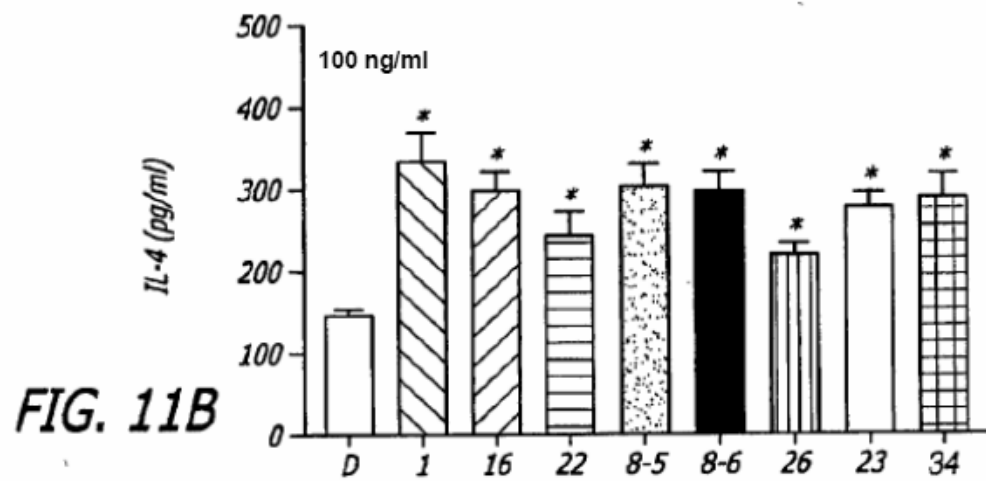
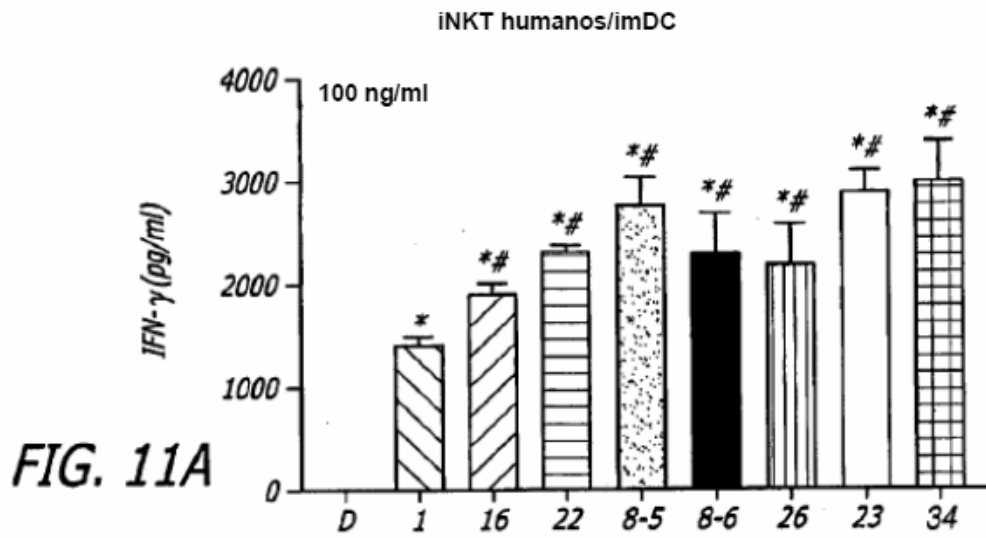


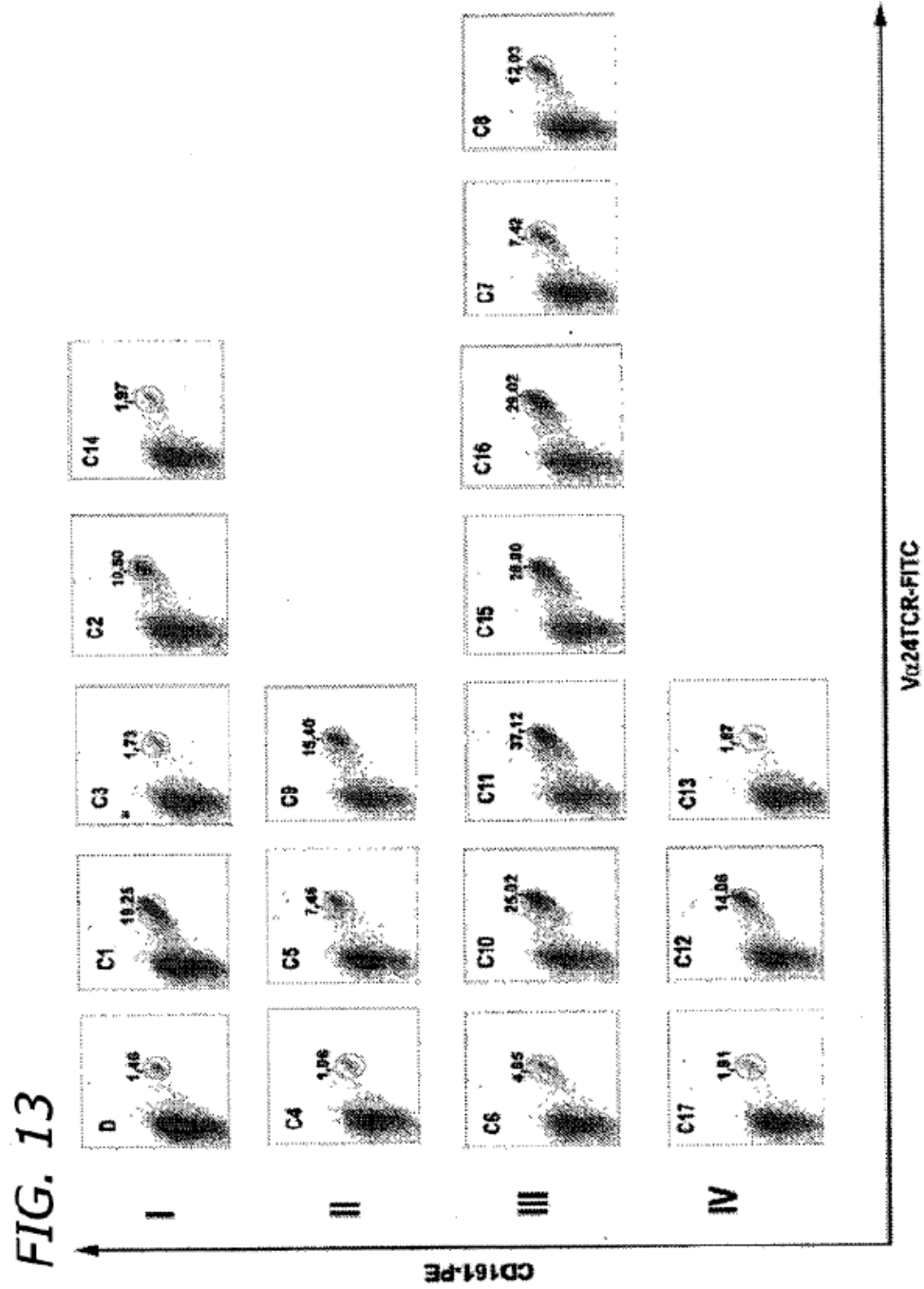
FIG. 10E



25 citocinas/quimiocinas

iNKT/DC humanos	D	C1	C23	7DW8-5	C34	C17
Influidos por TH1	pg/m	pg/m	pg/m	pg/m	pg/m	pg/m
IFN- γ	57	1886	4349	4358	4103	1073
IL1 α	47	46	61	47	48	40
IL1 β	46	35	76	33	28	26
IL-2	33	119	430	506	517	71
IL-12 p40	473	460	902	759	665	403
IL-12 p70	158	353	691	582	510	134
IL-15	26	25	29	30	28	25
IL-8	5000	7241	14664	2609715	50209792	5463133
MCP-1	297	5284	9394	72354	60707	8268
MIP-1 β	2413	1583	2935	2843	2211	2118
RANTES	16447	23491	36440	285864050	1325045972	31159
Influidos por TH2						
IL-4	110	320	264	279	286	184
IL-6	600	1887	4091	647732	77590	13803
IL-10	1717	2046	3739	2236	2032	1580
IL-13	139	204	4499	2688	1852	142
TH17						
IL-17	64	894	376	66	49	12
Otros						
TNF- α	151	218	2963	1787	1687	89
Otros	53	51	74	67	52	48
GM-CSF	50	42	591	661	487	55
IL-3	4	6	30	25	33	5
IL-5	17	11	31	26	22	14
IL-7	35	32	36	35	33	30
IP-10	14930	1434559	163782	146750	1634841	21224
IL-1RA	14103	62820	50335	61420	49656	16564
IL-18	7	29	73	19	16	3
IL-21	NA	NA	NA	NA	NA	NA

FIG. 12



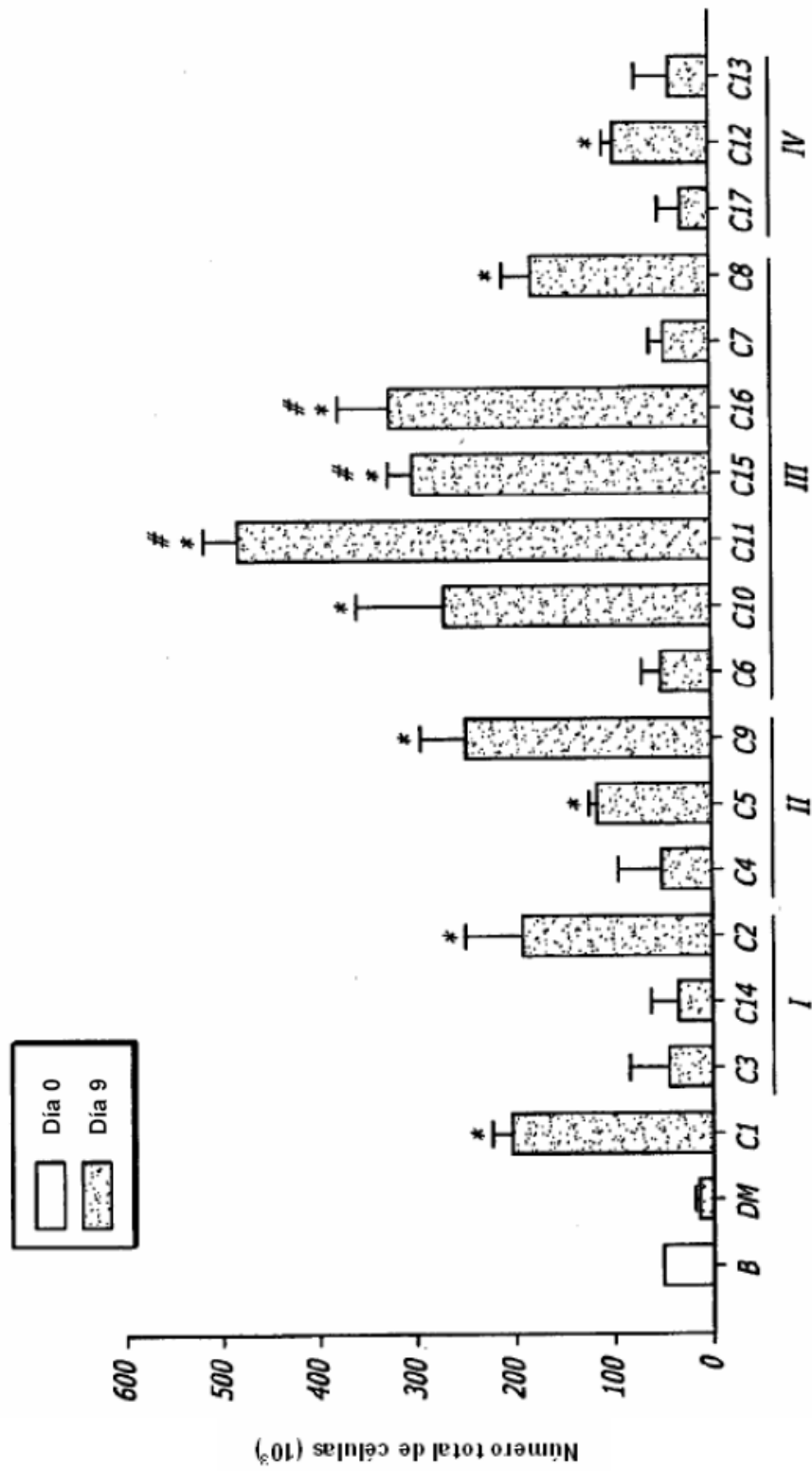


FIG. 14

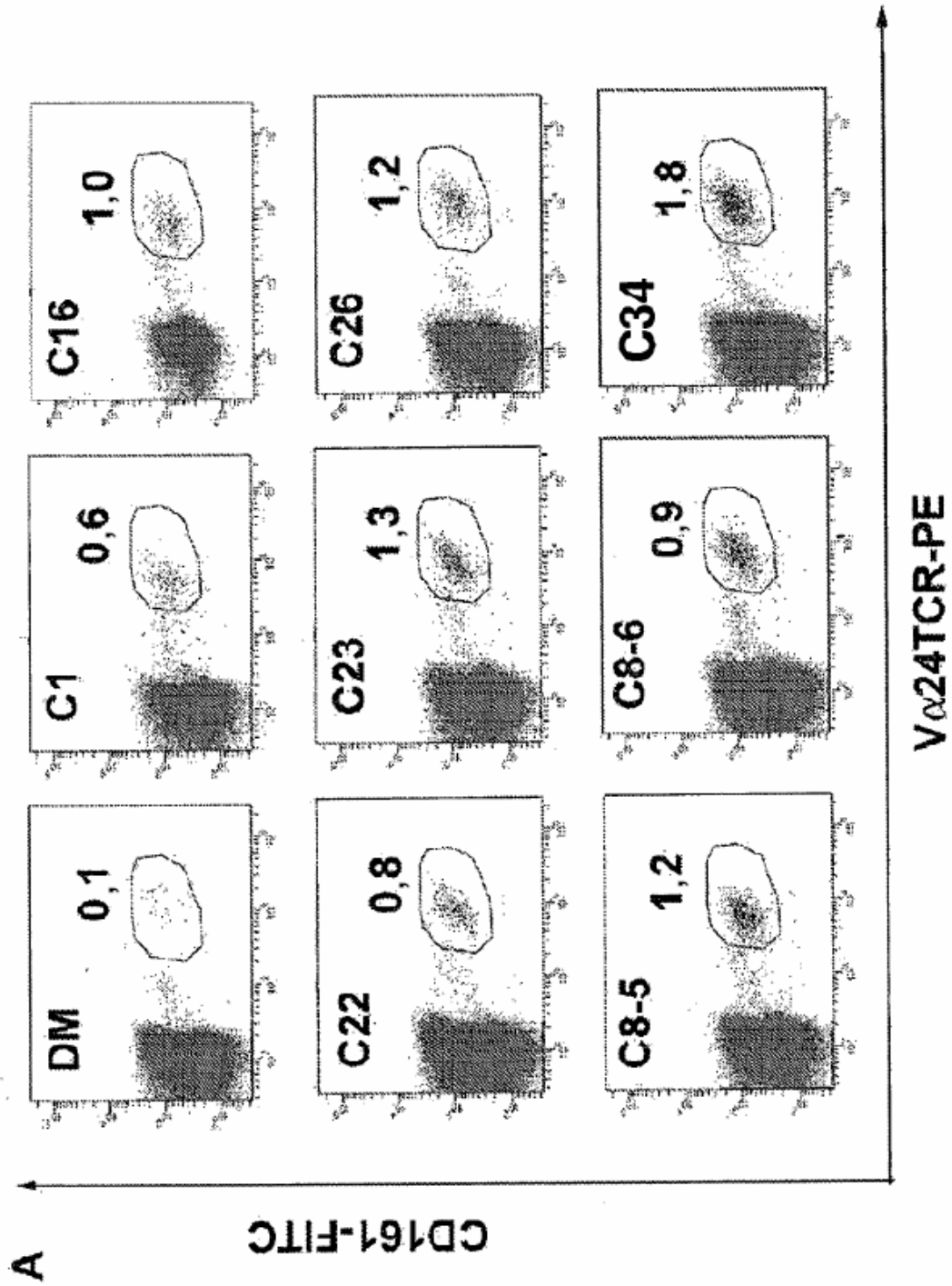
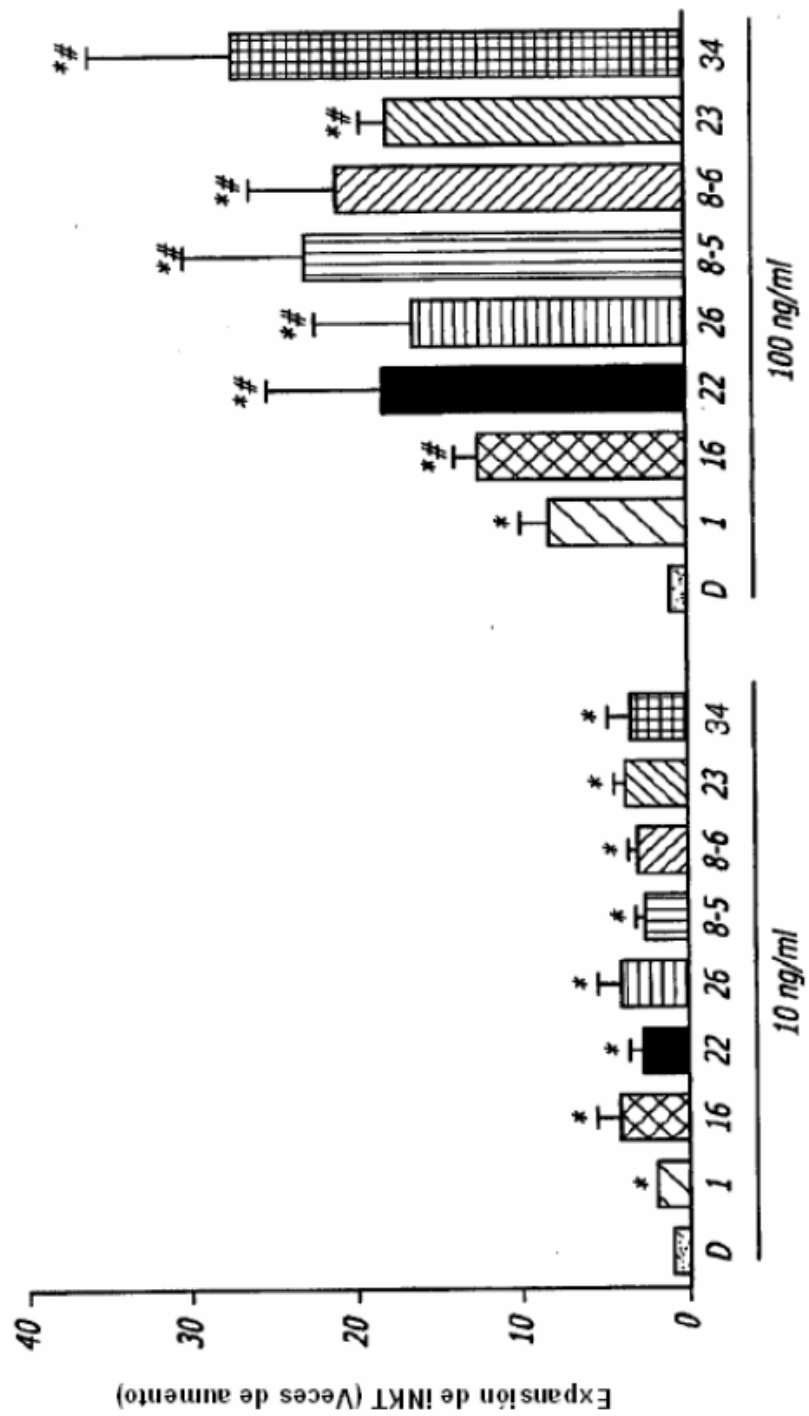


FIG. 15A

FIG. 15B



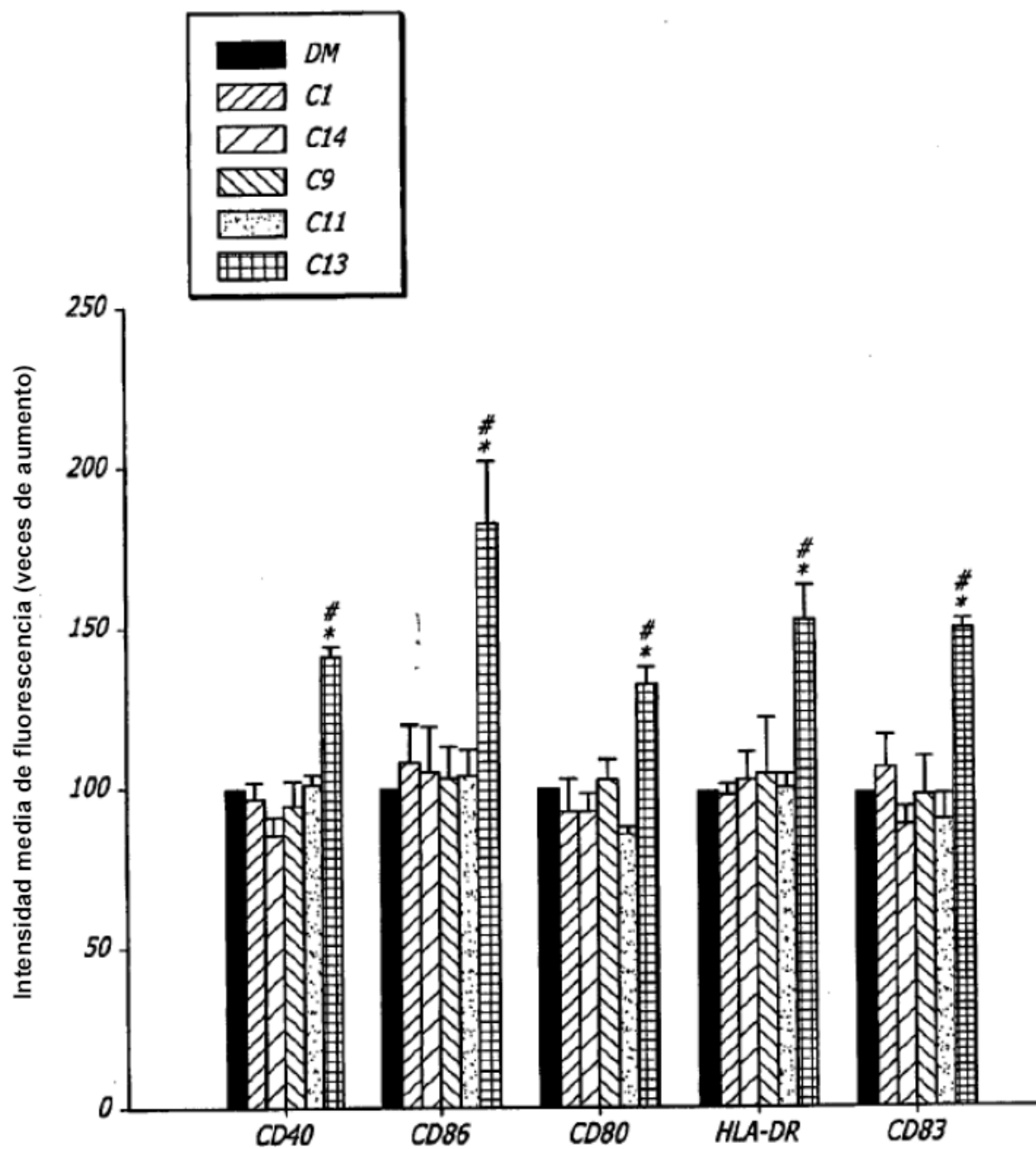
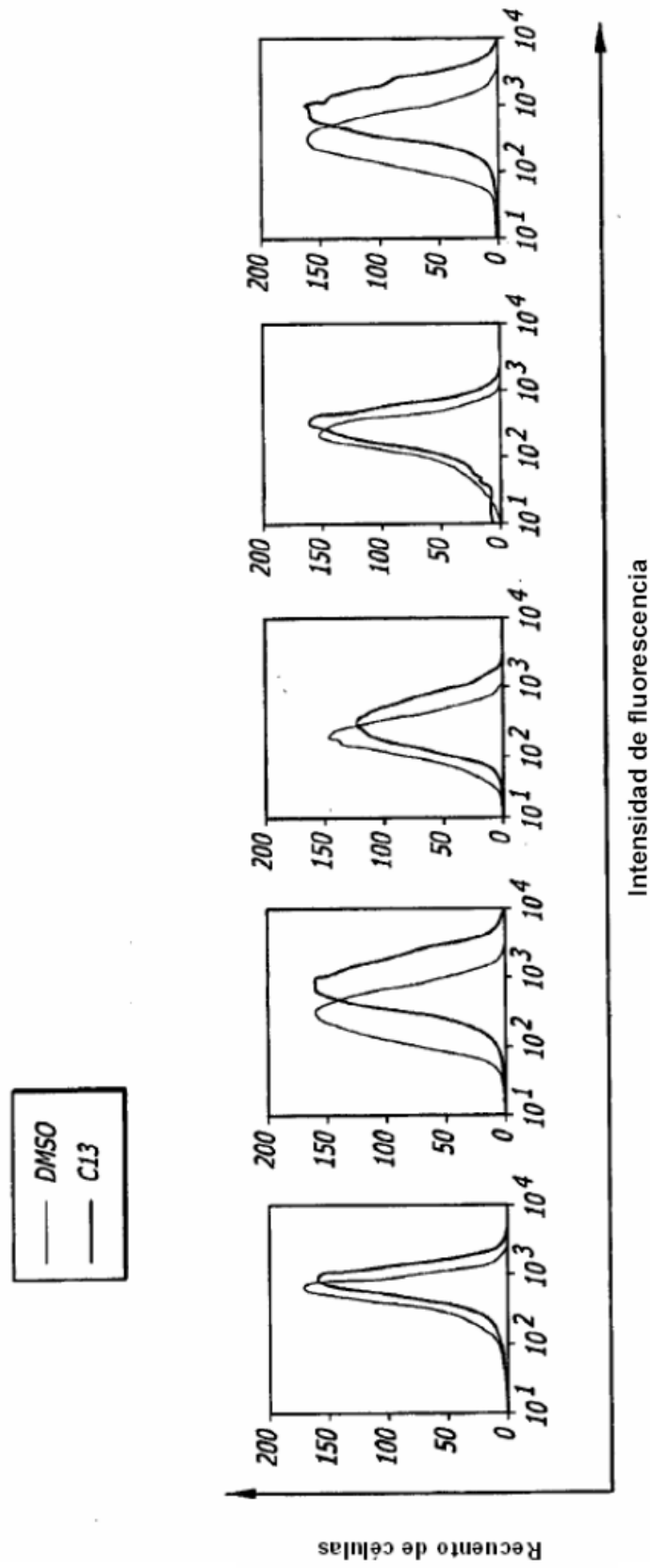


FIG. 16

FIG. 17A



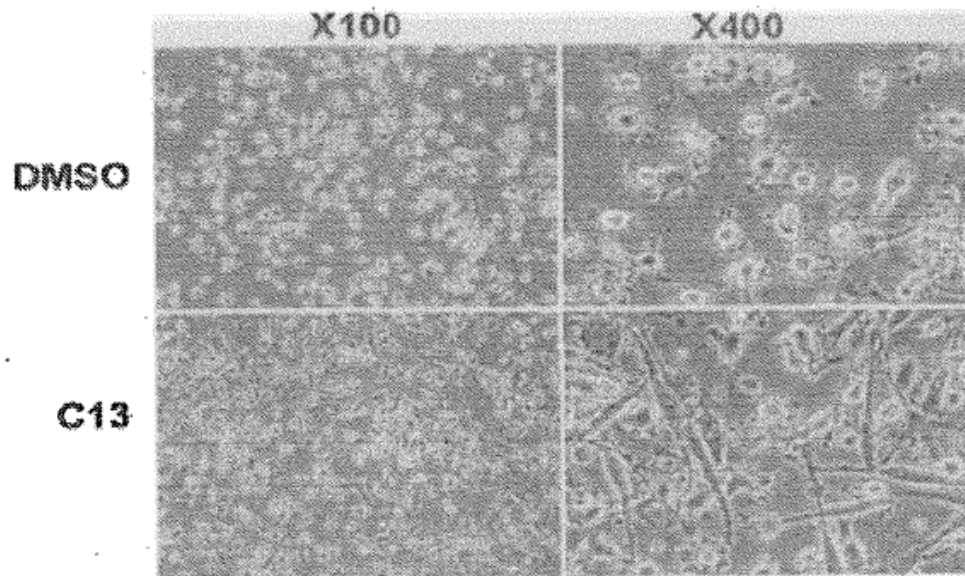
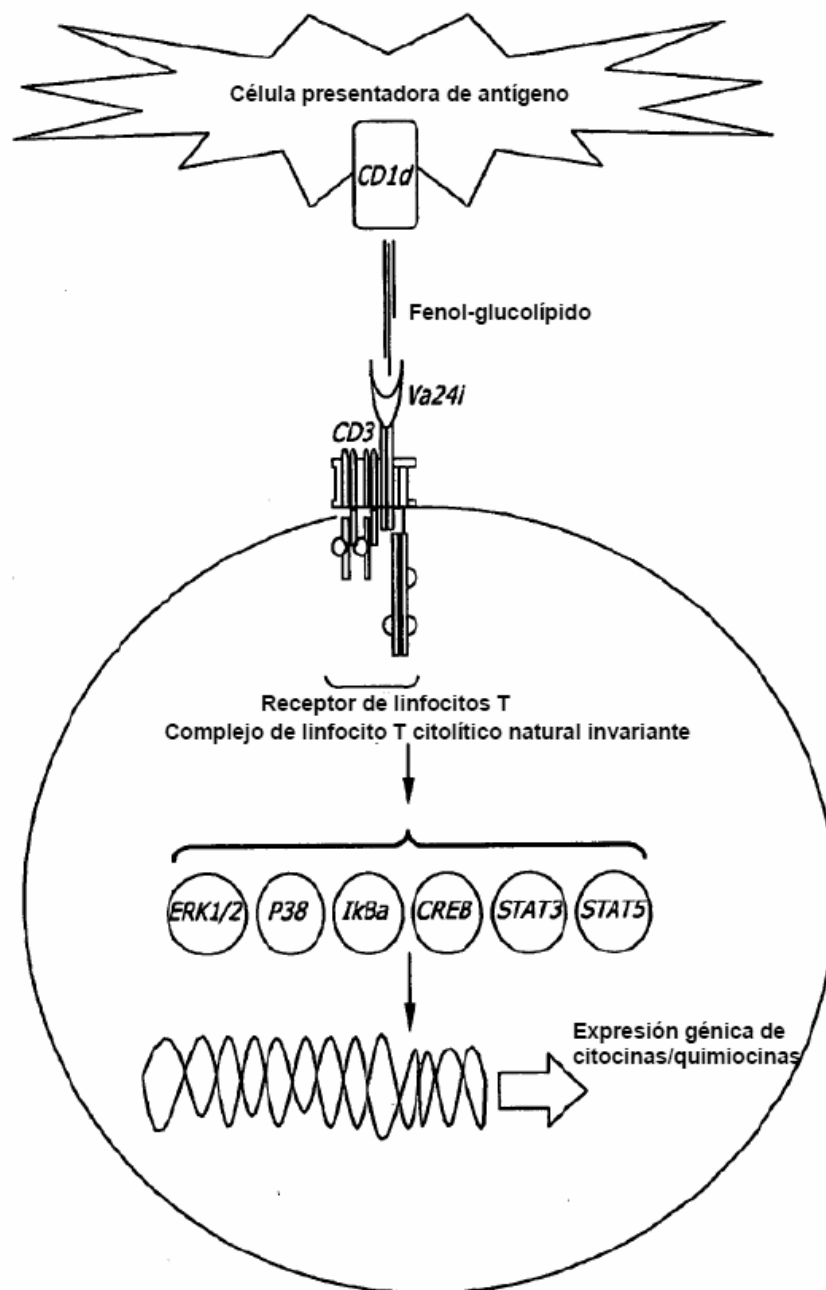
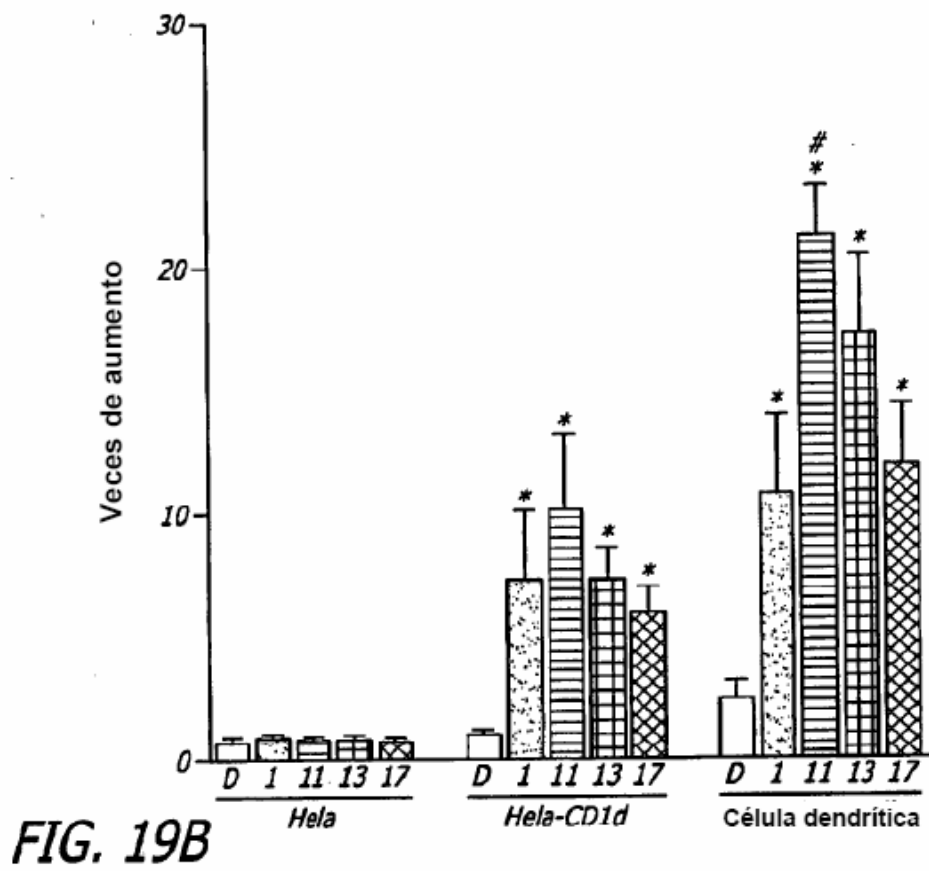
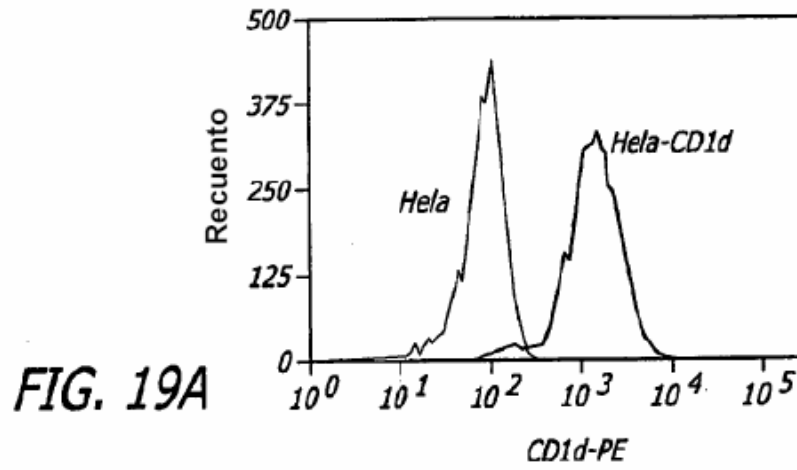
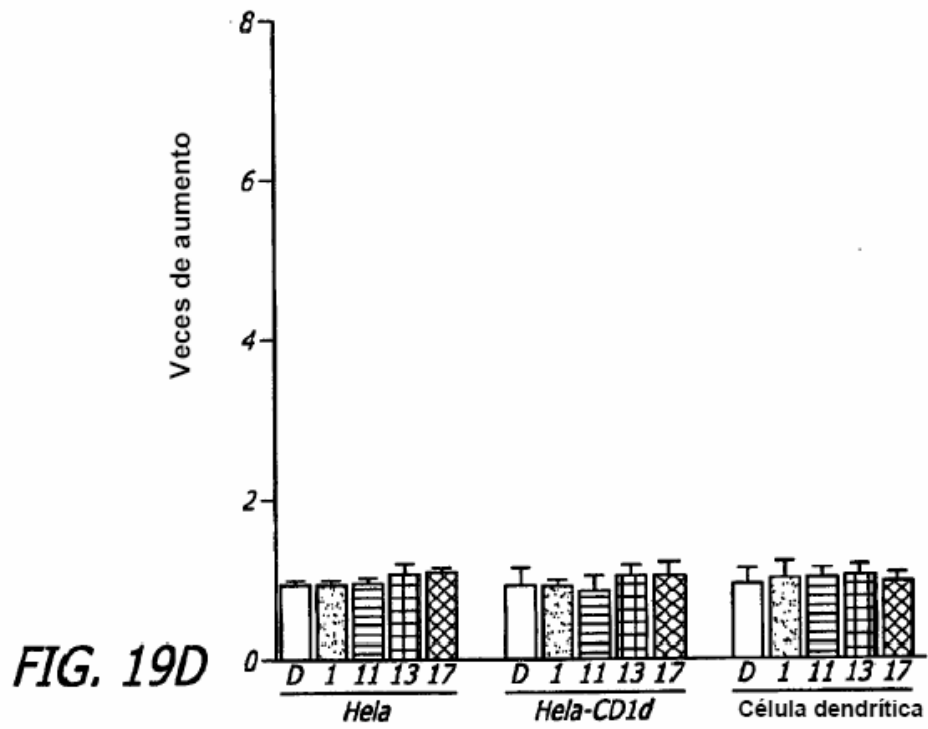
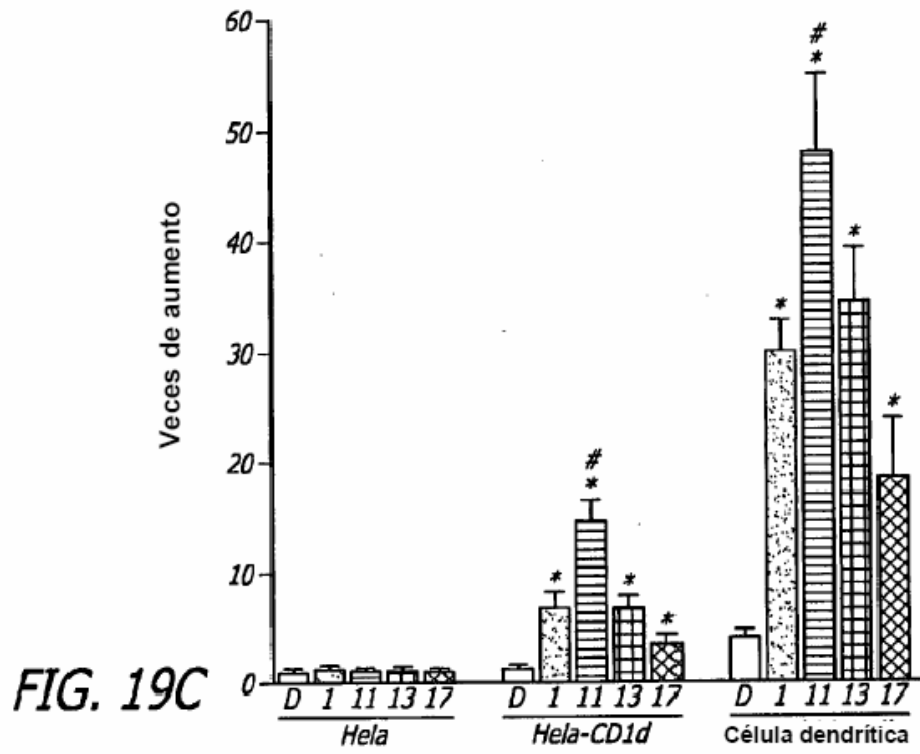


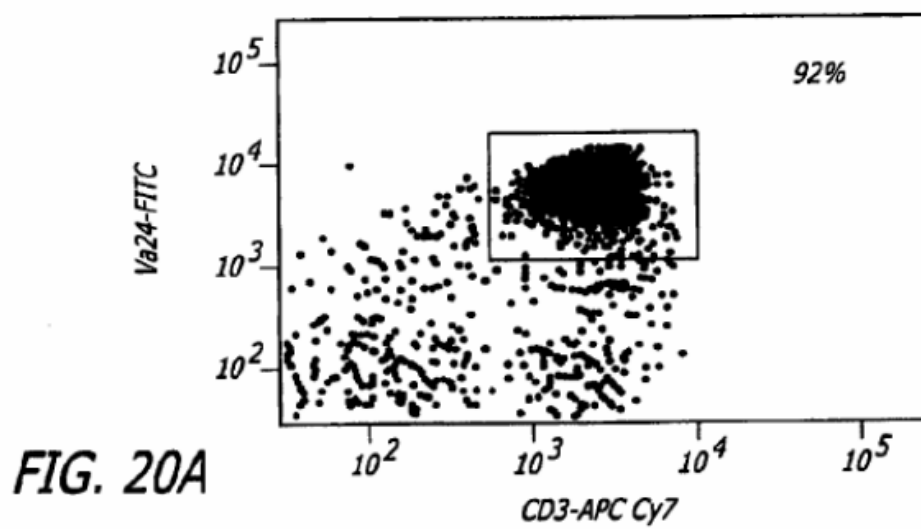
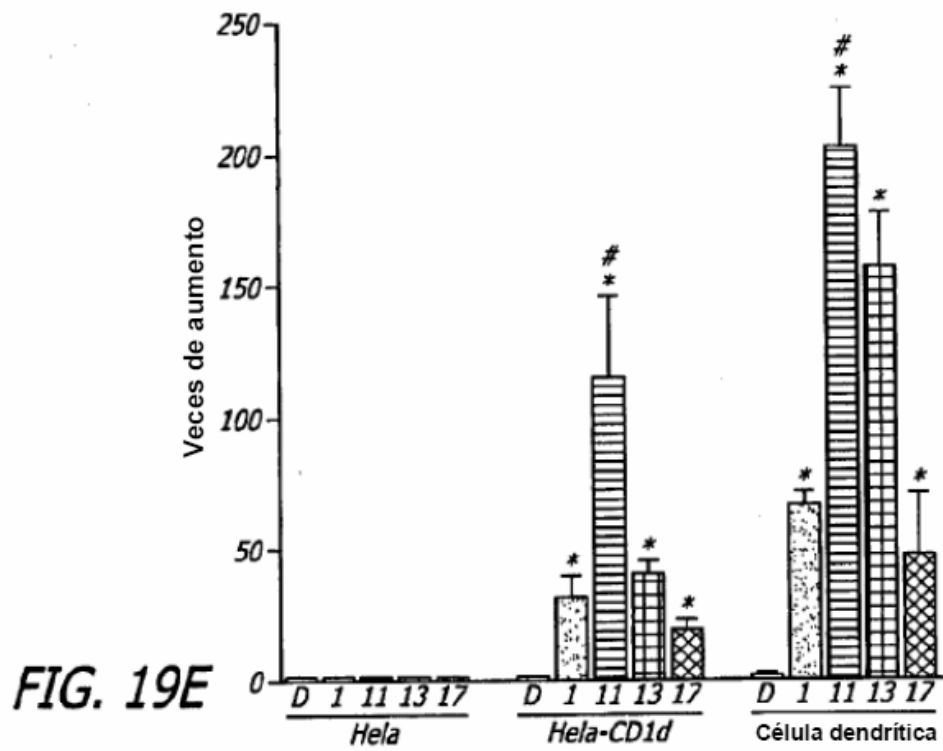
FIG. 17B

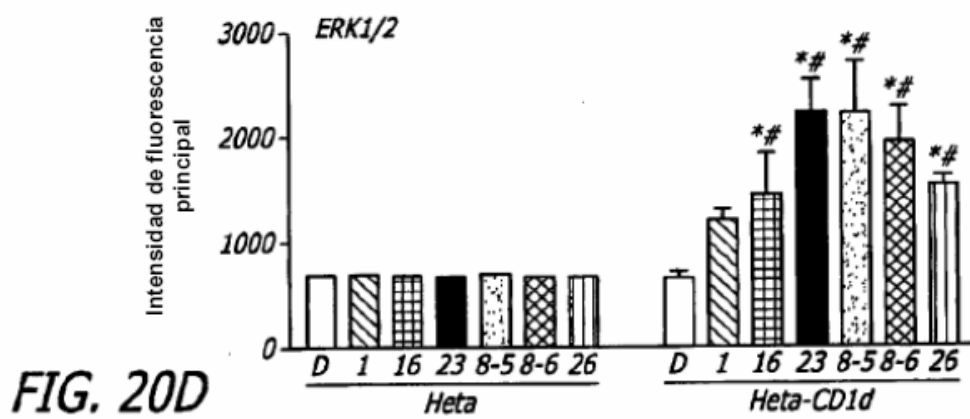
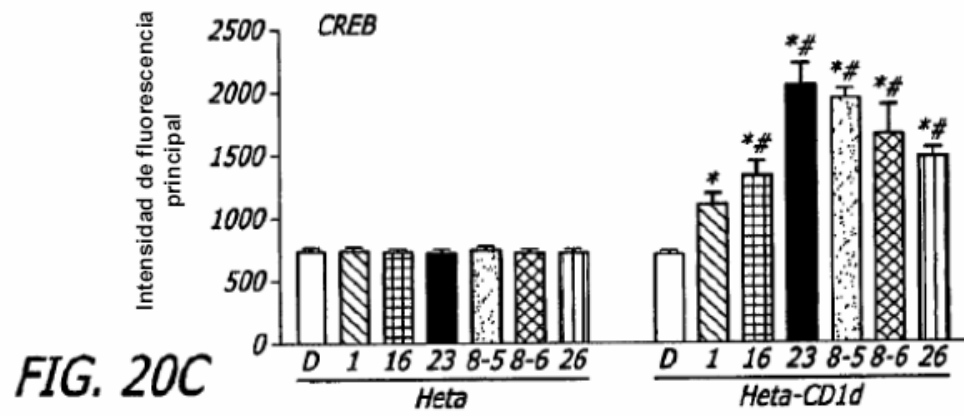
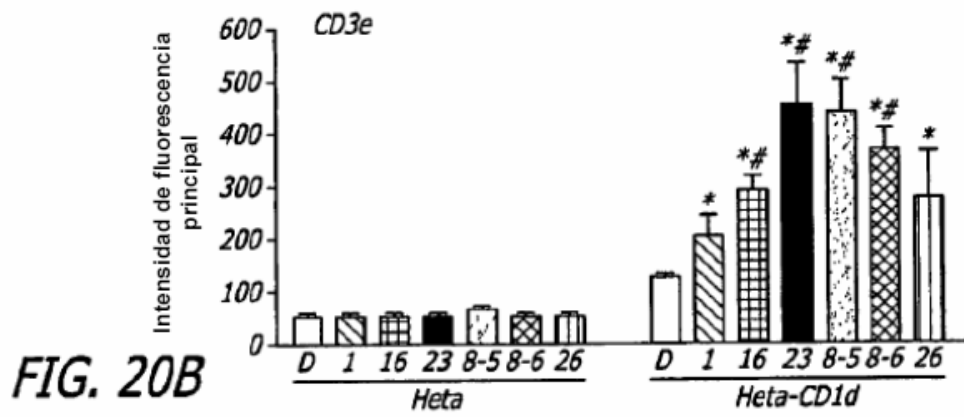
FIG. 18

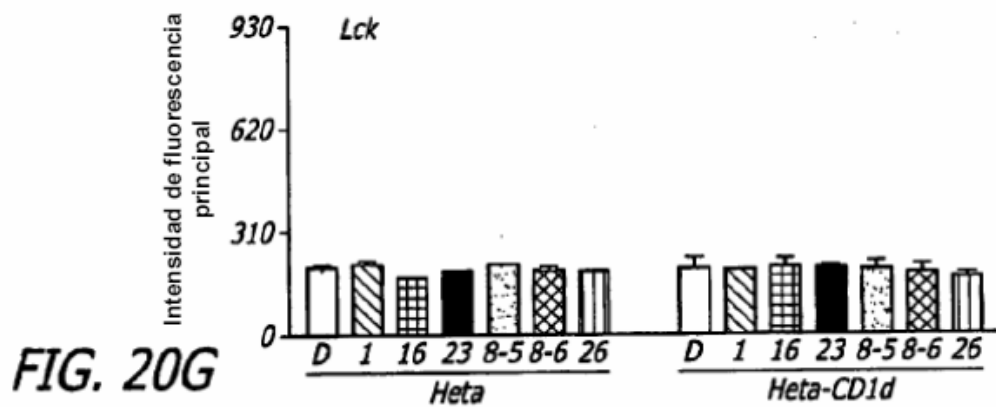
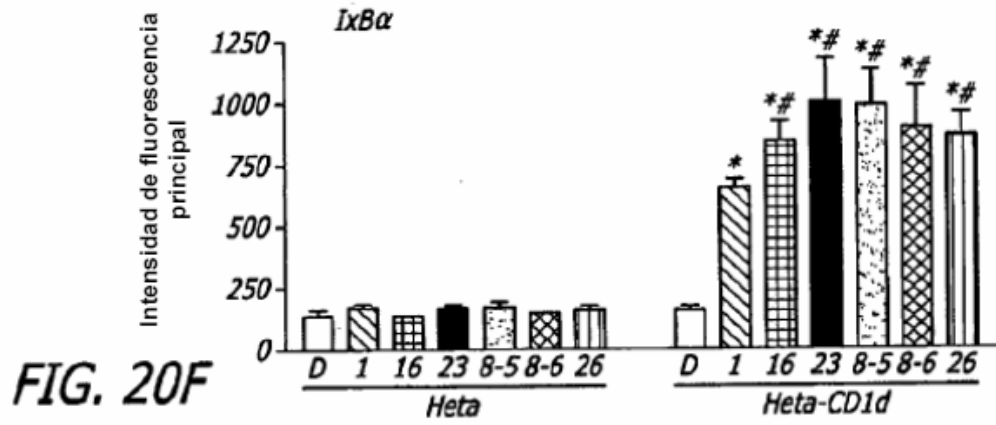
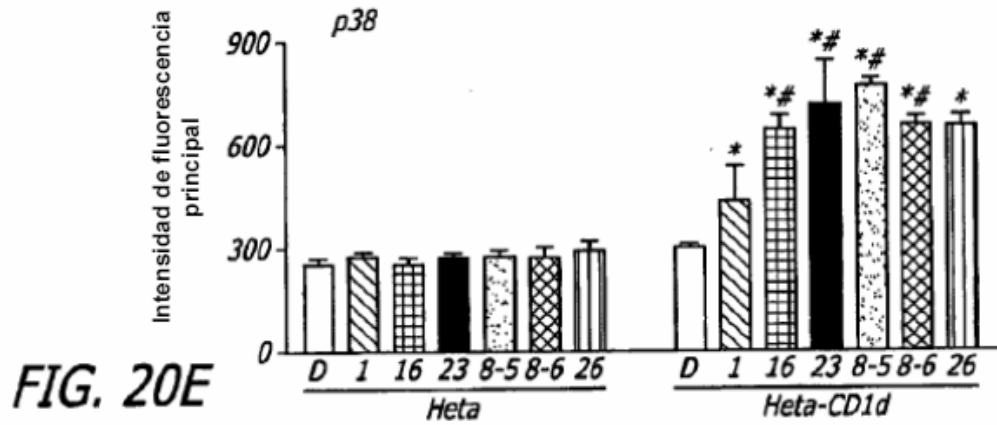


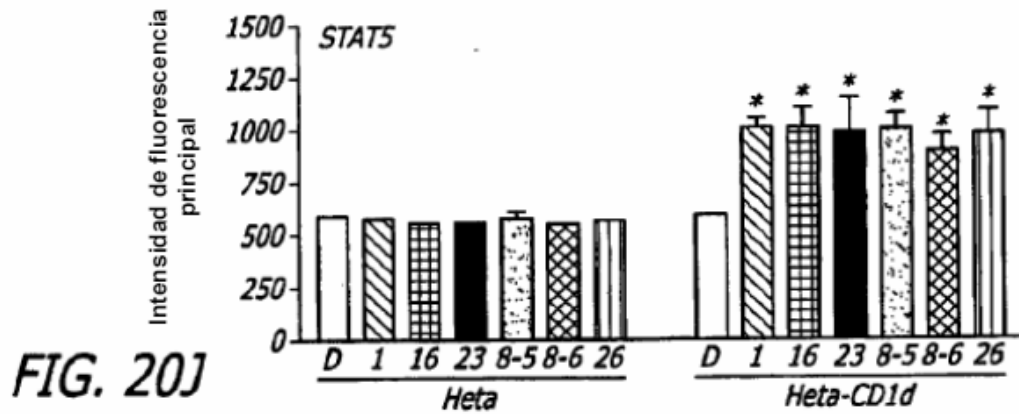
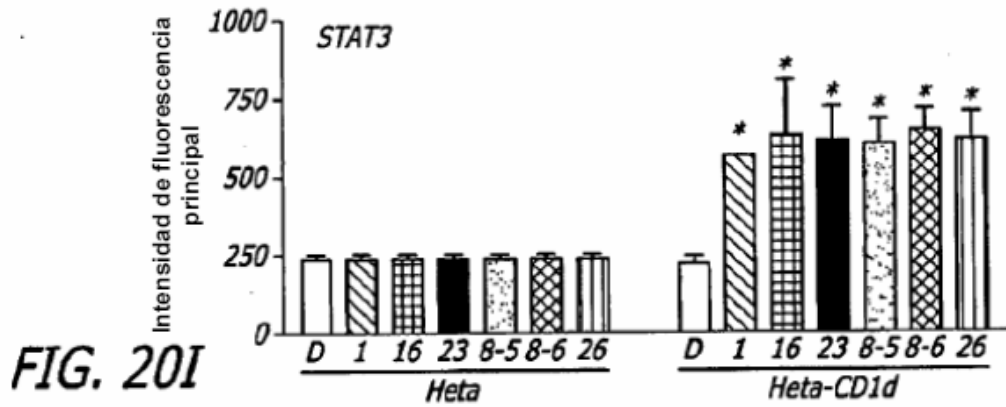
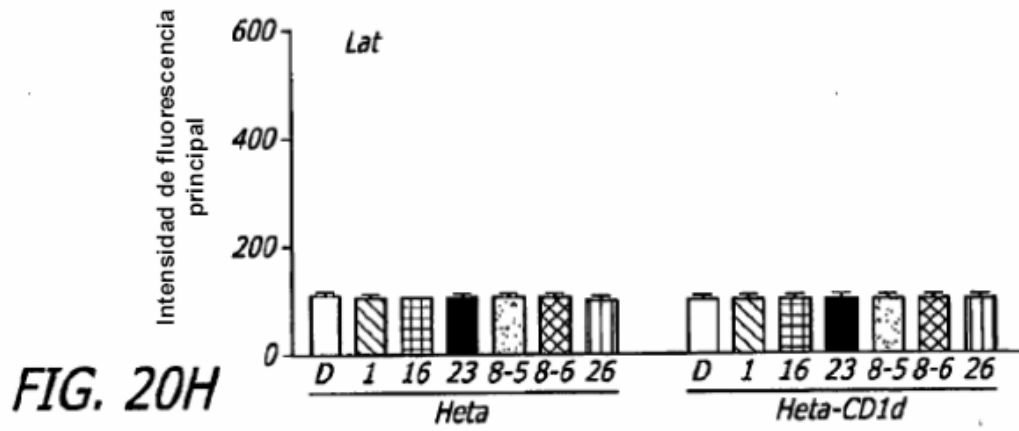


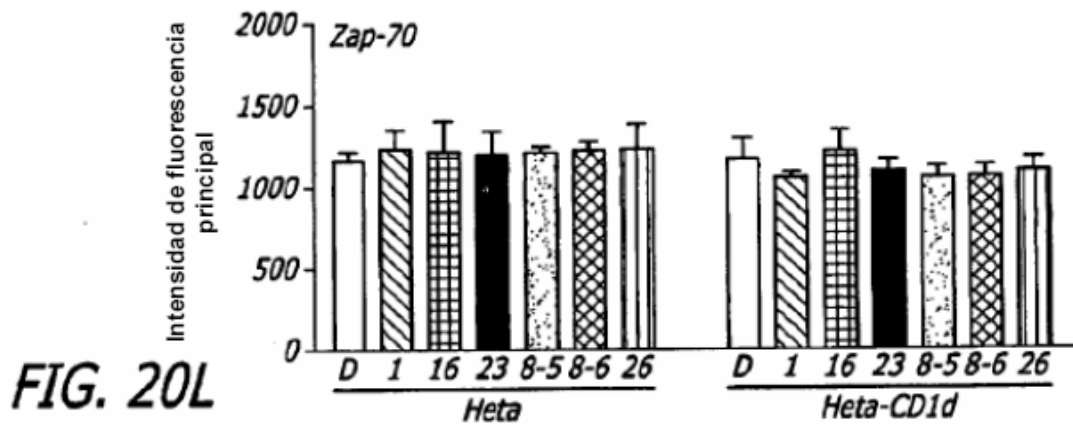
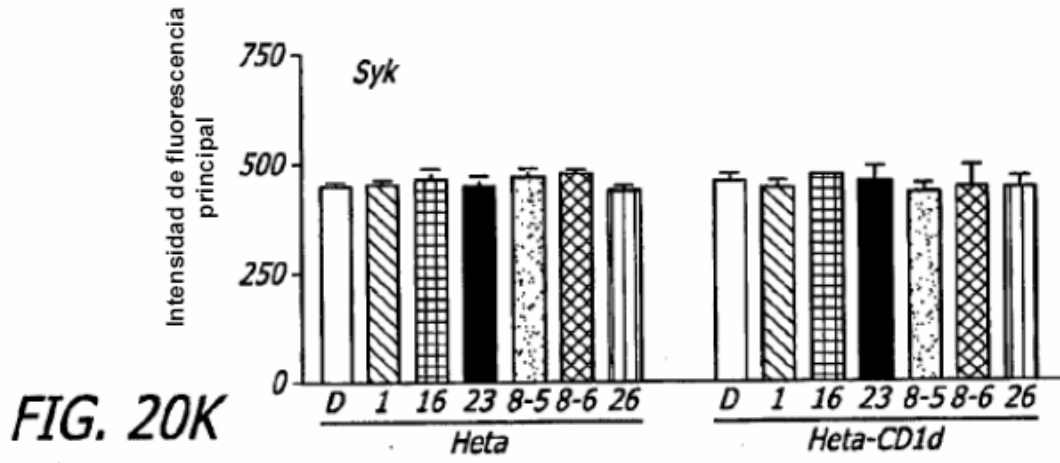












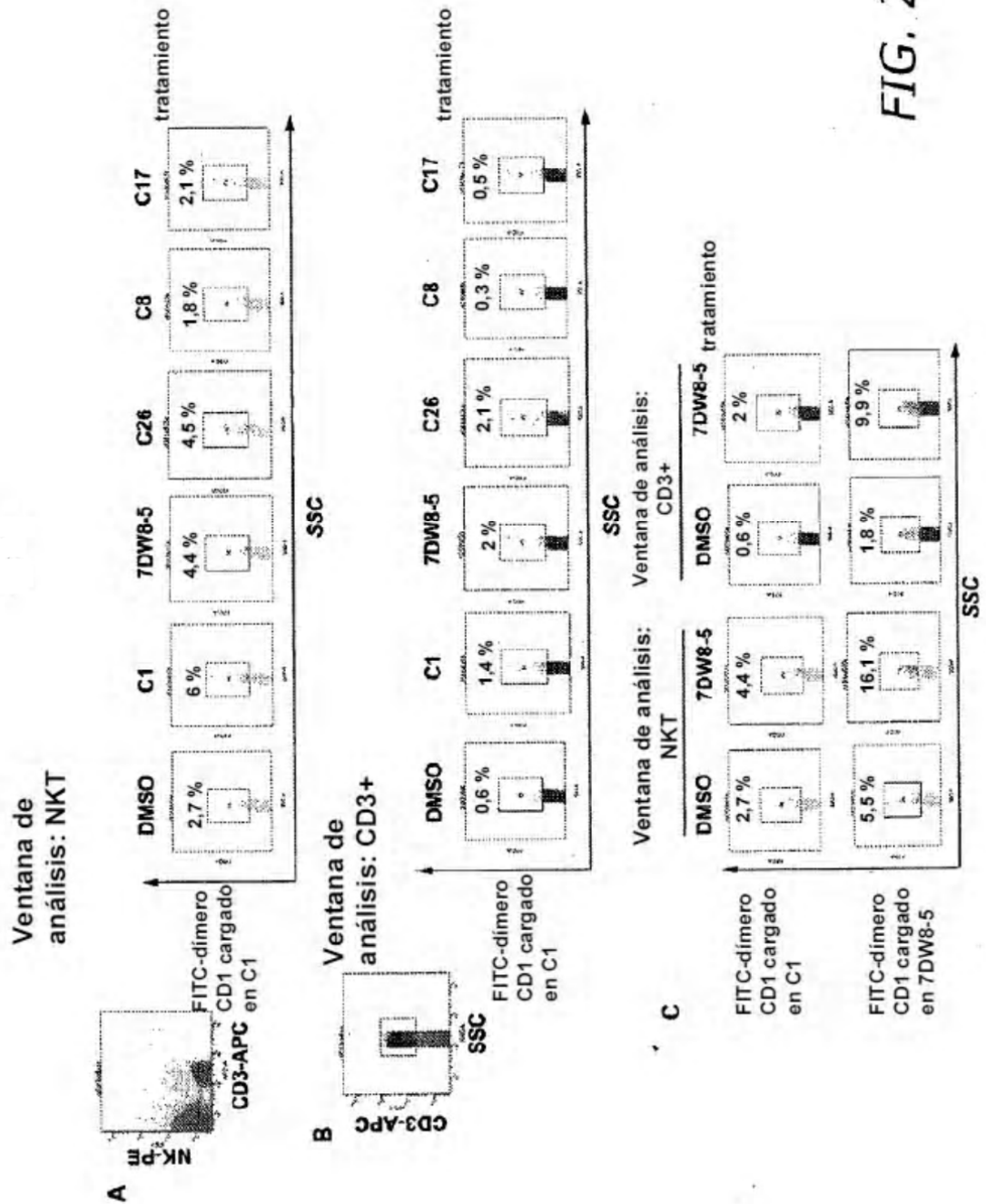


FIG. 21

FIG. 22A

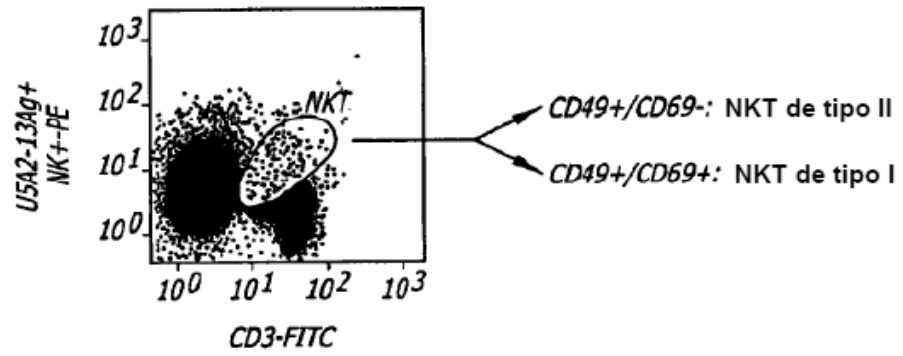


FIG. 22B

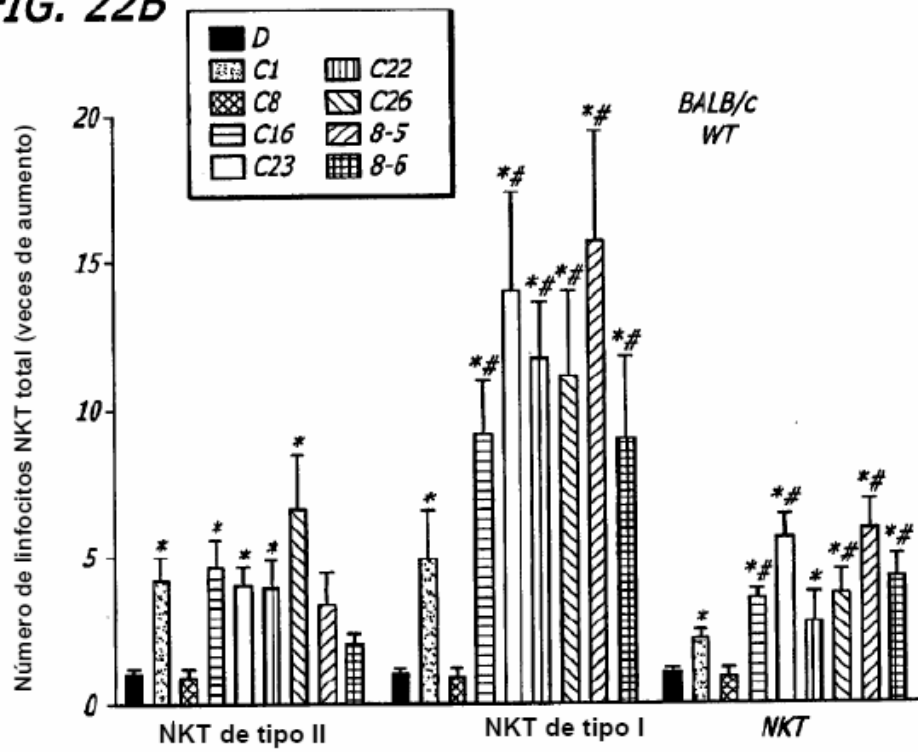


FIG. 22C

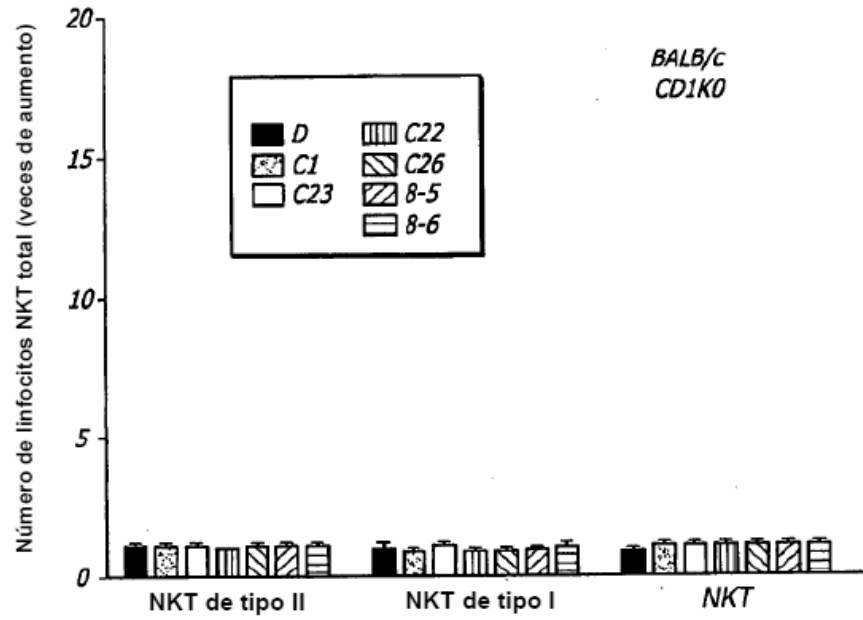


FIG. 22D

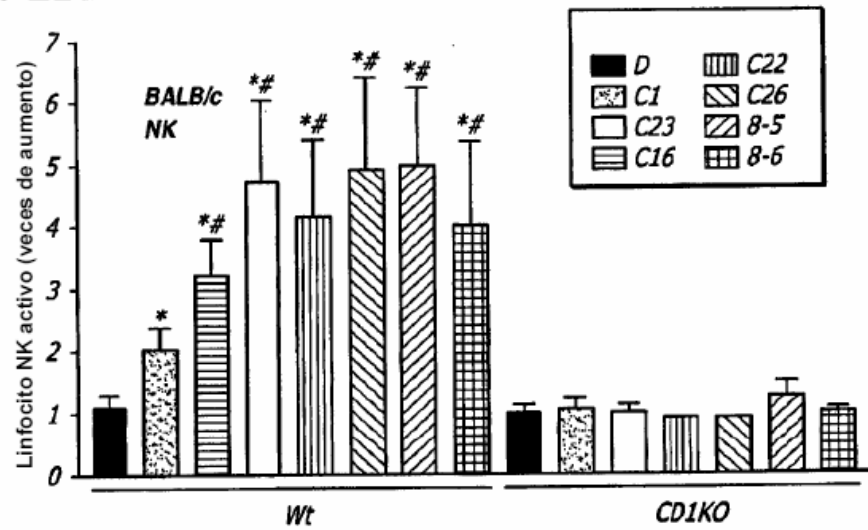


FIG. 23A

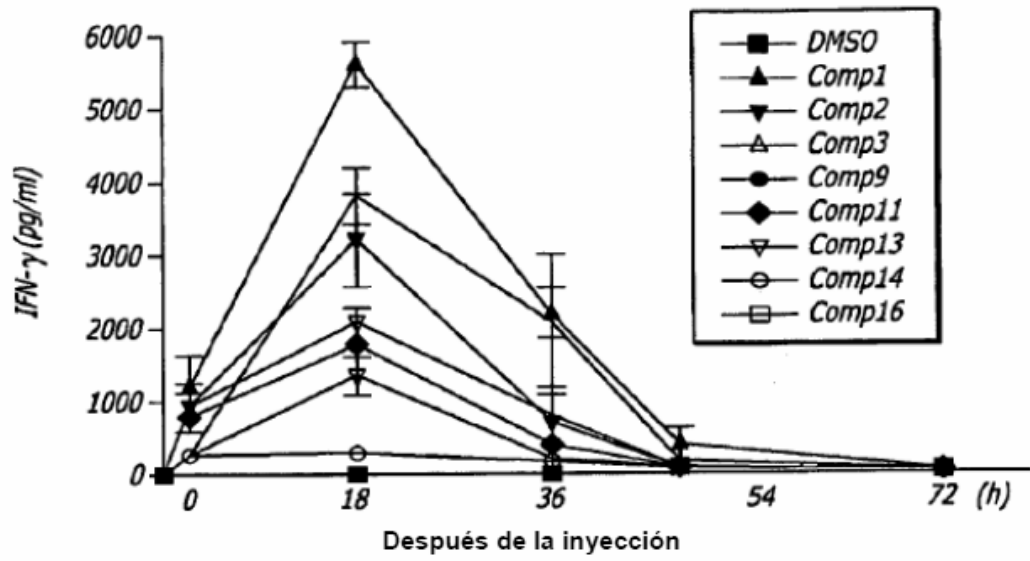


FIG. 23B

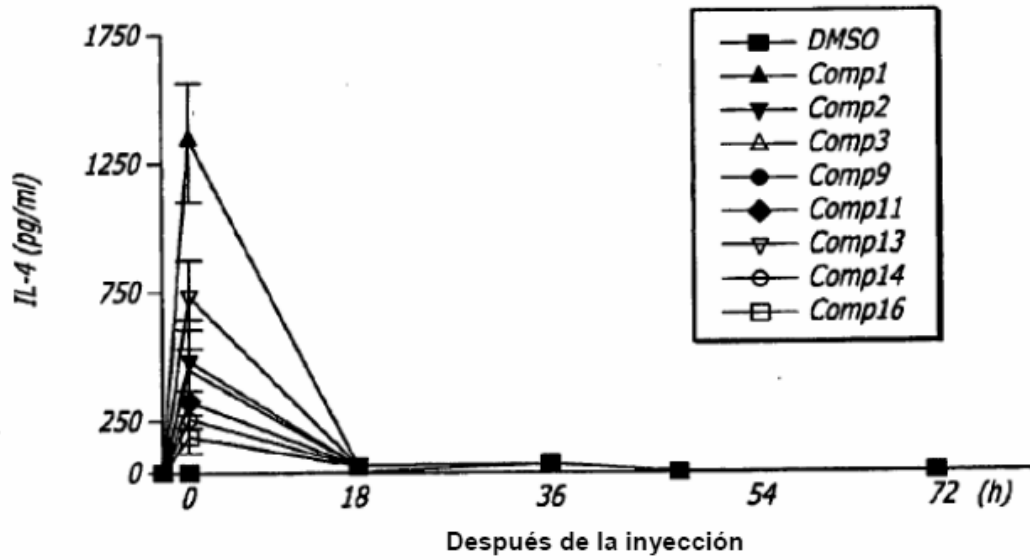


FIG. 23C

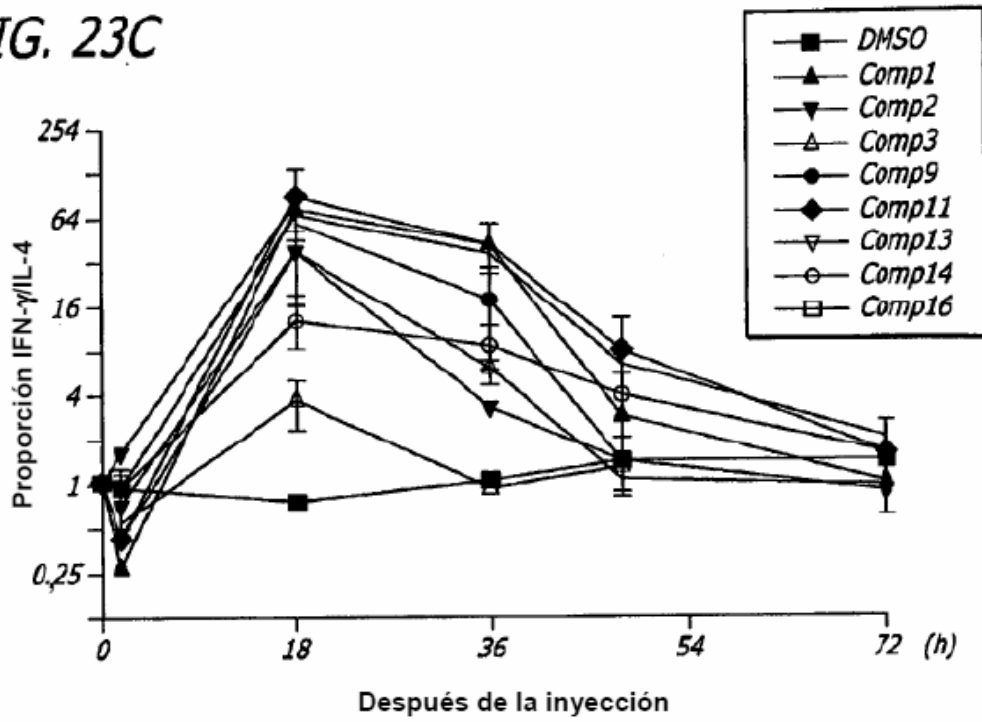
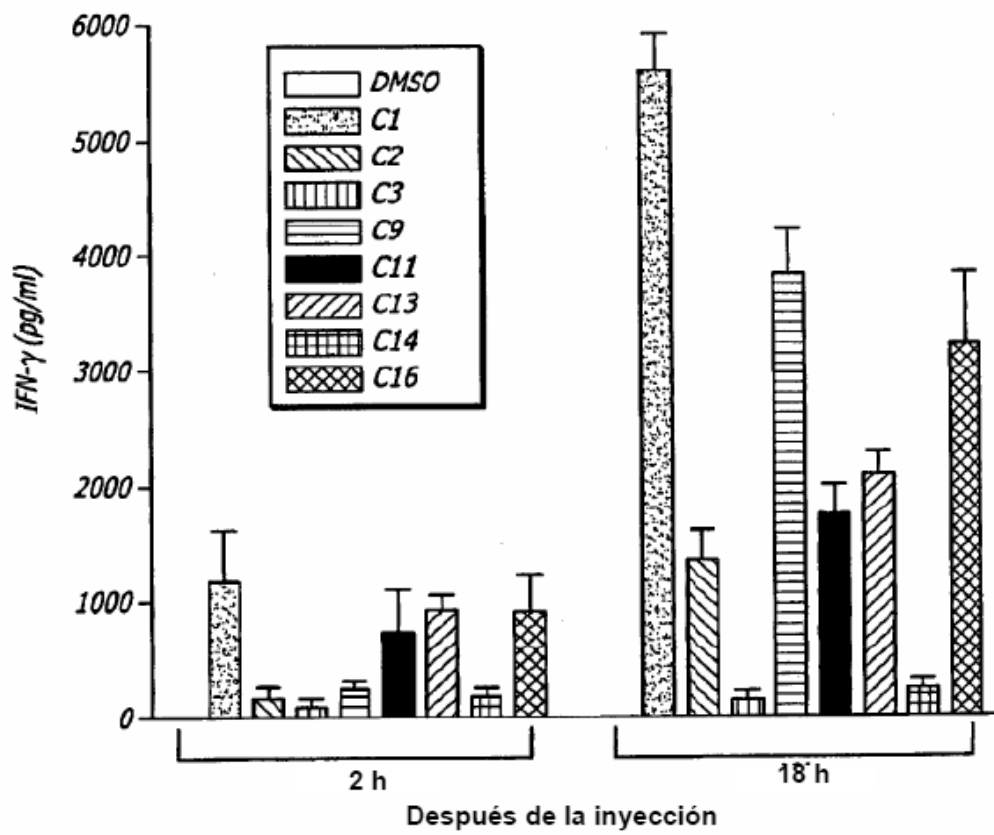


FIG. 24A



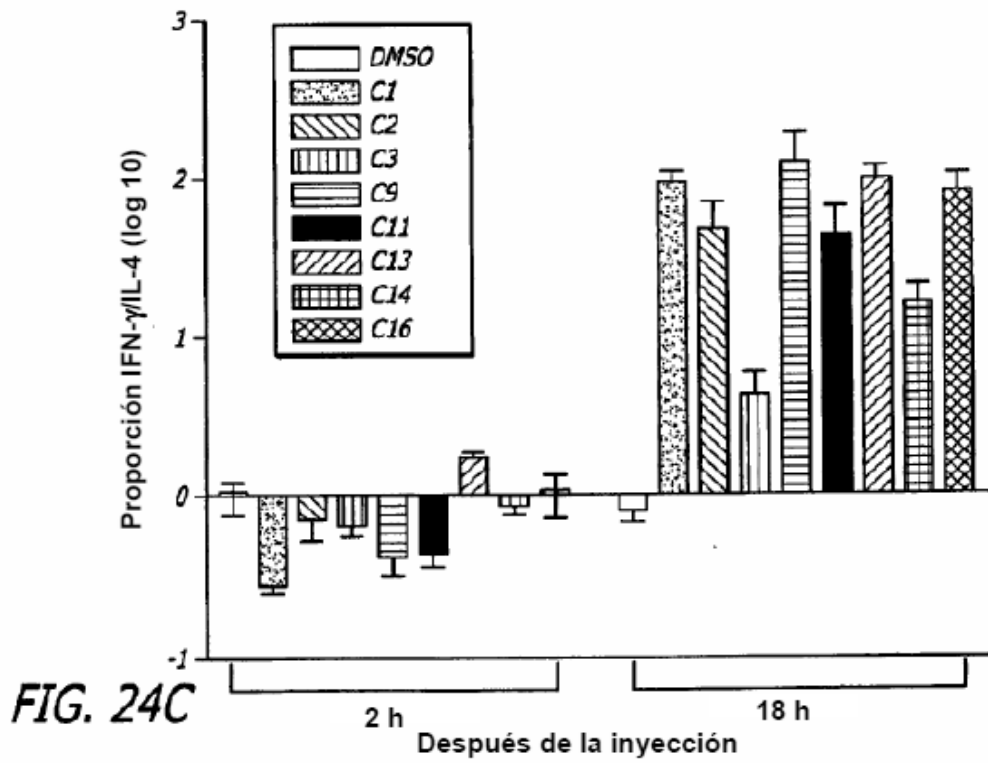
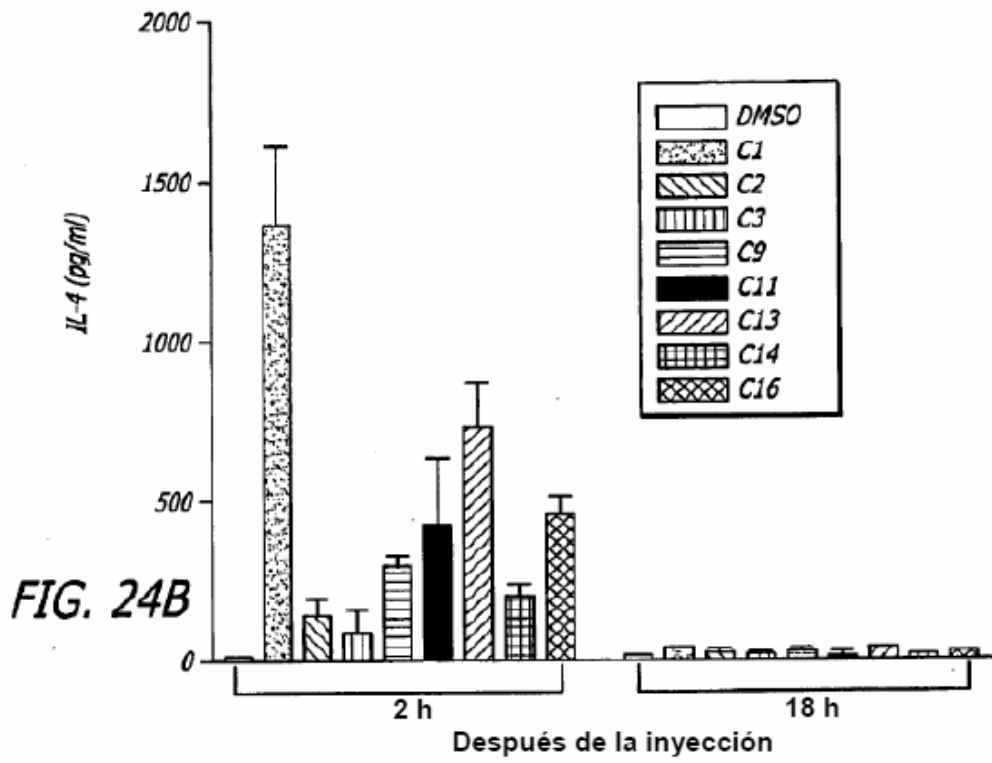


FIG. 25

Ratón	Basal pg/ml	C1 veces	C2 veces	C3 veces	C9 veces	C11 veces	C13 veces	C14 veces	C16 veces
Influido por T _H 1									
IFN- γ *	20,4	300	43,8	3,1	160,8	48,3	122,5	27,5	166,1
IL-18	85,3	7,8	2,4	2	3,2	4,7	3,4	4,8	3,4
IL-2	14,8	58,9	14	17,2	22	70,3	75,3	21,5	50,5
IL12 p70*	109	3,2	3,5	1,2	1,4	2,6	6,6	1,4	1,6
IL-12 p40*	69,4	2,8	0,9	1,9	2,1	3,8	3,5	4,4	2,4
RANTES	278	2,6	0,9	0,9	1,6	2,3	2,1	2,8	2,2
MIP-8	291	3,6	1,5	1,4	2,5	3,8	5,3	1,8	5,1
MCP-1	122	18,7	2,6	5,6	14,8	19,4	32,9	8	23,6
KC	180	30,5	3,9	7,6	16,4	11	19,2	16,1	6,9
TNF α *	8	51	2	6	36,3	22,4	38,8	8,7	45,6
IL-3	8,35	3	1,5	2,8	1,8	2,4	2,3	10,4	1,9
GM-CSF	82,8	13,1	1,6	4,9	7,3	2,9	7,9	37,6	2,7
Influido por T _H 2									
IL-4	7,46	240	26,2	26,8	42,9	53,1	115	21,2	49,6
IL-6	33,1	5,5	1,5	1,7	2,2	2,8	6,3	4,9	5,8
IL-10*	81,2	3,6	5,4	1,1	2,4	1,3	2,2	1,5	1,3
IL-13	75,8	15,1	0,9	2,3	2,4	10,9	12,6	1,7	7,7

FIG. 26A

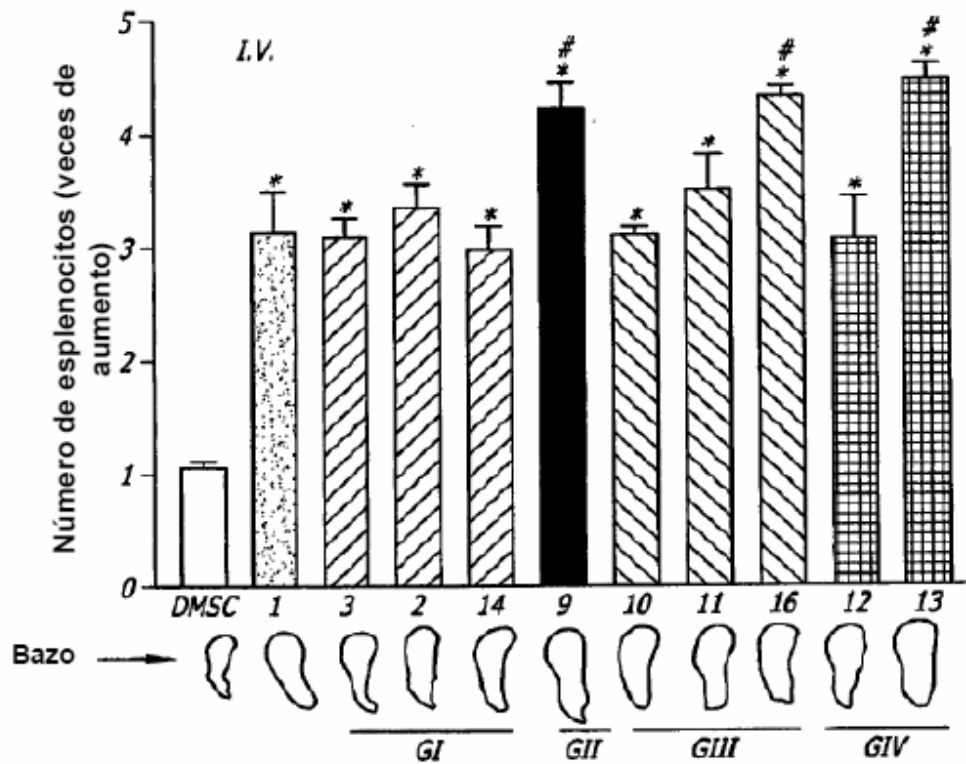


FIG. 26B

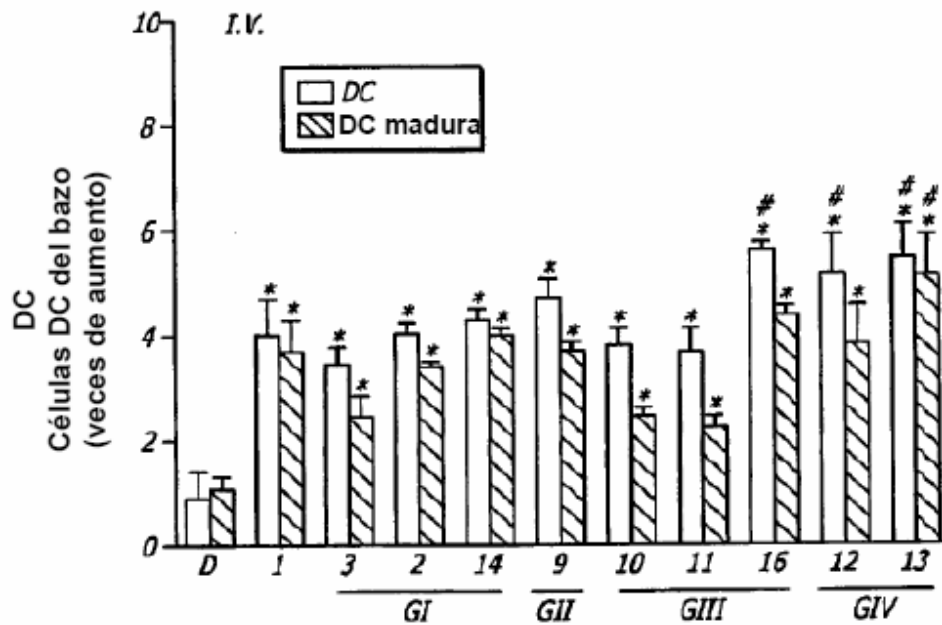


FIG. 26C

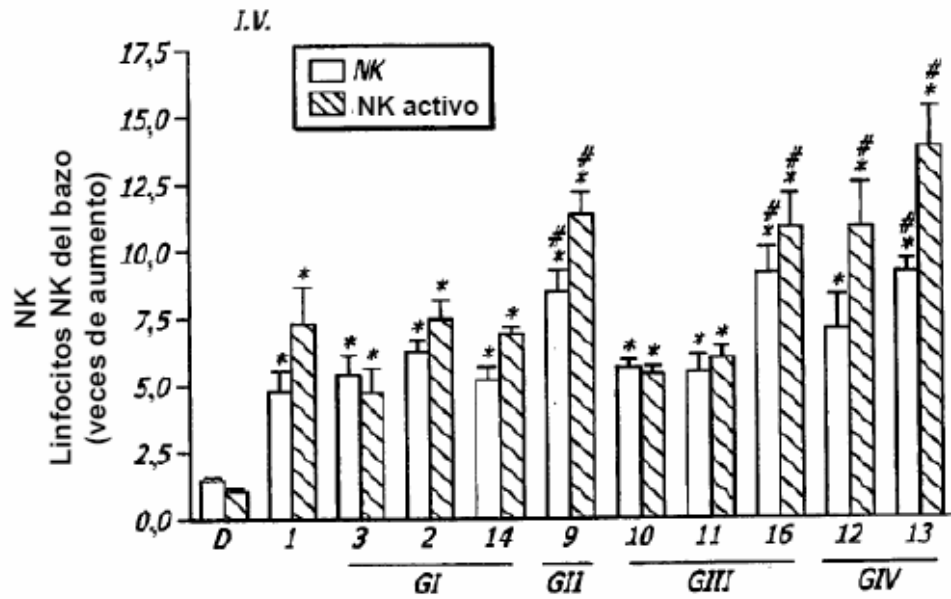


FIG. 26D

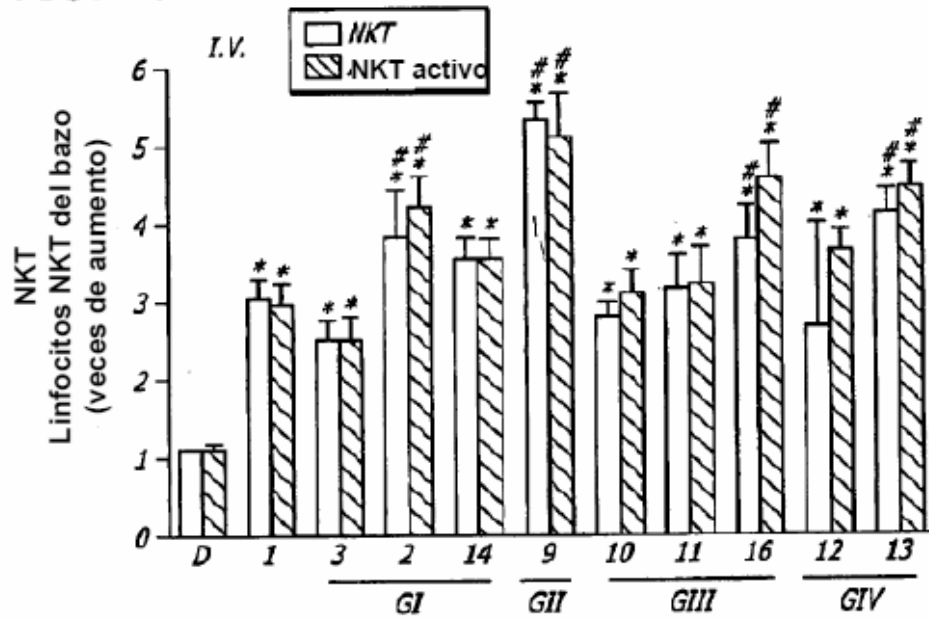


FIG. 26E

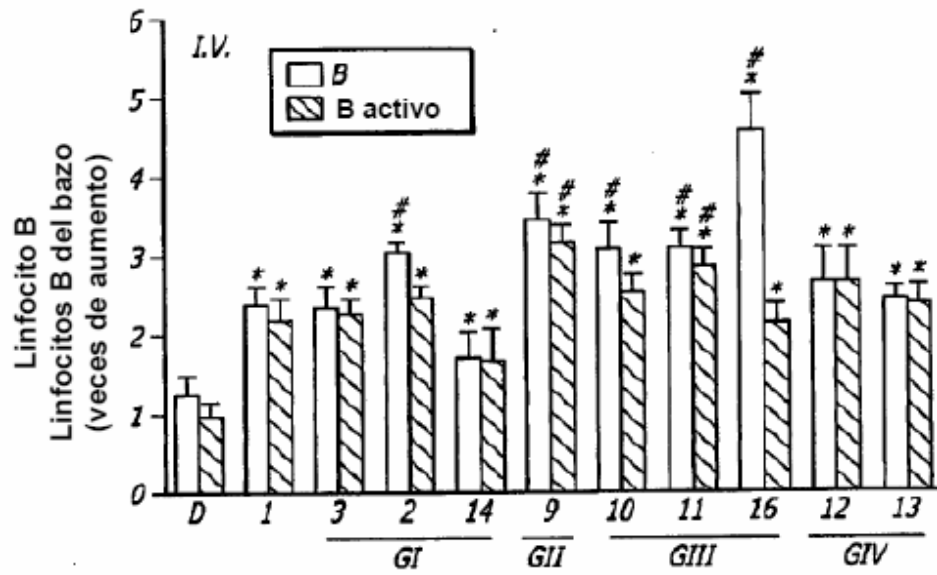
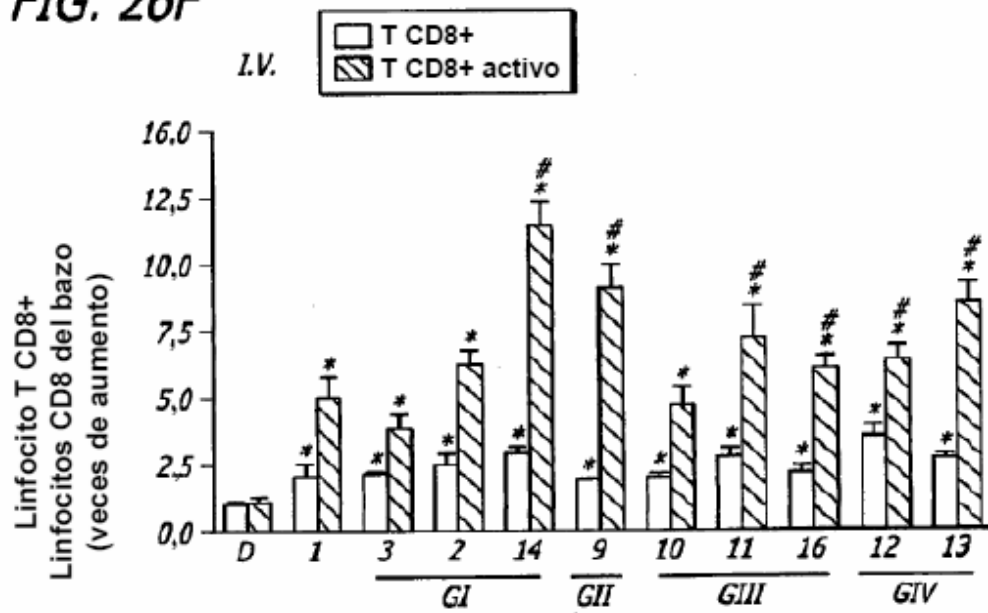


FIG. 26F



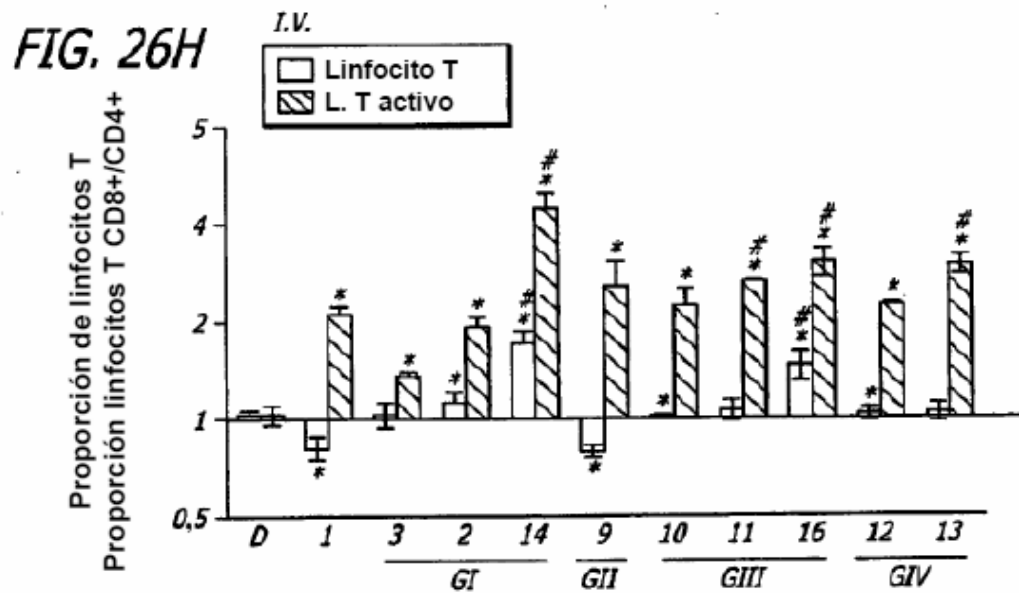
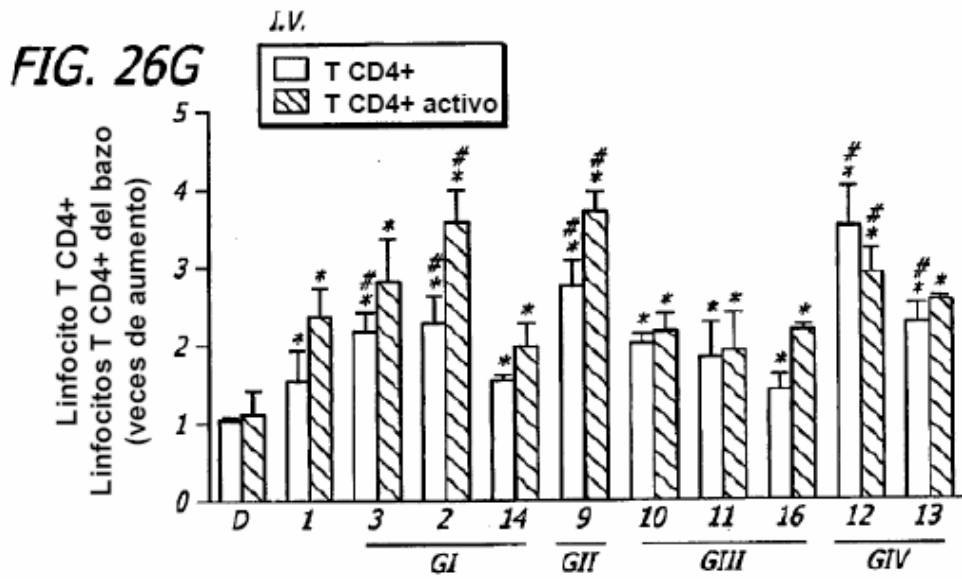


FIG. 27A

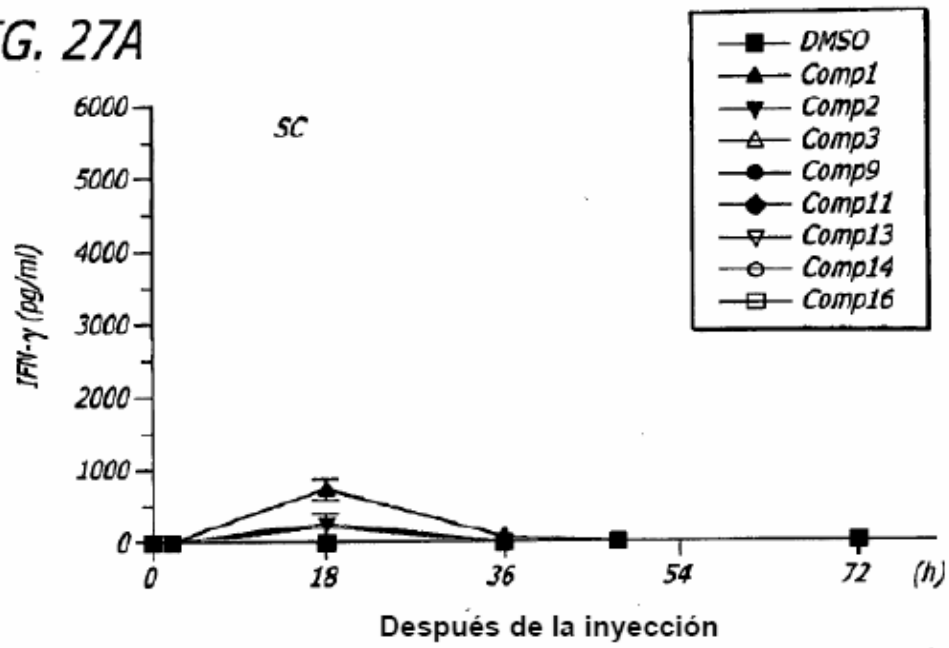


FIG. 27B

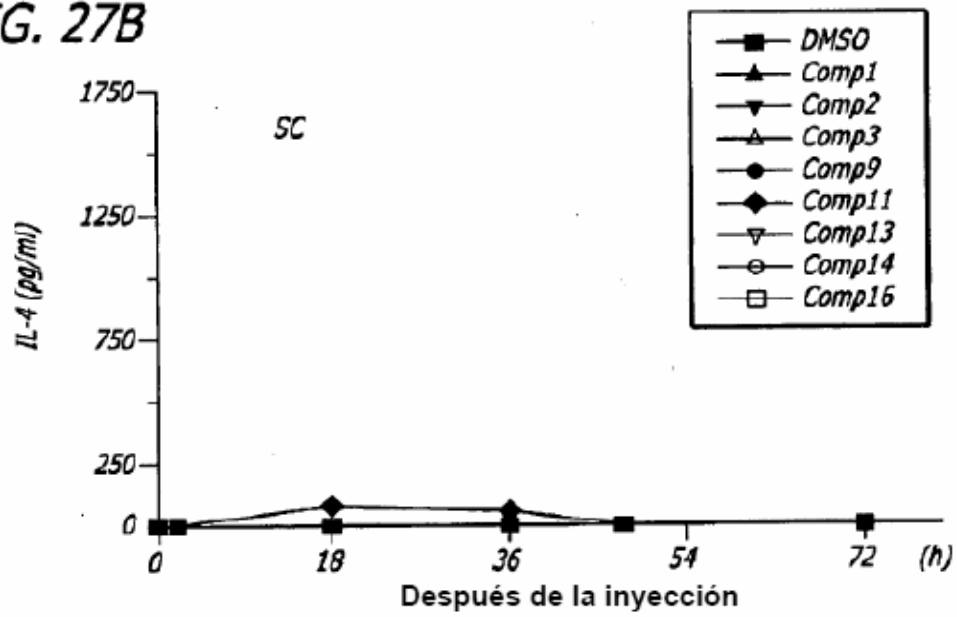


FIG. 27C

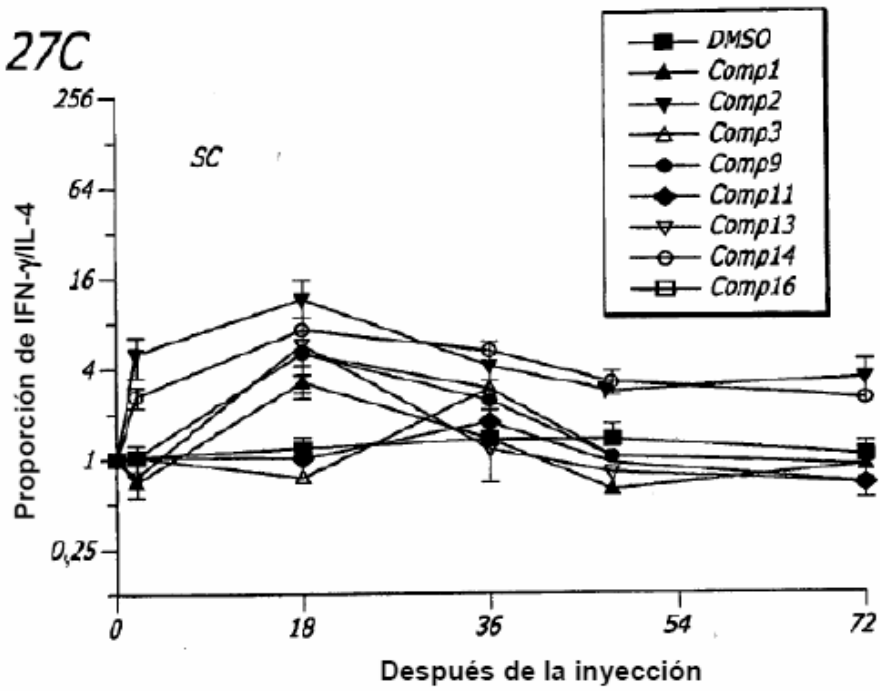


FIG. 28A

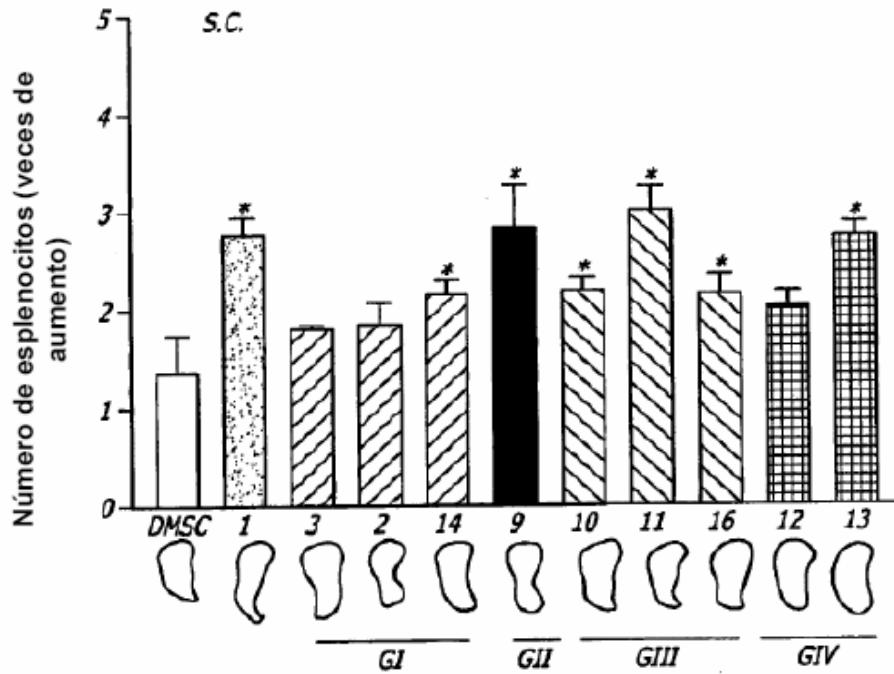


FIG. 28B

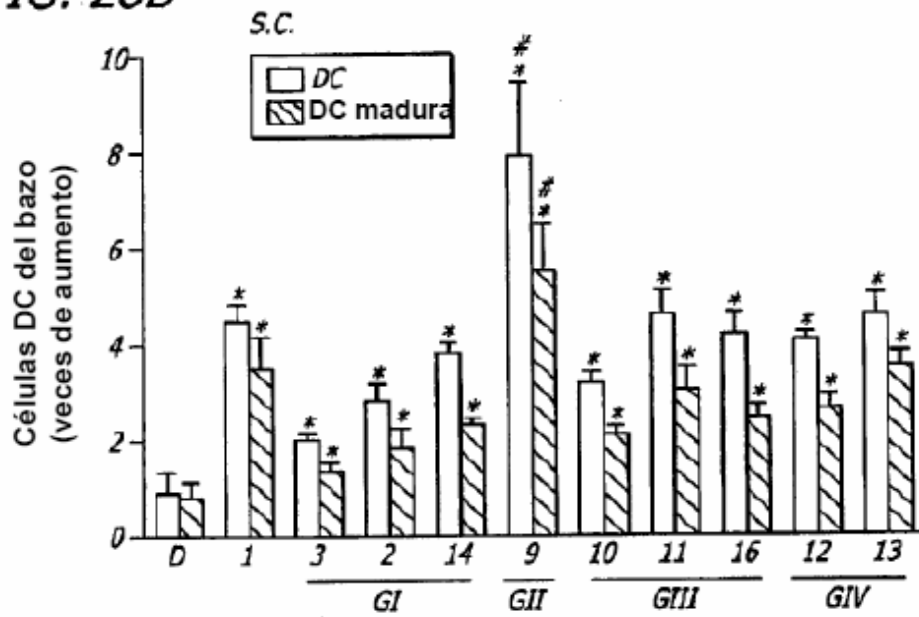


FIG. 28C

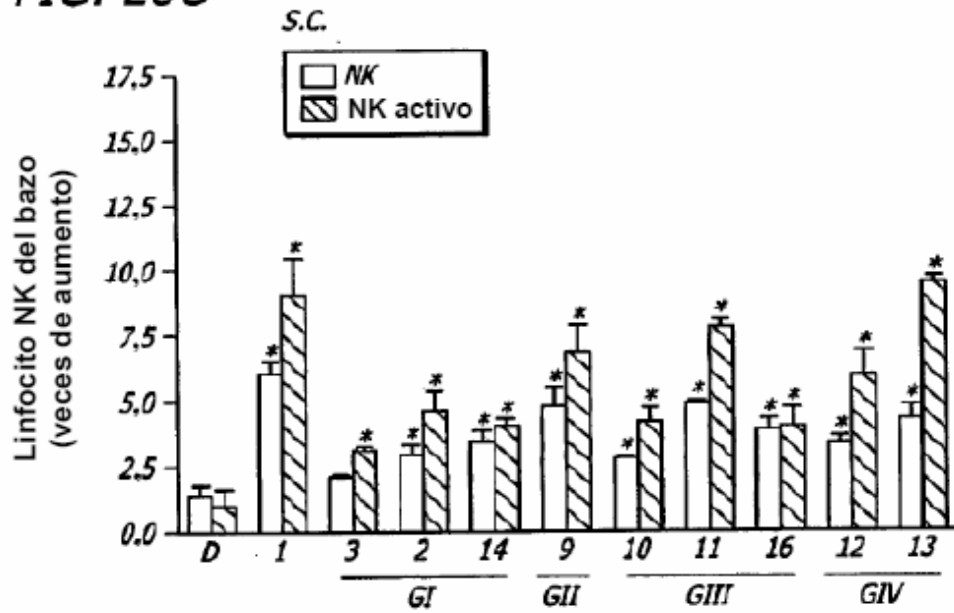


FIG. 28D

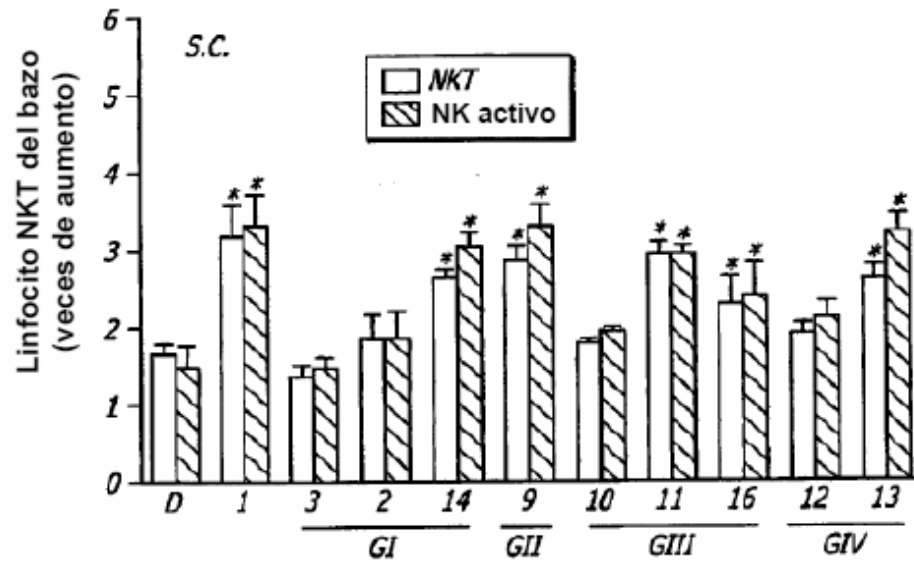


FIG. 28E

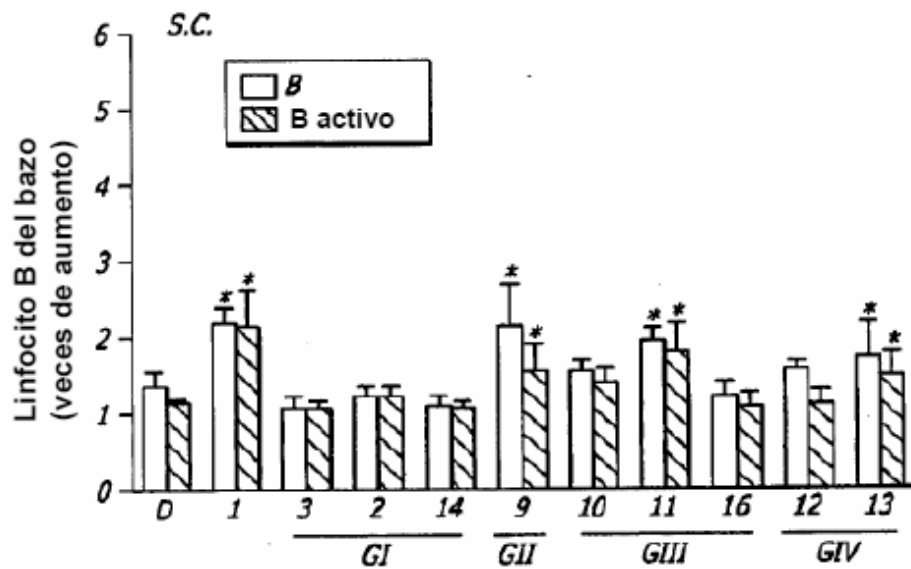


FIG. 28F

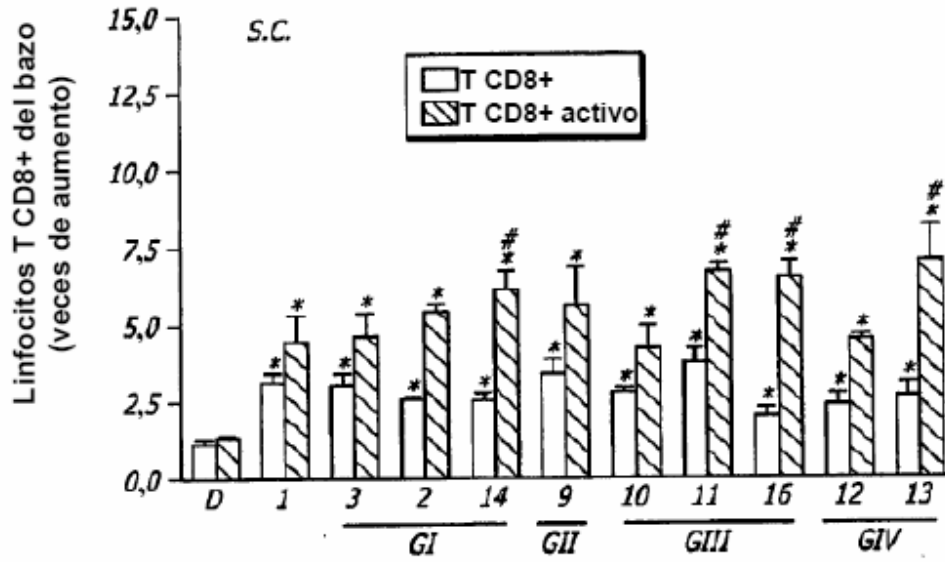


FIG. 28G

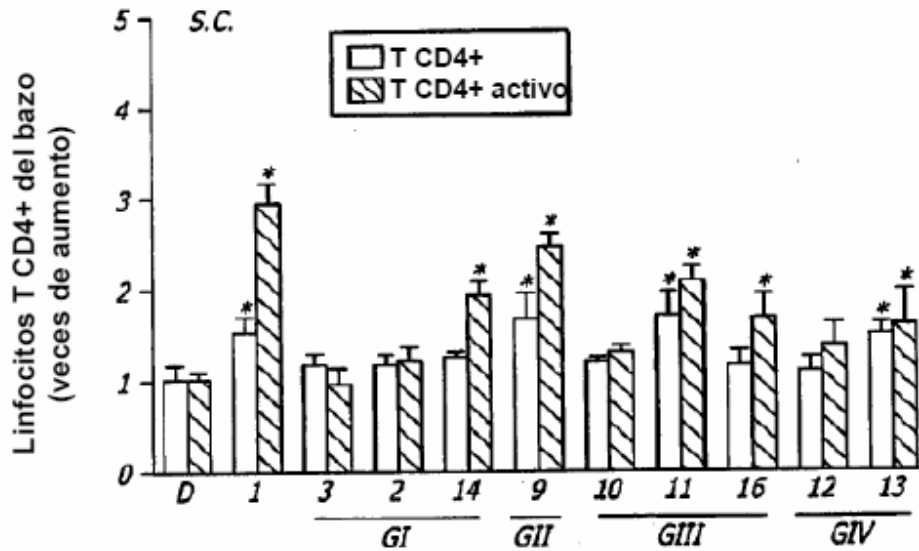


FIG. 28H

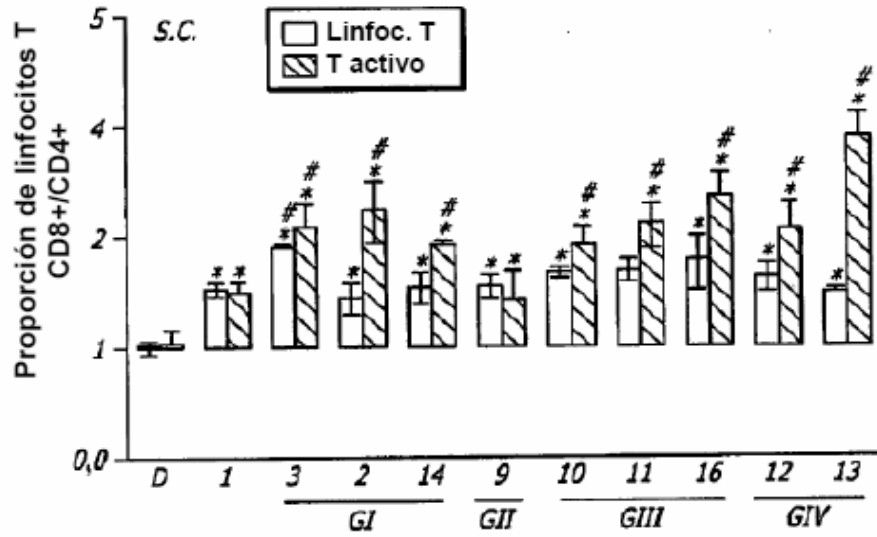


FIG. 29A

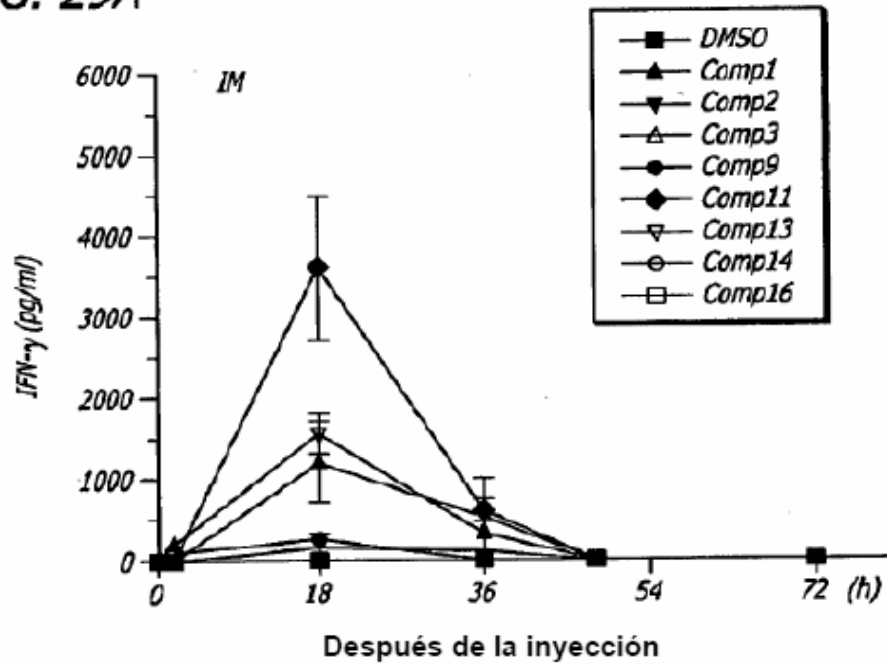


FIG. 29B

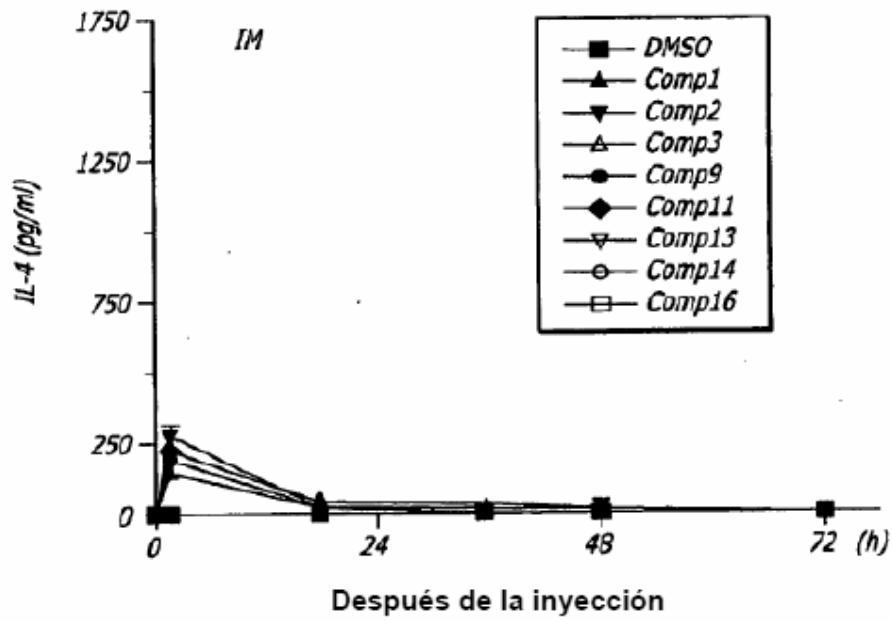


FIG. 29C

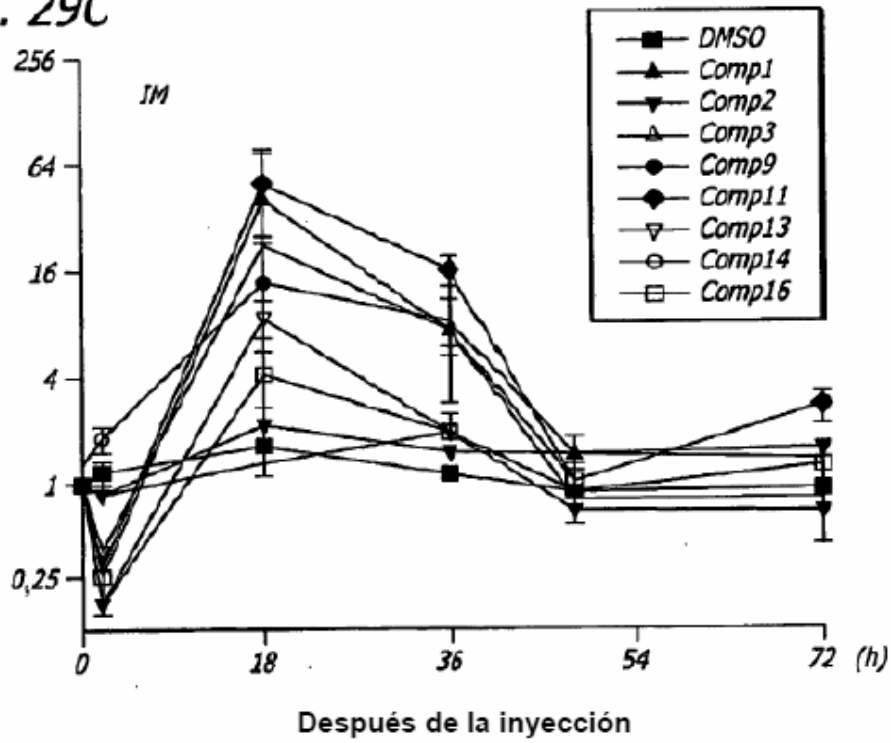


FIG. 30A

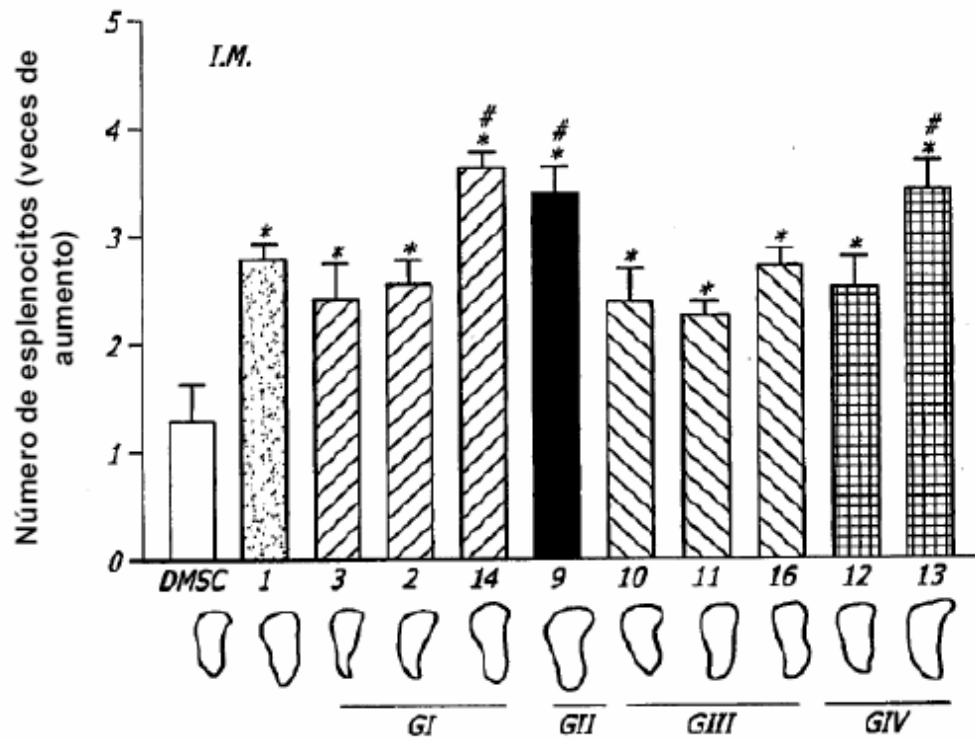


FIG. 30B

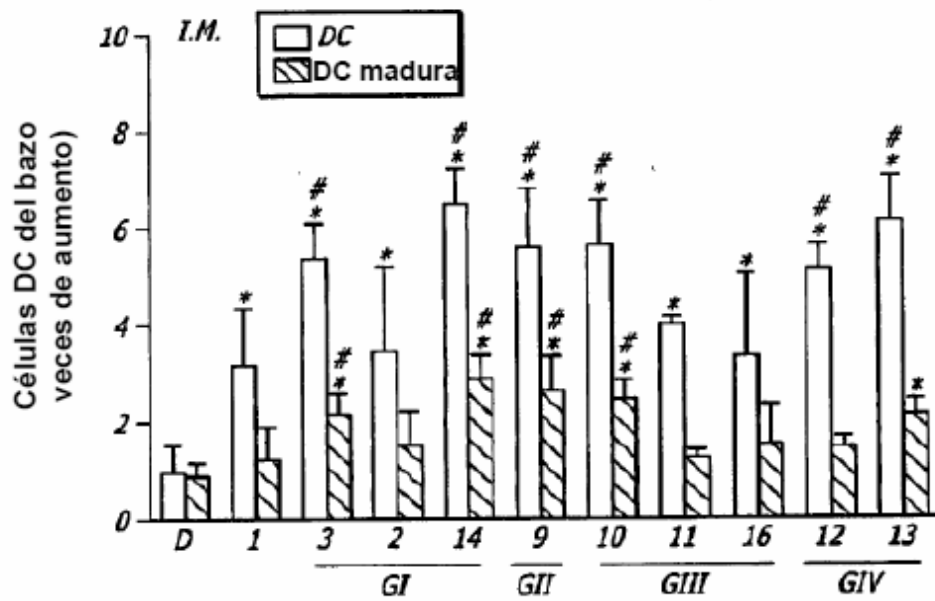


FIG. 30C

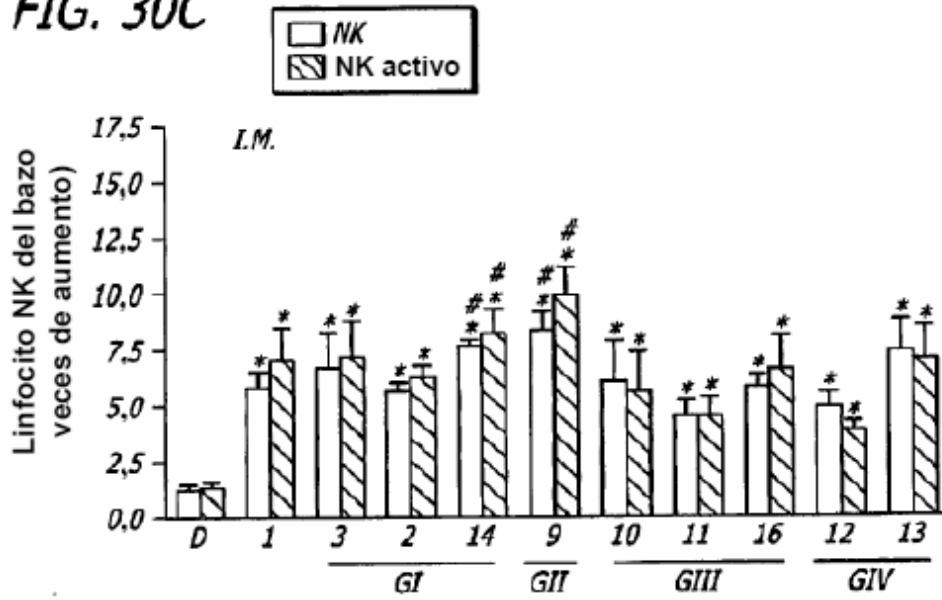


FIG. 30D

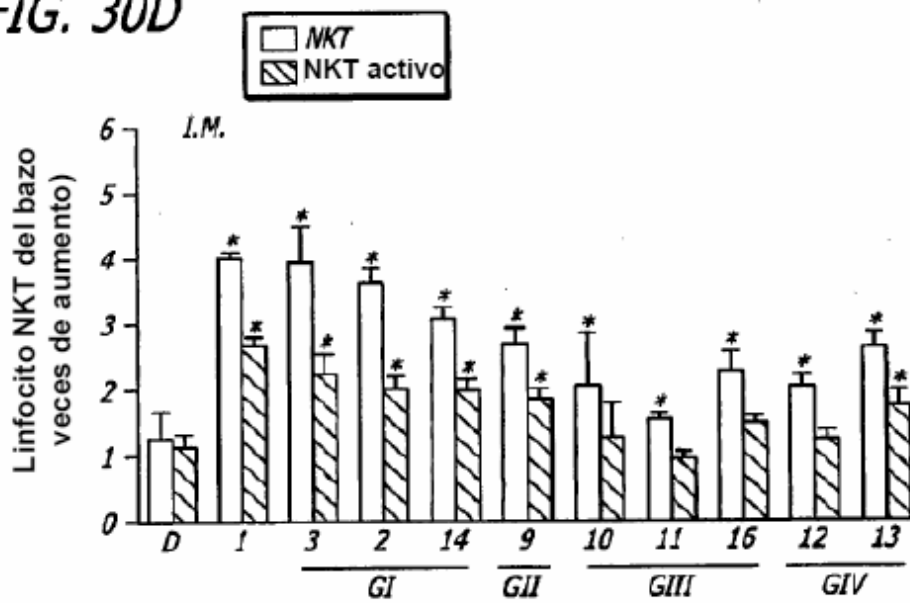


FIG. 30E

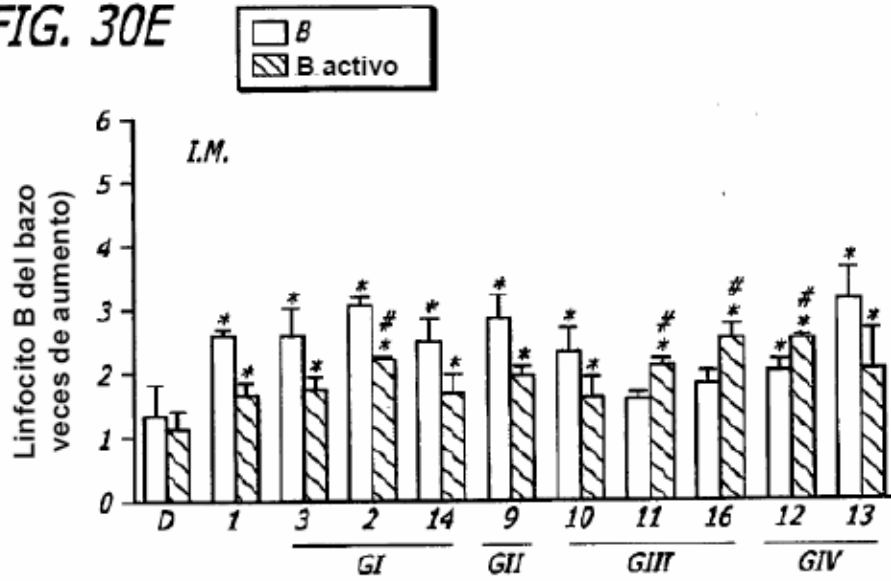


FIG. 30F

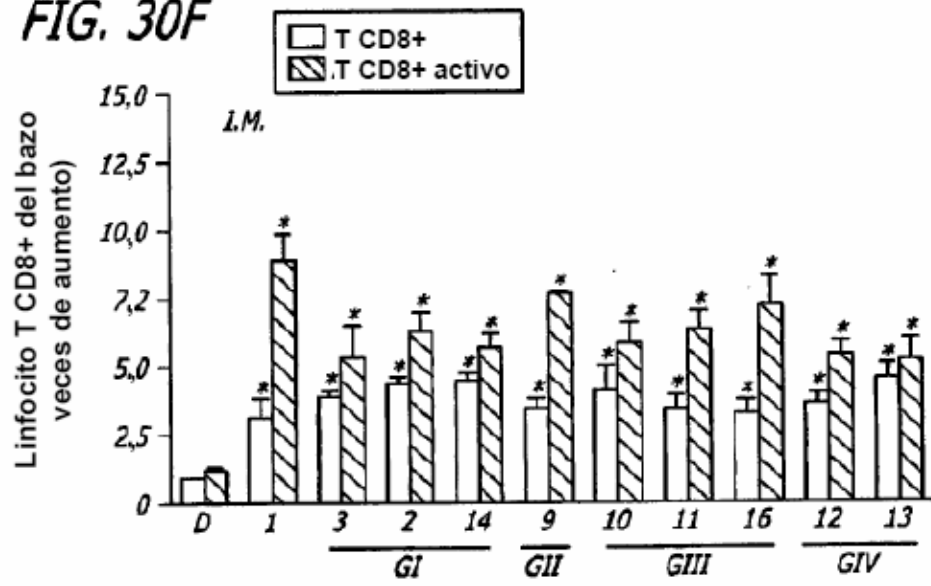


FIG. 30G

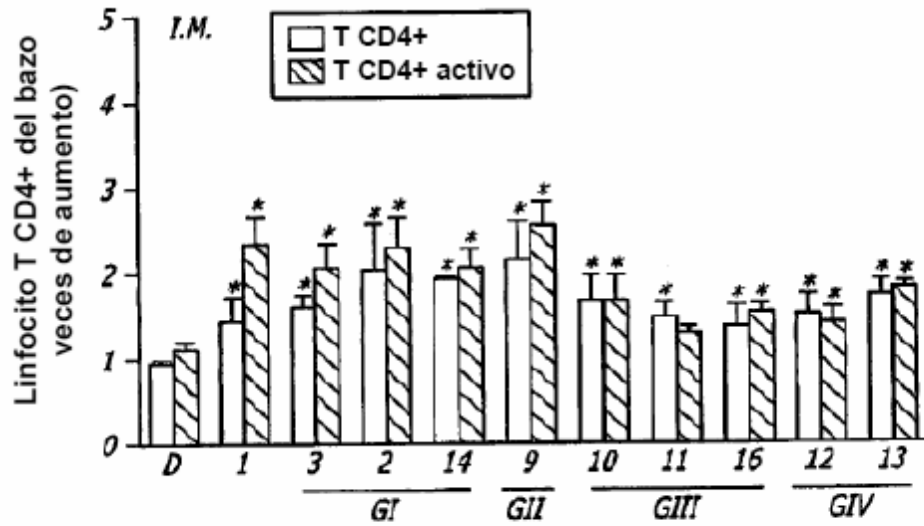


FIG. 30H

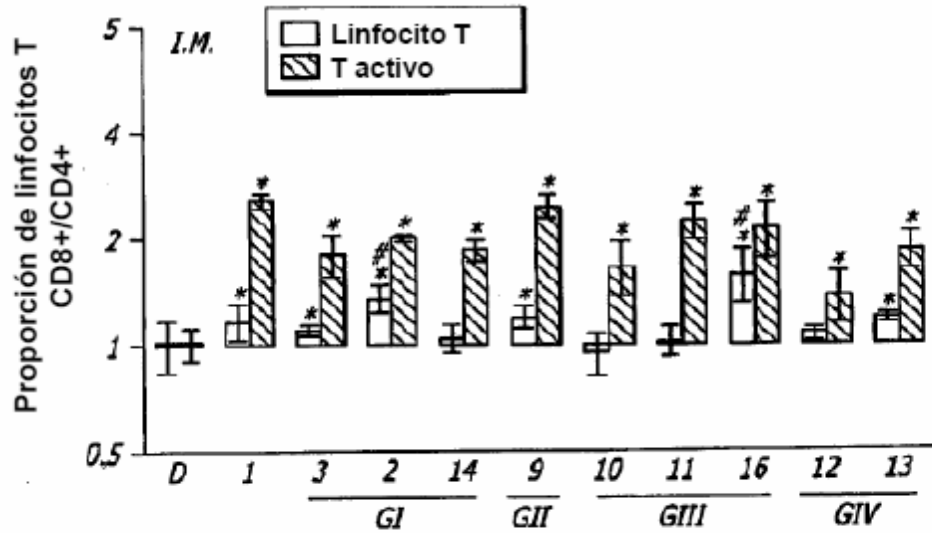


FIG. 31A

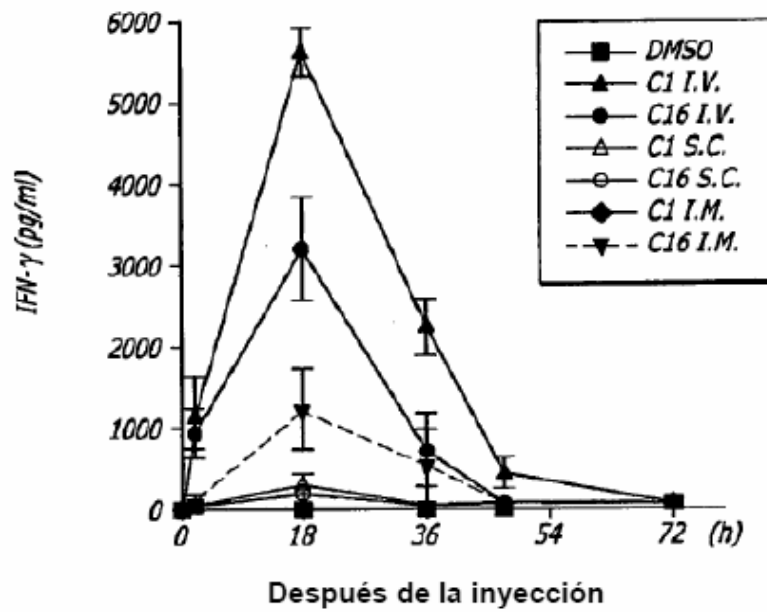


FIG. 31B

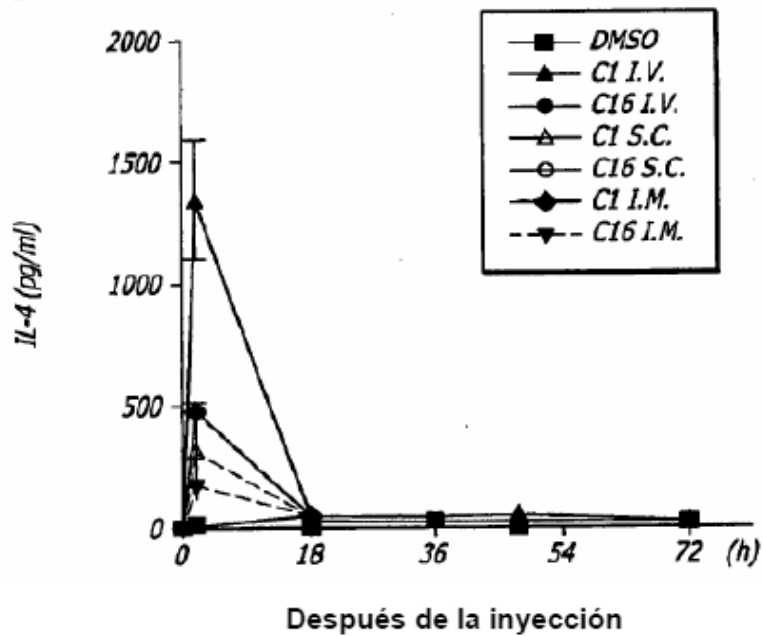


FIG. 31C

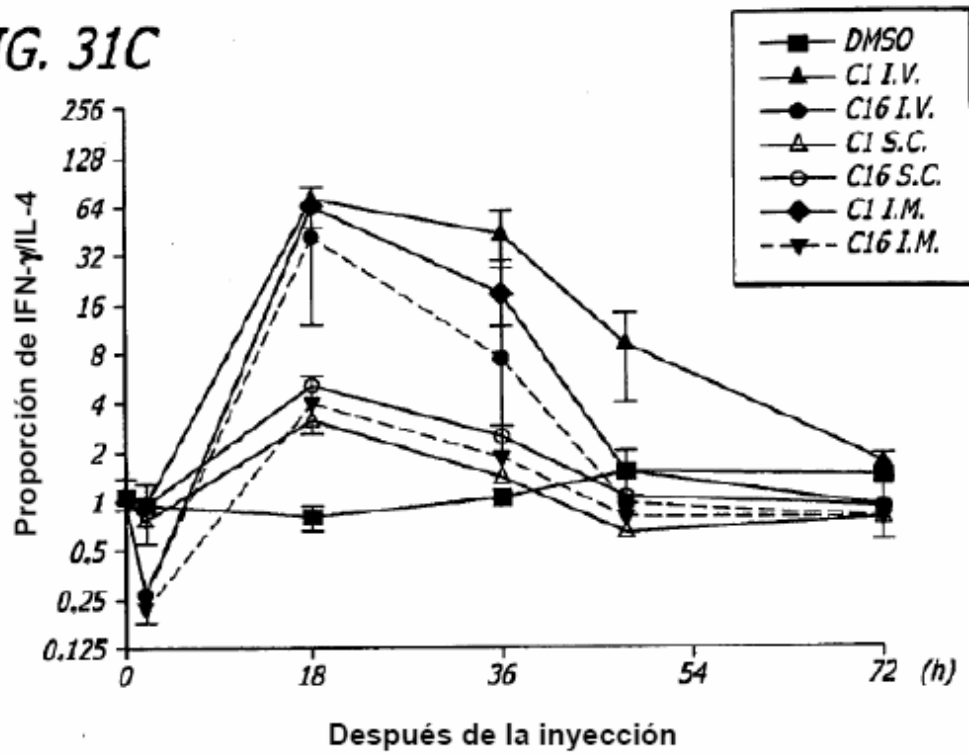


FIG. 31D

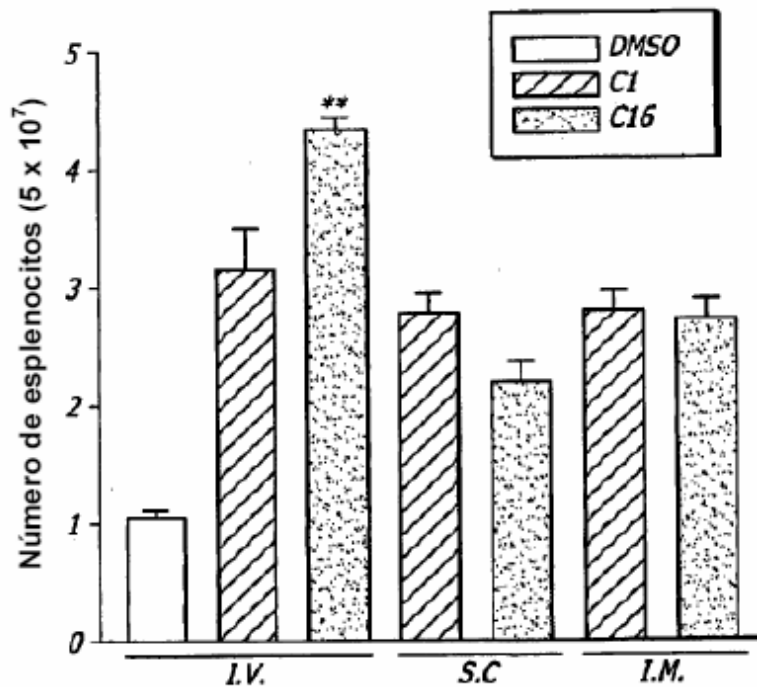


FIG. 31E

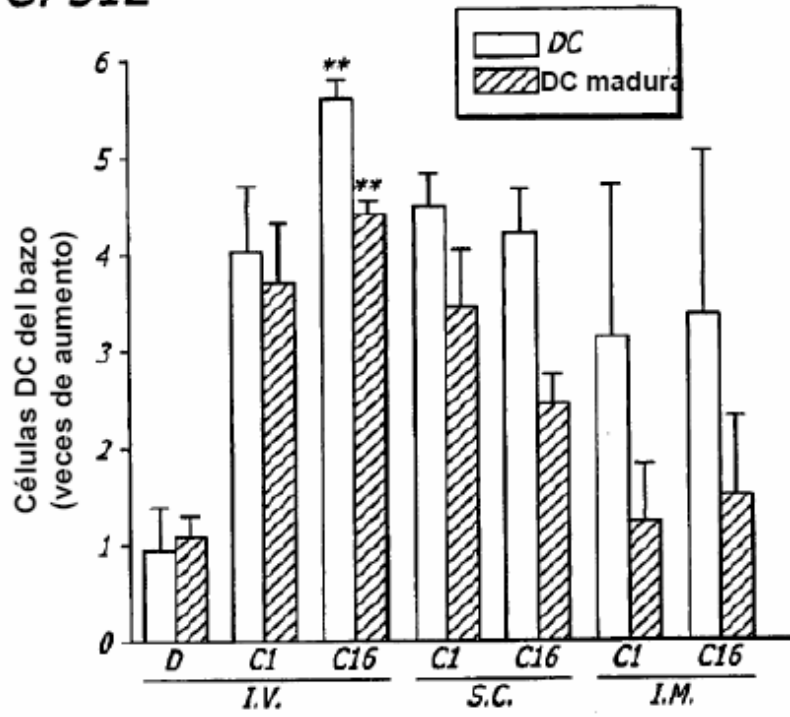


FIG. 31F

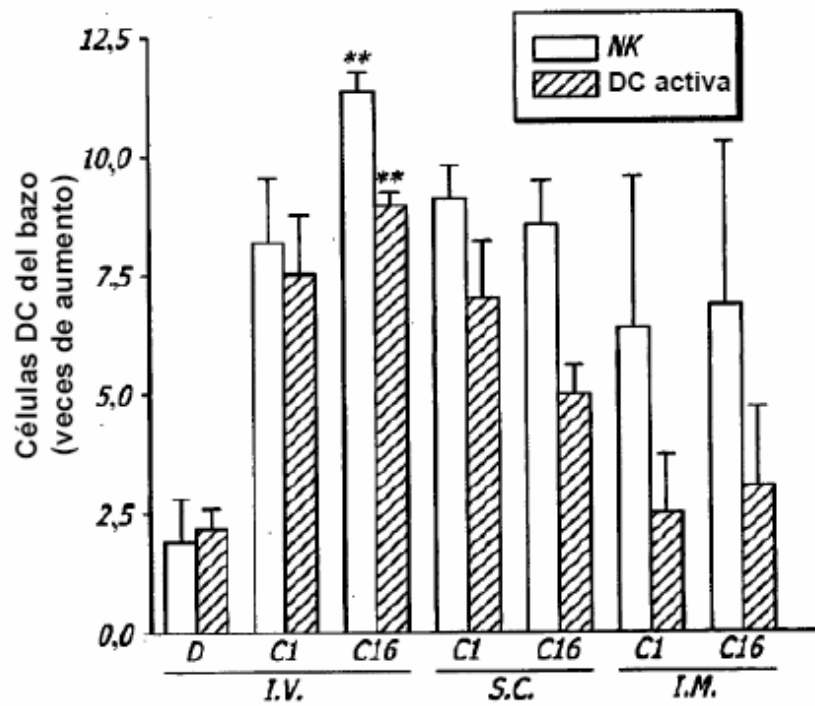


FIG. 31G

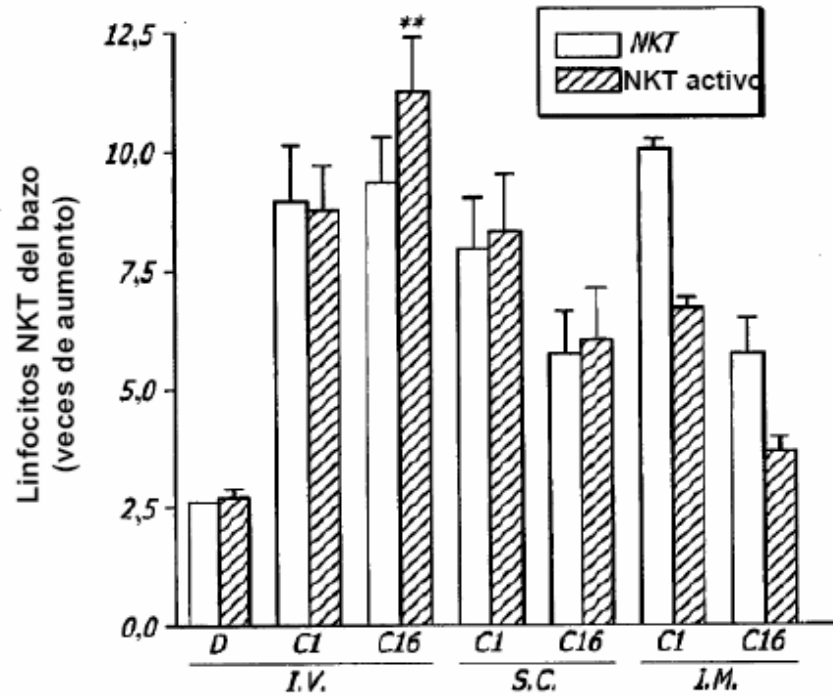


FIG. 31H

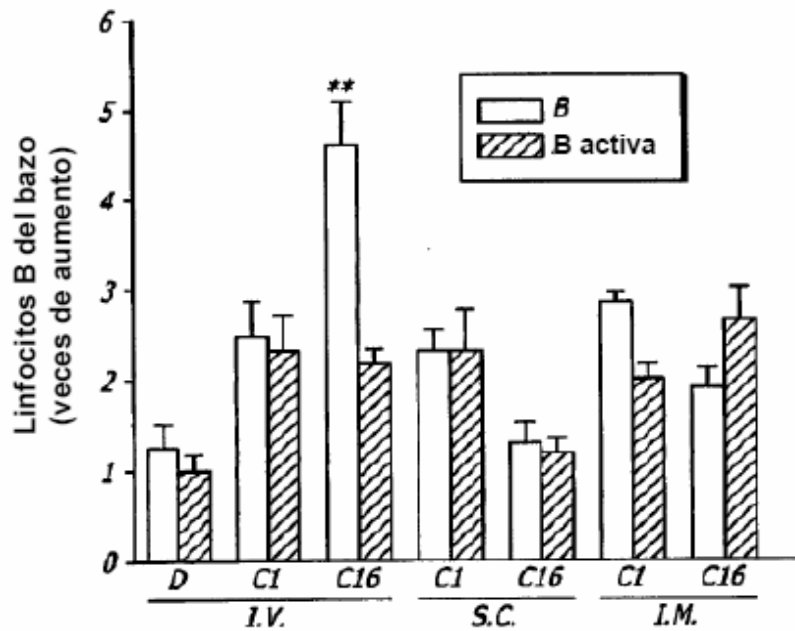


FIG. 31I

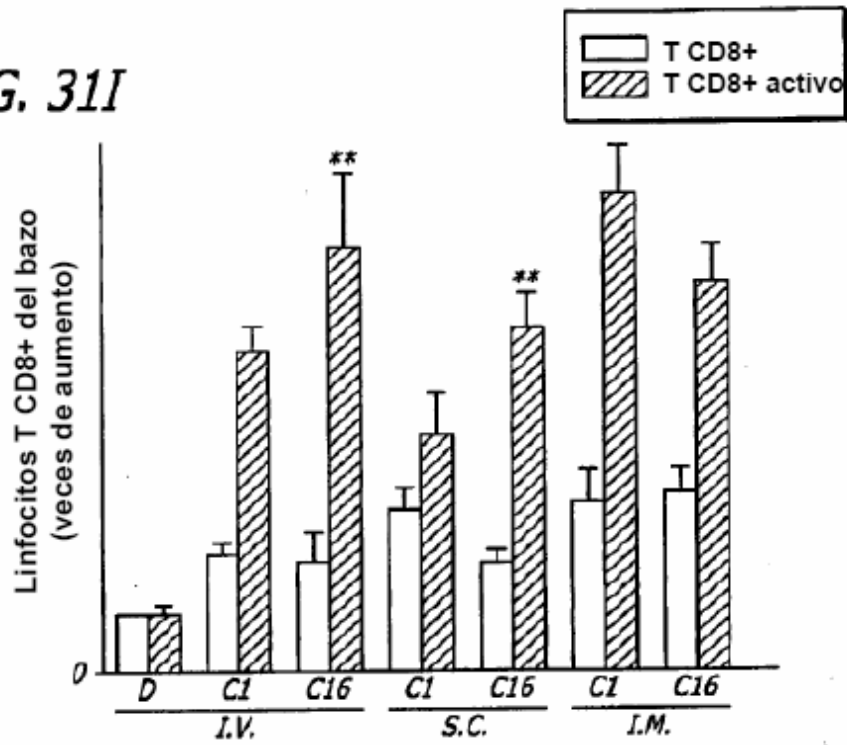


FIG. 31J

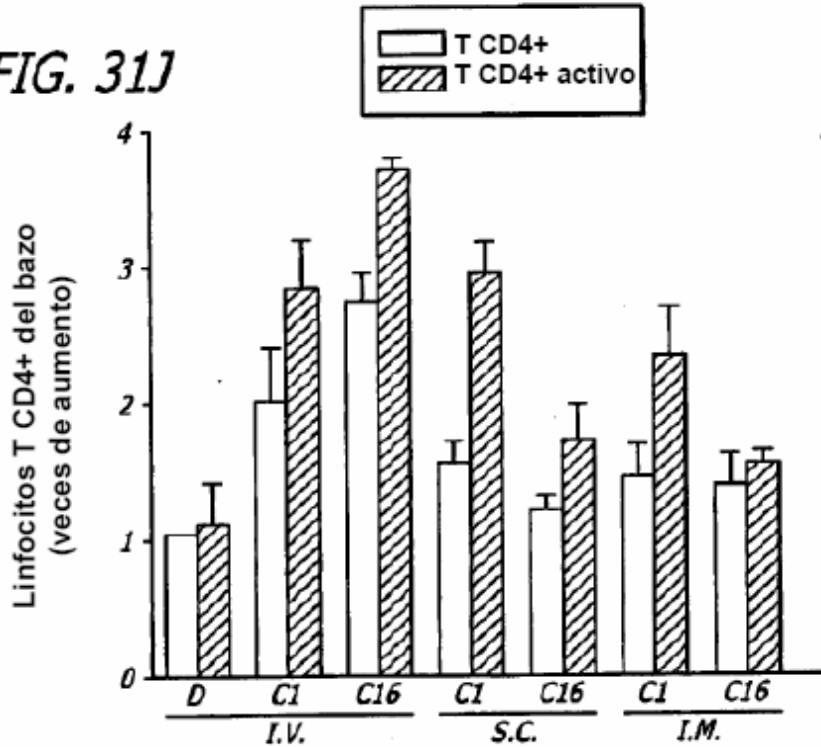


FIG. 31K

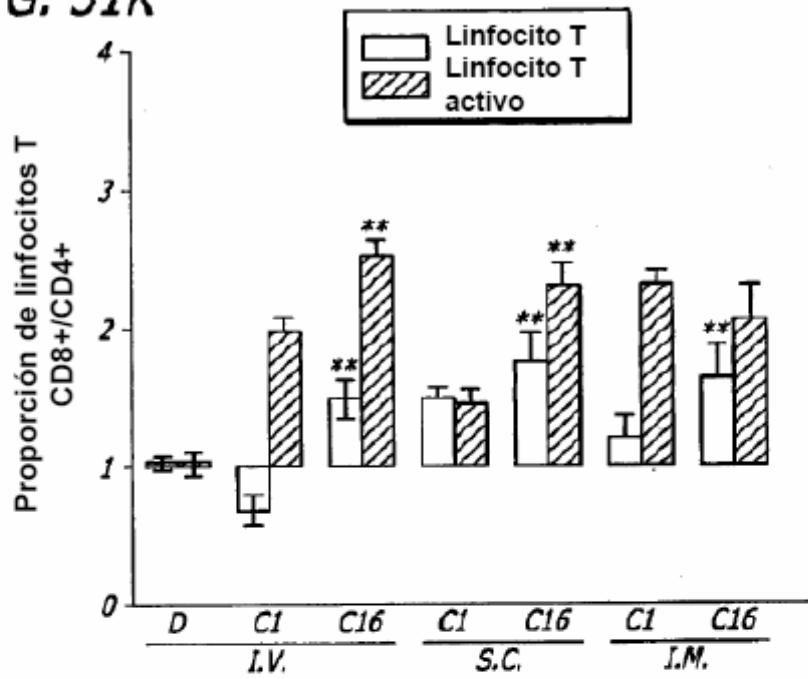


FIG. 32A

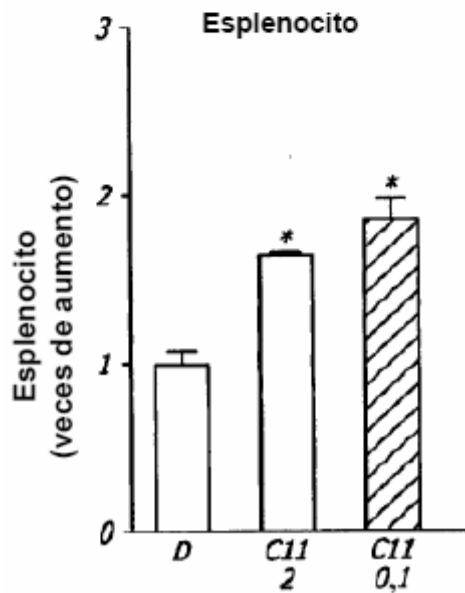


FIG. 32B

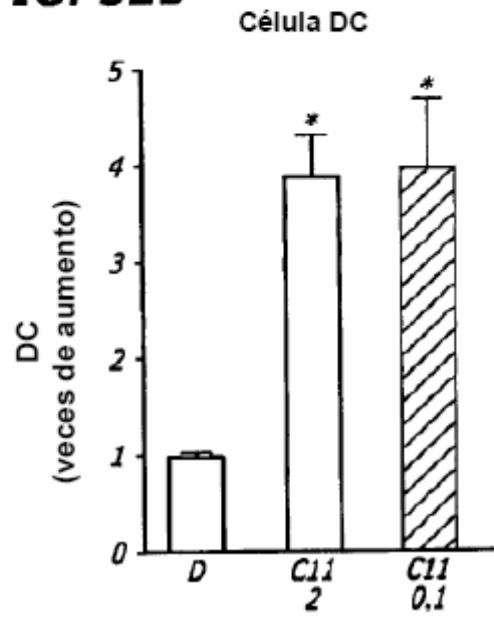


FIG. 32C

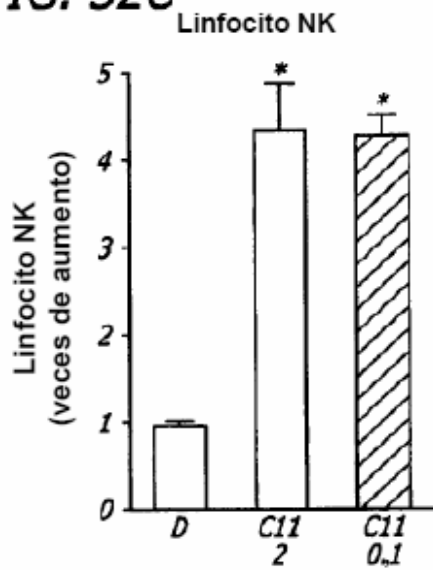


FIG. 32D

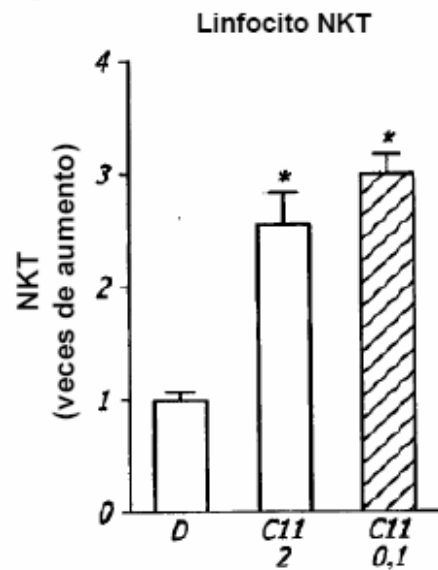


FIG. 32E

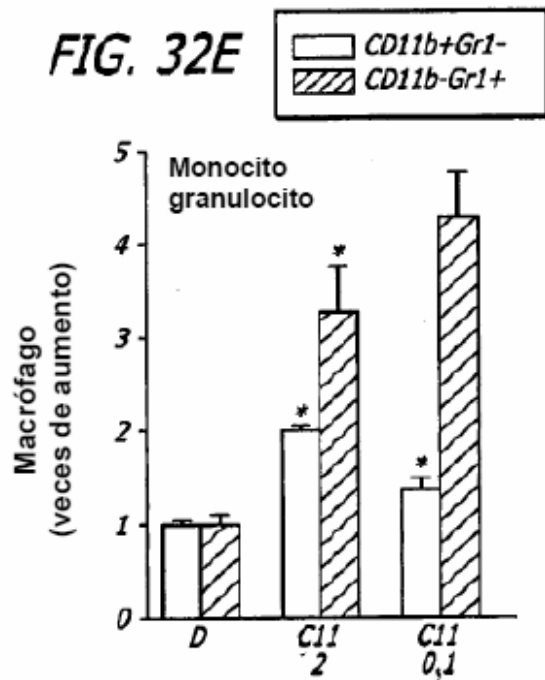
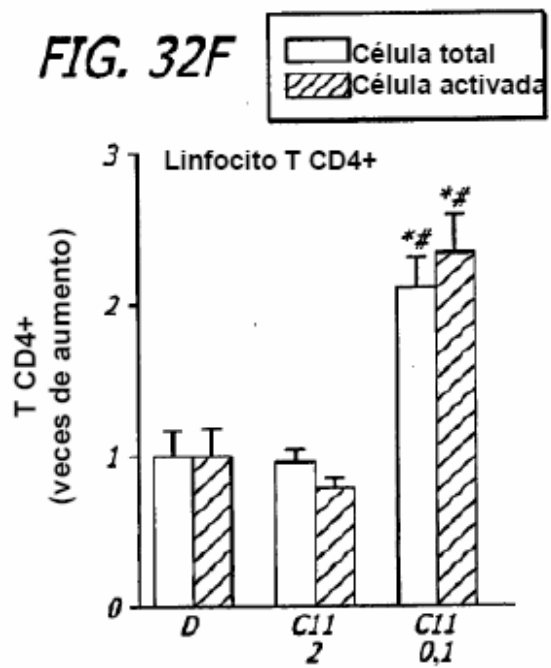
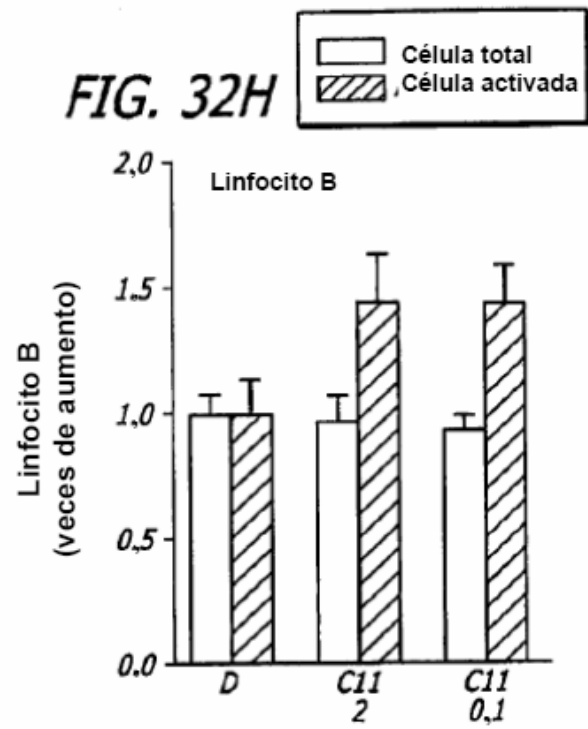
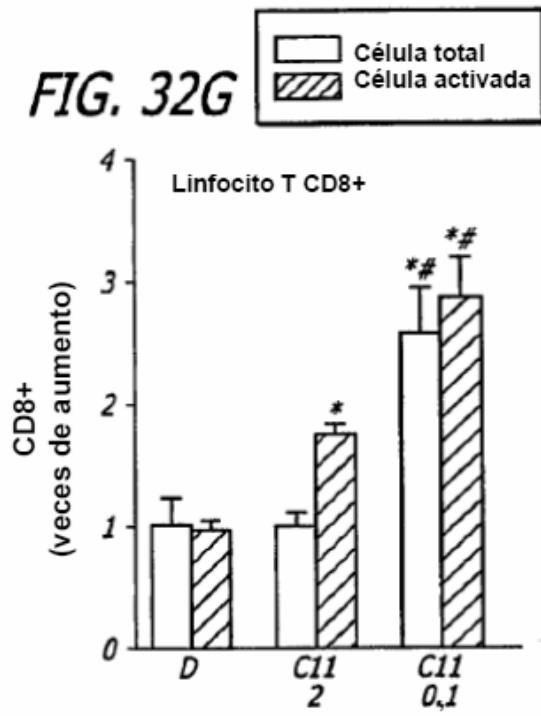
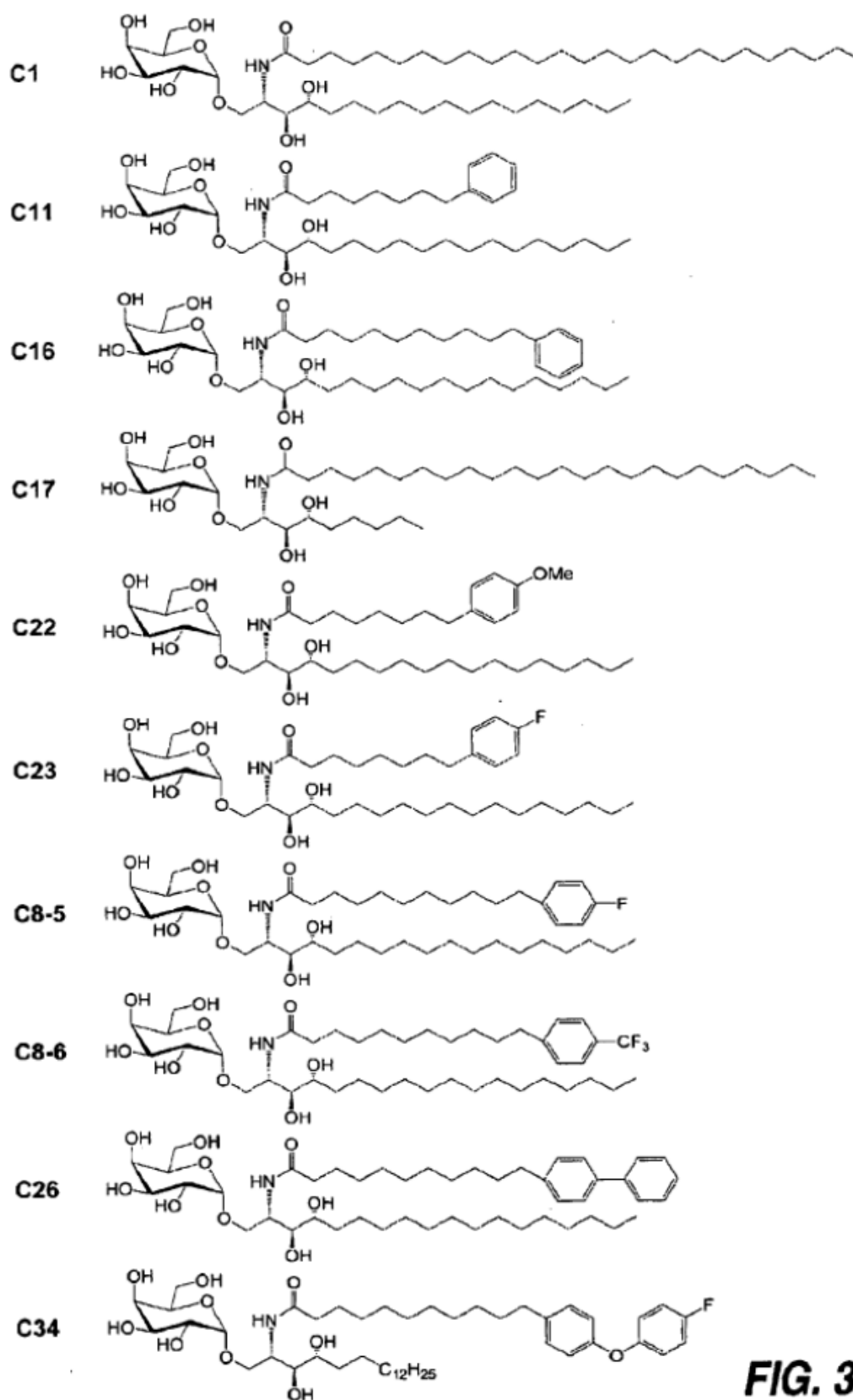


FIG. 32F





**FIG. 33A**

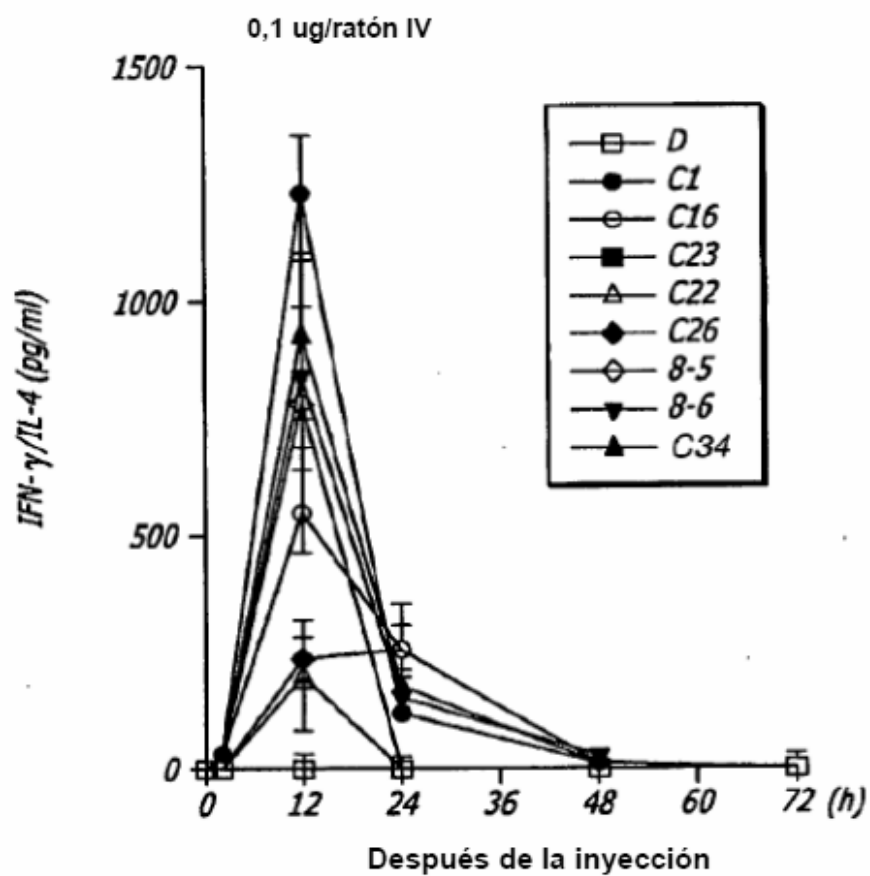
**FIG. 33B**

FIG. 33C

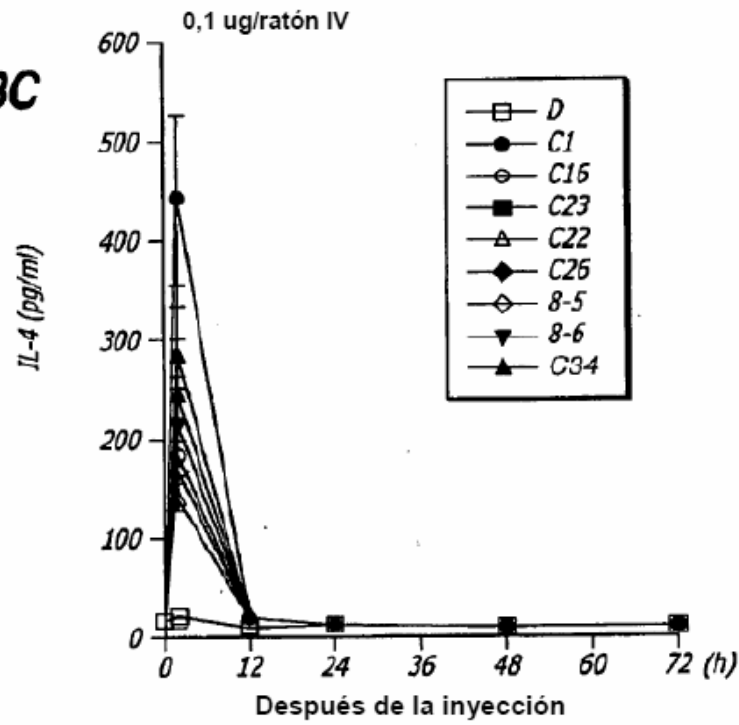


FIG. 33D

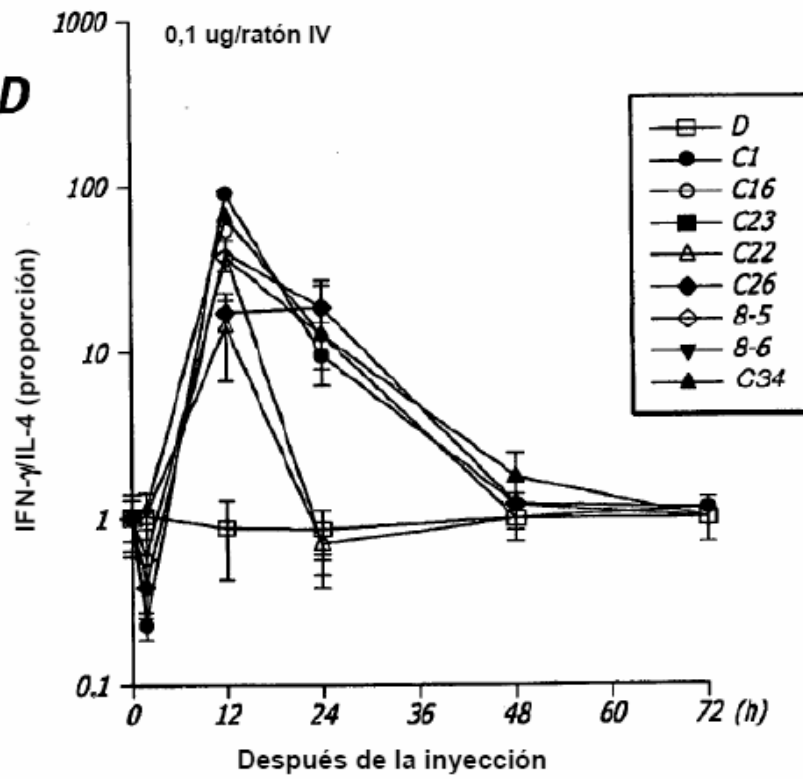


FIG. 34

24 citocinas/quimiocinas

Suero de ratón	D 2 h	C1 2 h	C23 2 h	C26 2 h	C8-5 2 h	C30 2 h	C17 2 h	D3 8 2 h	C1 18 h	C23 18 h	C26 18 h	C8-5 18 h	C30 18 h	C17 18 h
influida por TH1	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
IFN- γ	23	106	63	66	19	99	77	20	1270	706	341	713	890	110
IL-1 α	78	171	62	119	65	153	75	53	50	92	94	145	110	67
IL-1 β	59	110	224	62	69	152	111	75	49	298	86	60	103	73
IL-2	25	323	26	28	75	413	82	27	19	45	32	37	31	51
IL-12 p40	109	120	133	164	62	93	374	81	72	617	284	131	119	181
IL-12 p70	172	279	1062	553	156	417	912	110	1690	2105	783	1065	2393	260
KC	216	2027	303	223	1567	2450	455	225	494	275	256	318	352	231
MCP-1	477	1270	573	583	1510	2780	631	467	837	1263	837	580	588	392
MIP-1 β	78	322	85	77	385	345	155	52	107	124	113	238	174	115
RANTES	191	279	322	298	233	336	370	206	178	769	327	266	223	108
influida por TH2														
IL-4	19	455	185	213	214	263	322	8	21	29	24	19	18	19
IL-6	20	49	90	24	26	39	53	47	24	220	57	50	41	23
IL-10	69	296	452	84	66	243	331	138	237	858	141	185	227	145
IL-13	47	101	56	39	38	174	112	51	79	136	39	92	114	91
TH17														
IL-17	247	253	579	582	341	314	639	277	128	1245	632	321	230	129
Otras														
TNF- α	20	195	22	19	59	140	35	23	40	30	31	37	43	17
VEGF	56	59	60	67	45	66	74	65	133	123	115	109	135	55
GM-CSF	27	347	28	74	54	202	89	15	14	114	64	16	24	11
IL-3	38	42	68	107	23	25	82	23	27	339	138	85	58	16
IL-5	97	114	163	103	124	195	148	74	118	193	192	89	137	108
IL-9	74	178	37	61	67	102	196	70	64	215	81	106	61	168
IL-1RA	467	595	517	327	518	898	1102	325	617	722	547	611	935	578
IL-18	165	143	180	192	110	113	155	158	114	152	161	107	66	122
IL-21	38	546	29	NA	31	204	264	NA	NA	NA	26	200	928	NA

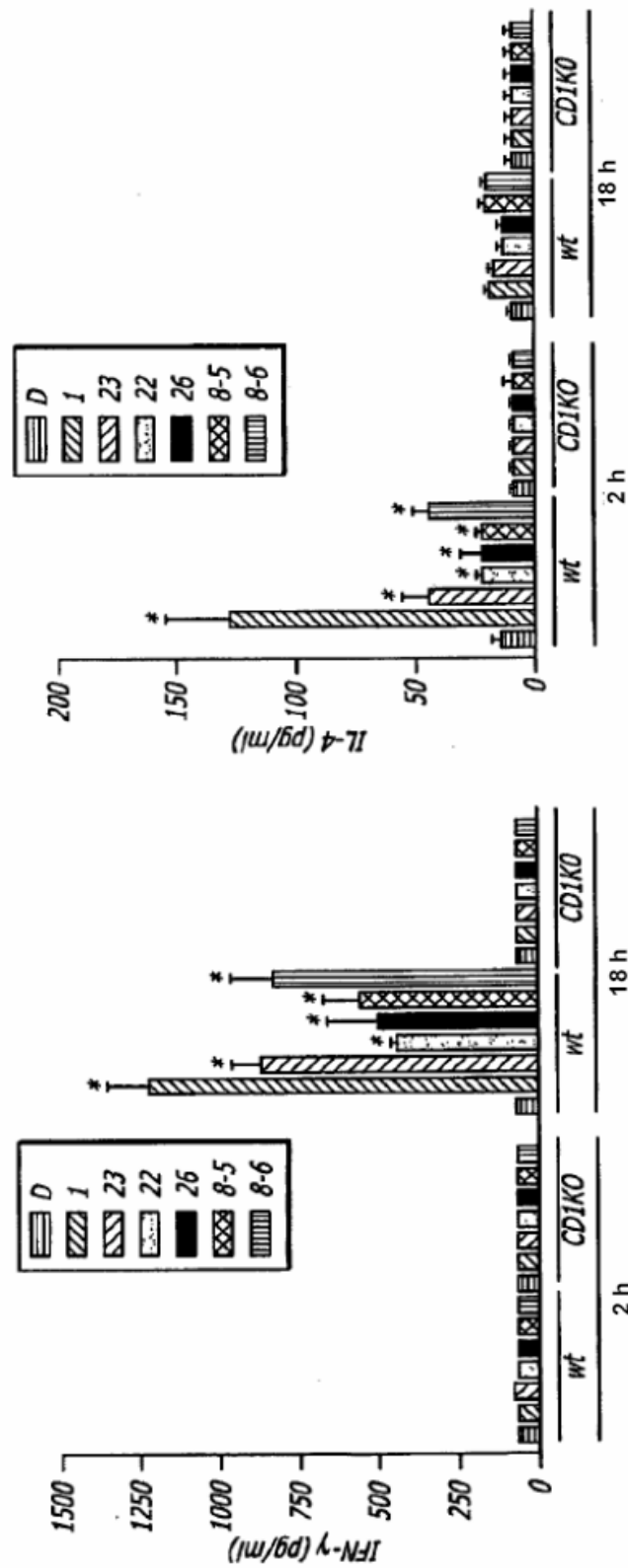


FIG. 35B

FIG. 35A

FIG. 35C

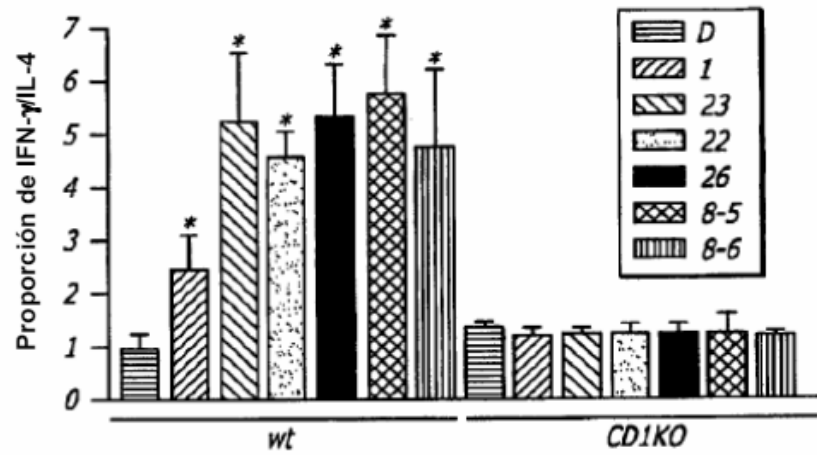


FIG. 35D

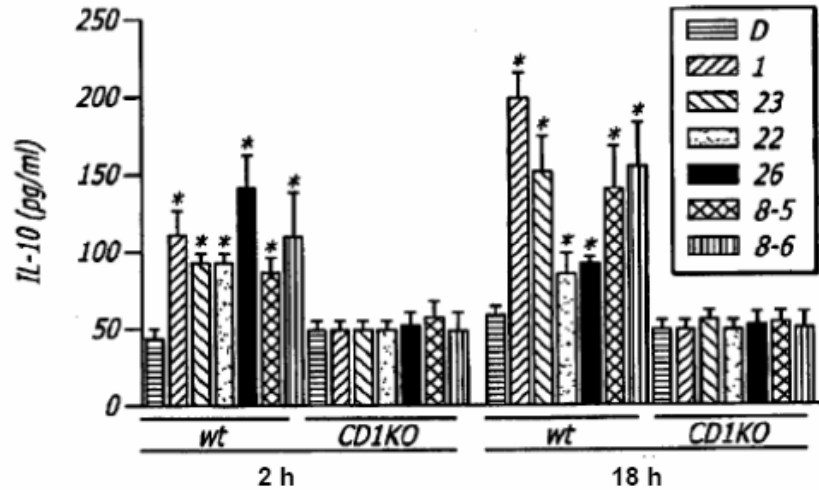


FIG. 35E

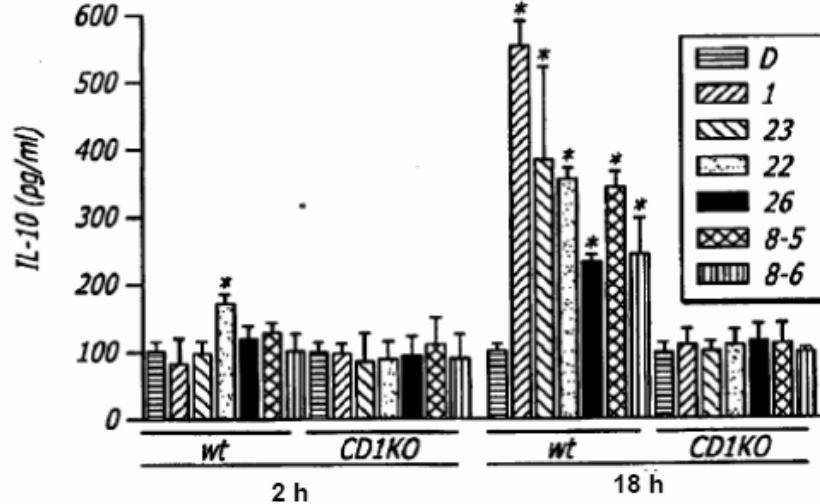


FIG. 35F

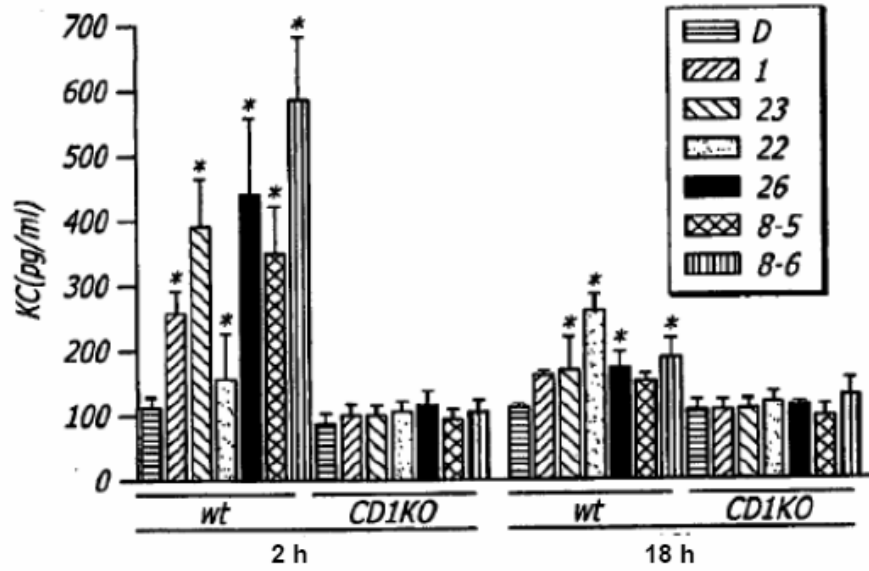
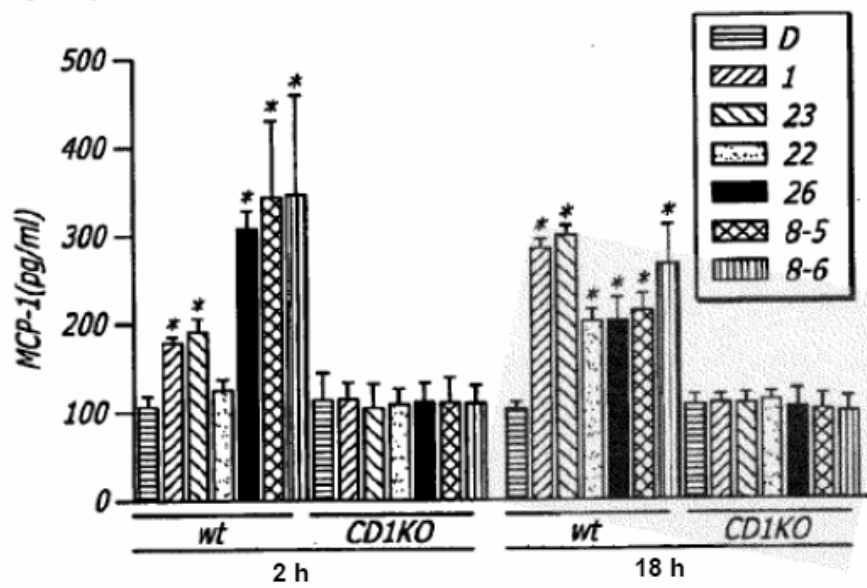


FIG. 35G



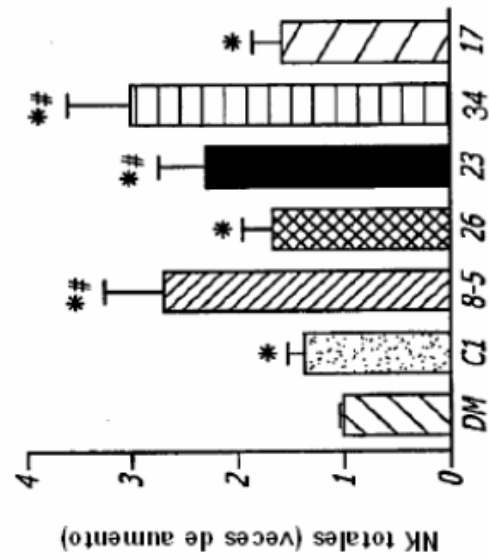


FIG. 36C

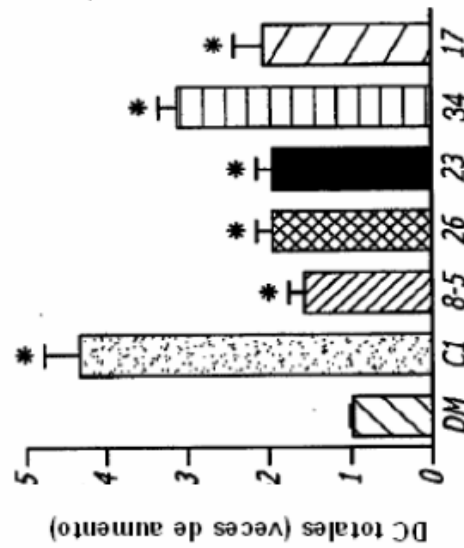


FIG. 36B

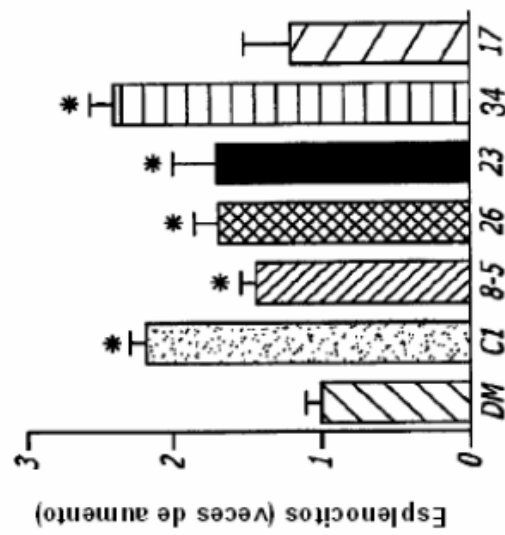


FIG. 36A

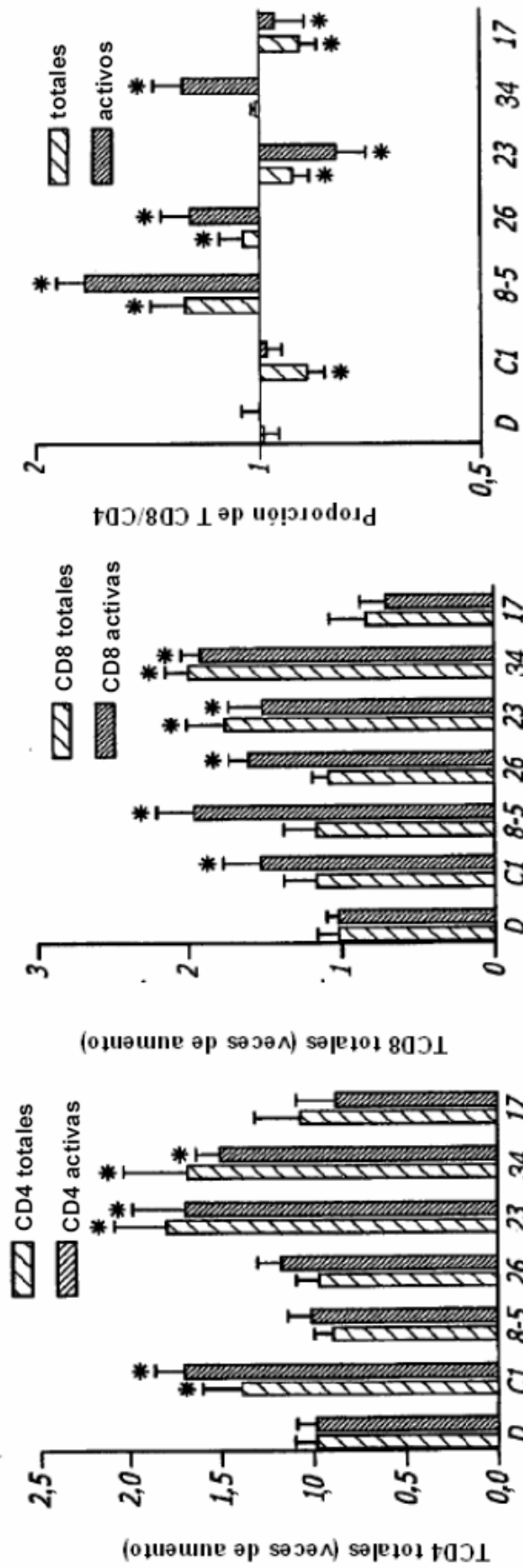


FIG. 36D

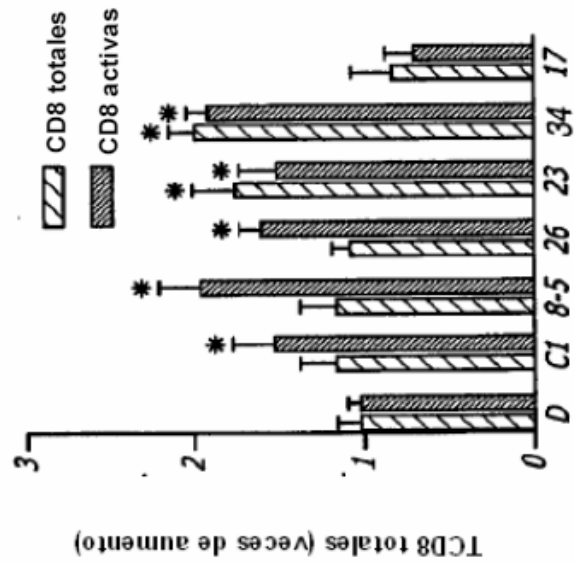


FIG. 36E

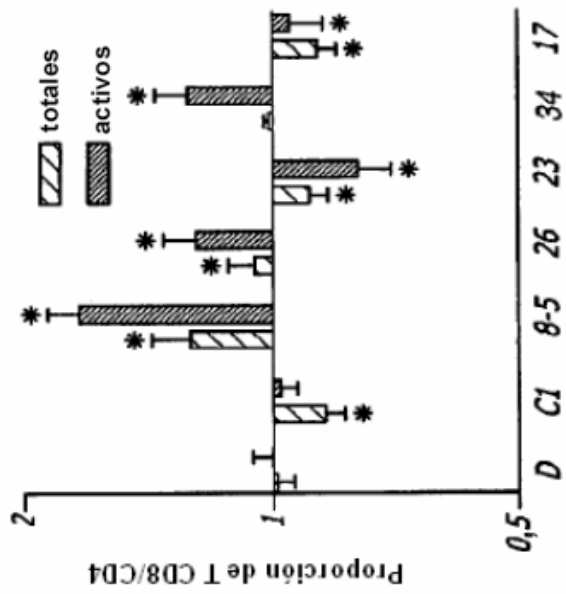
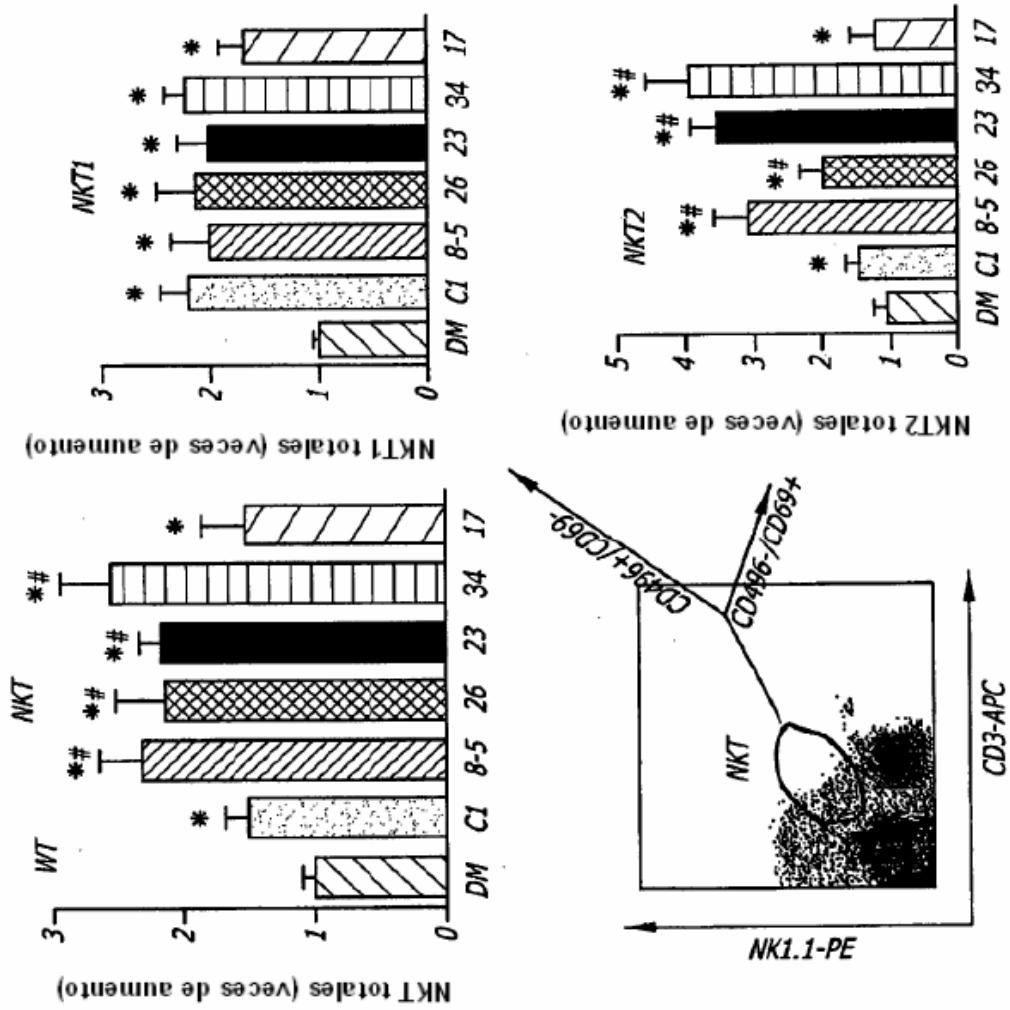


FIG. 36F

FIG. 36G



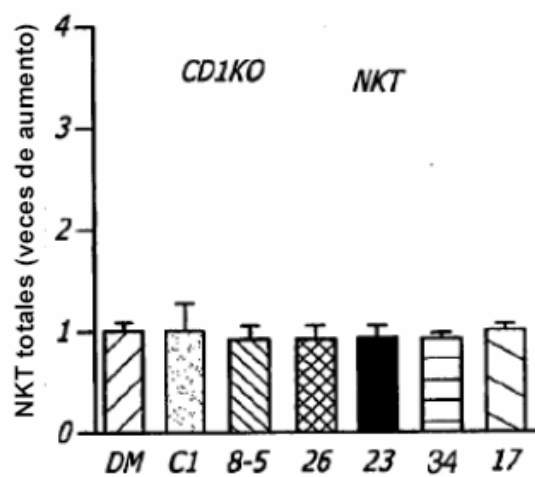


FIG. 36H

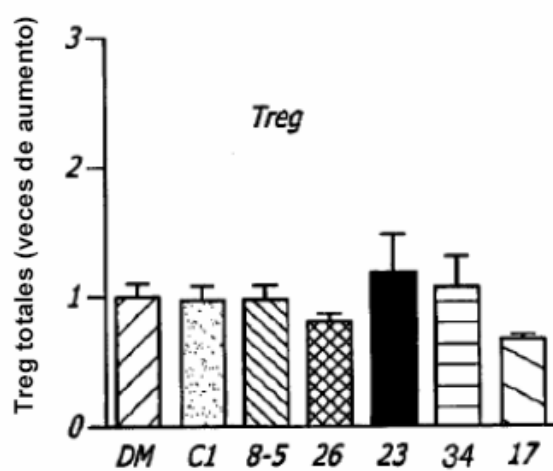


FIG. 36I

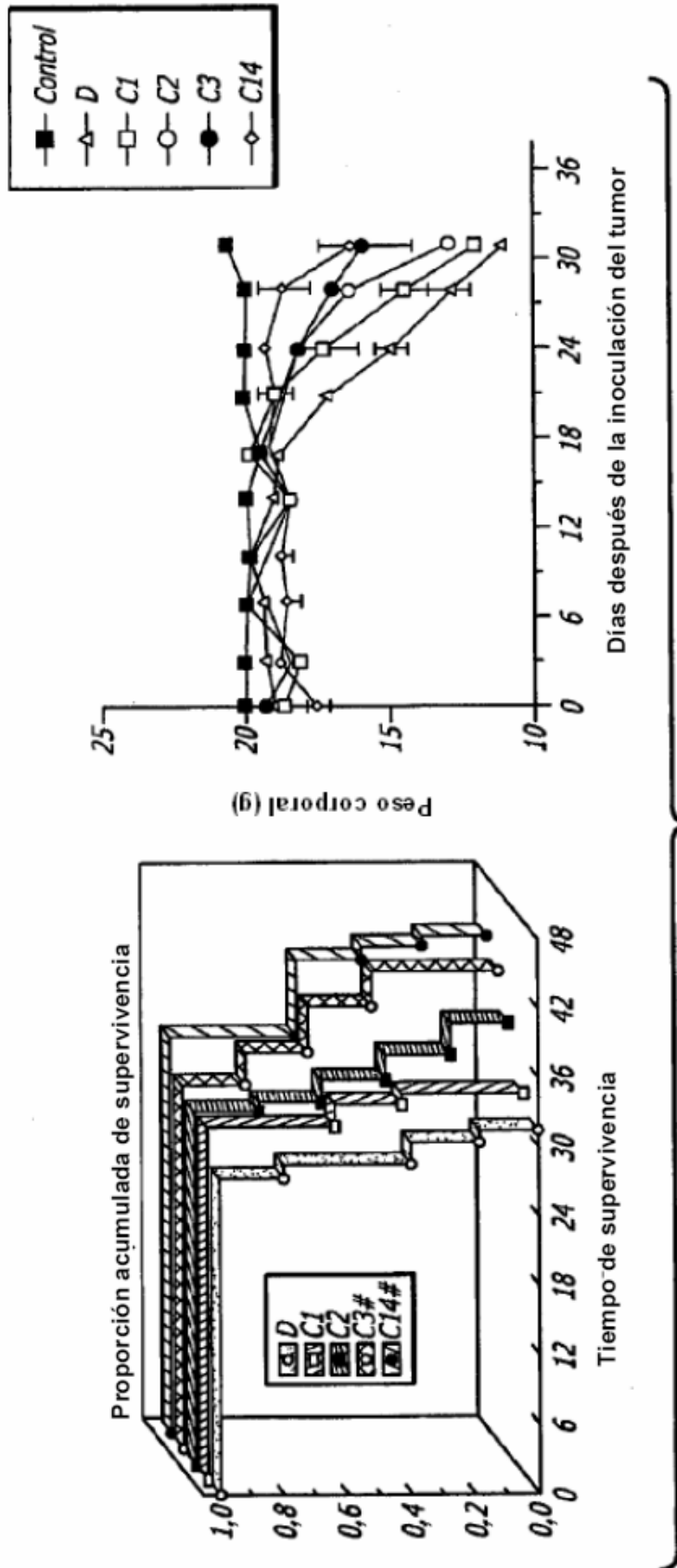


FIG. 37A

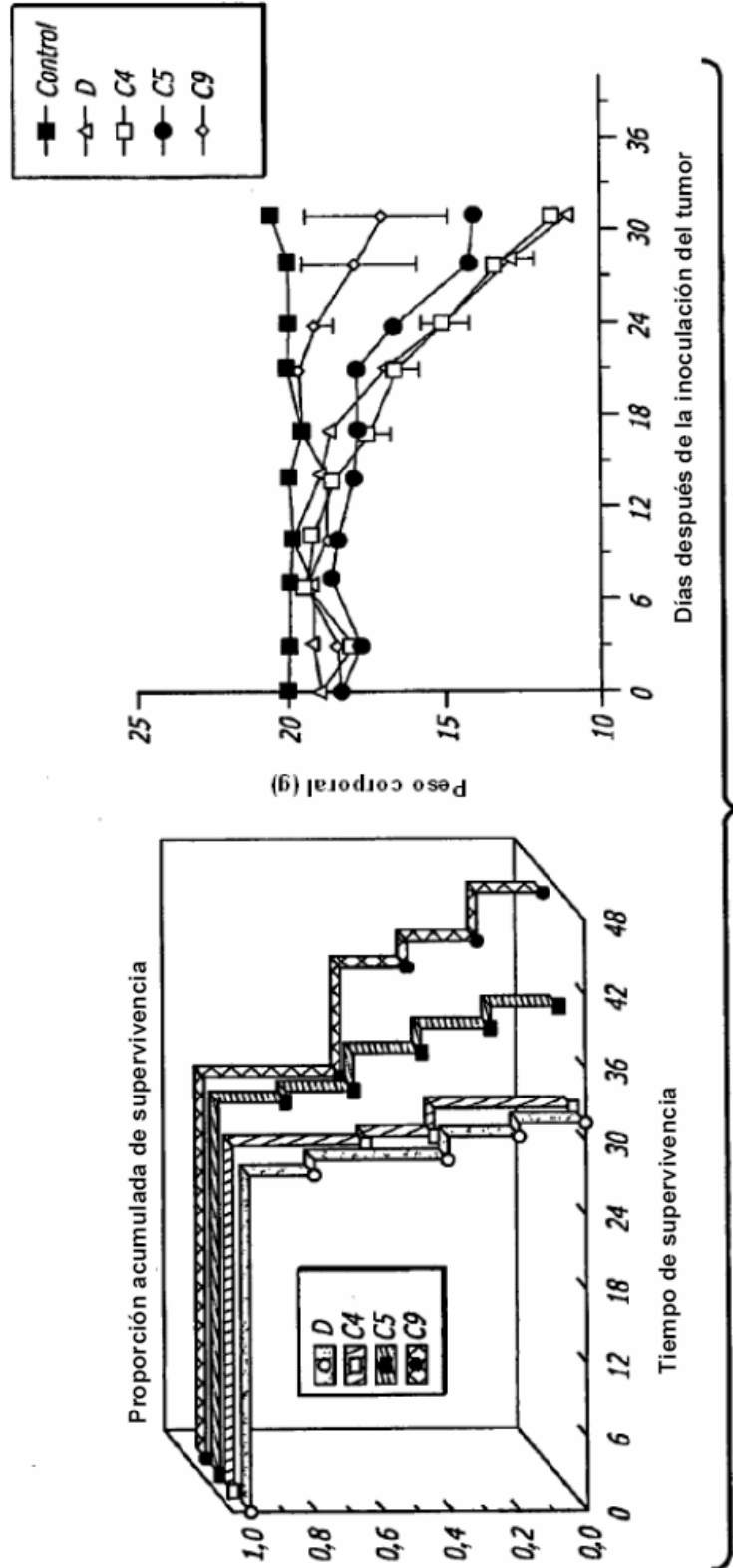


FIG. 37B

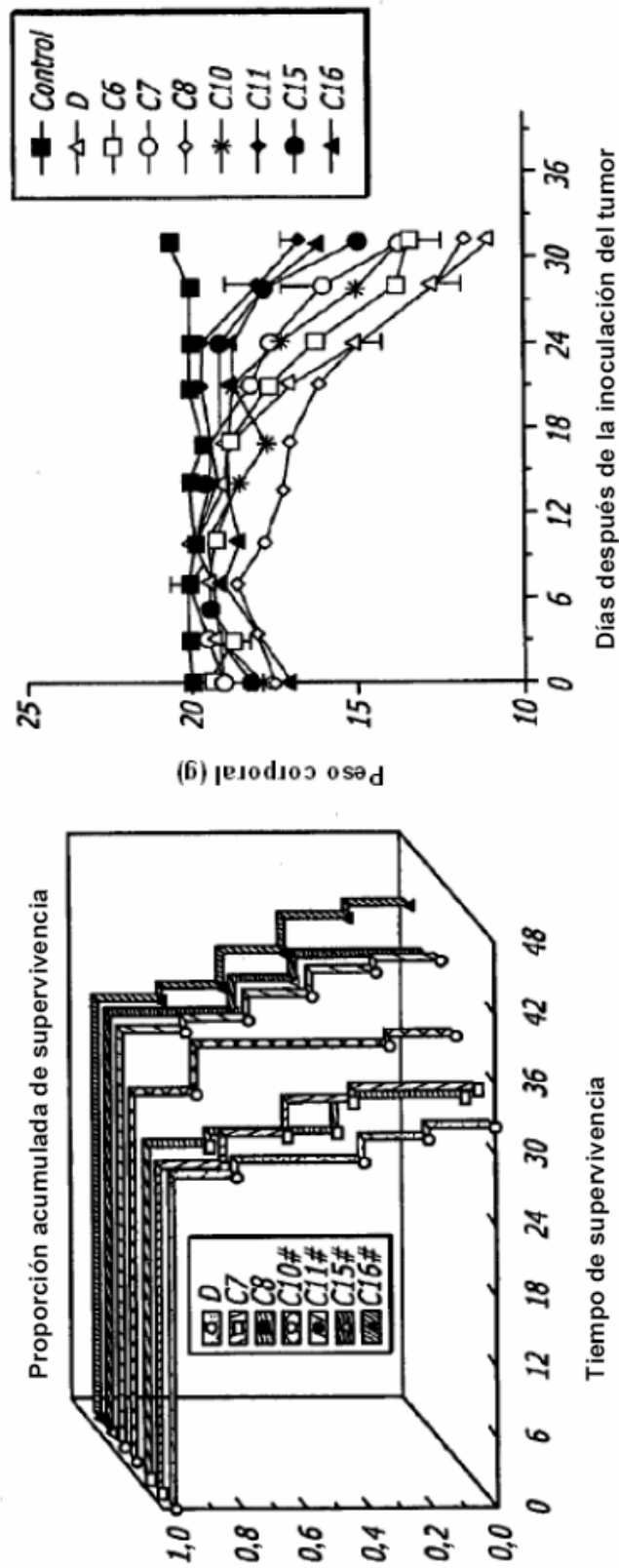


FIG. 37C

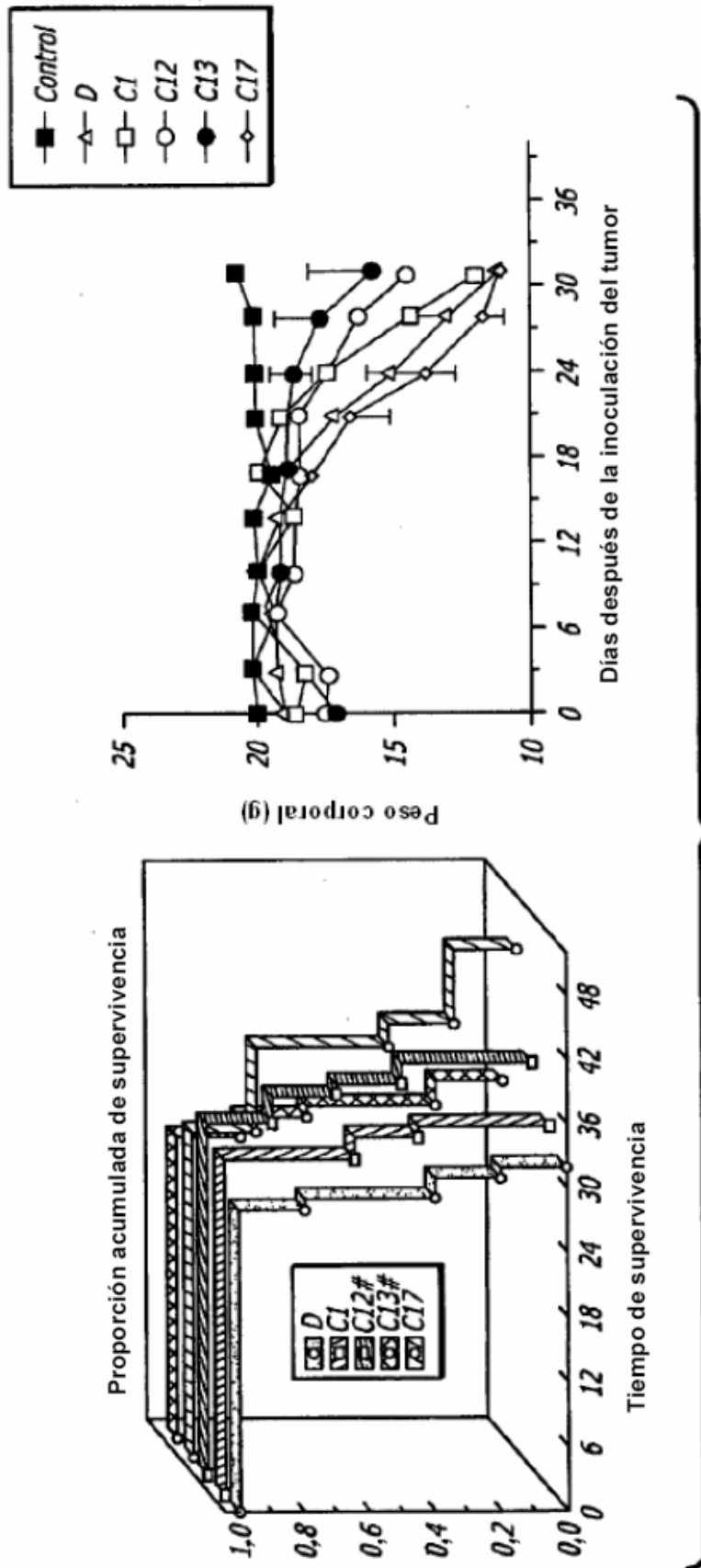


FIG. 37D

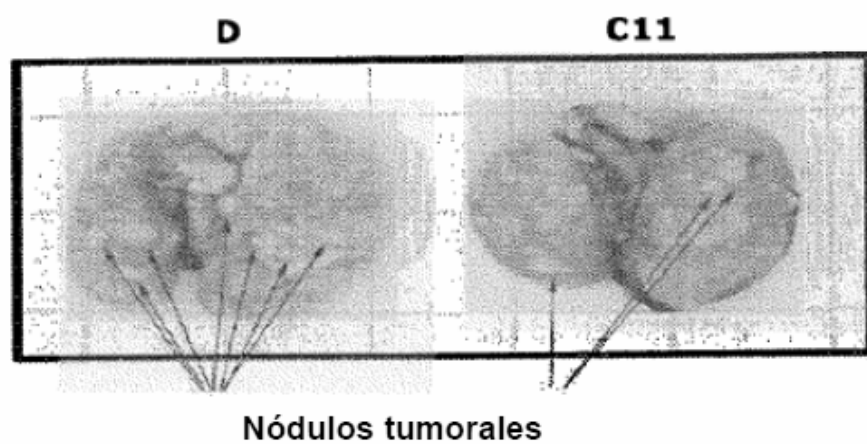


FIG. 38A

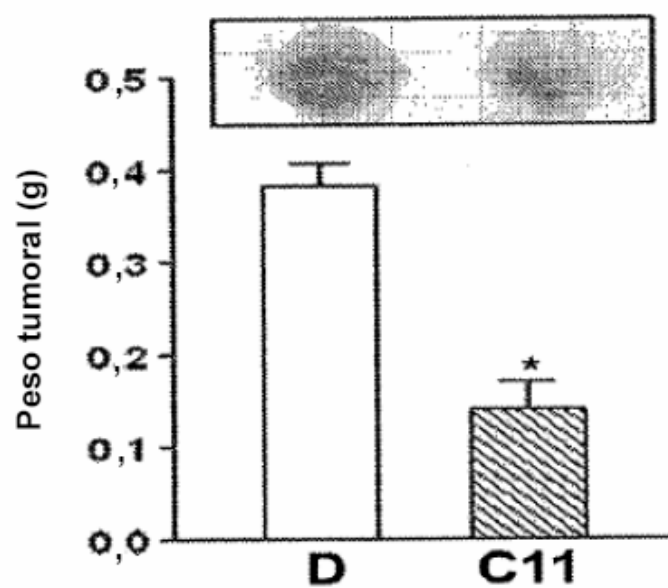
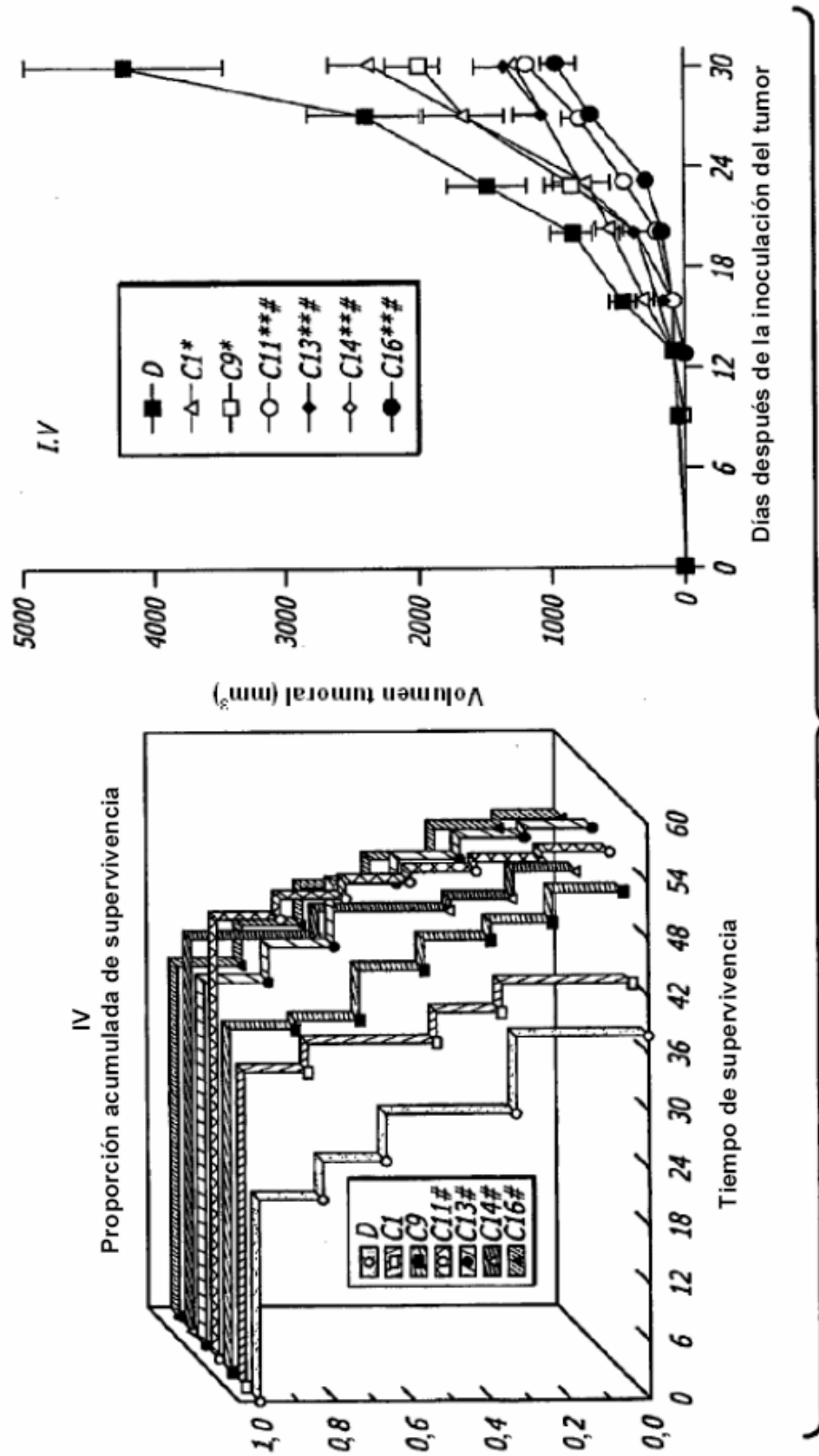


FIG. 38B



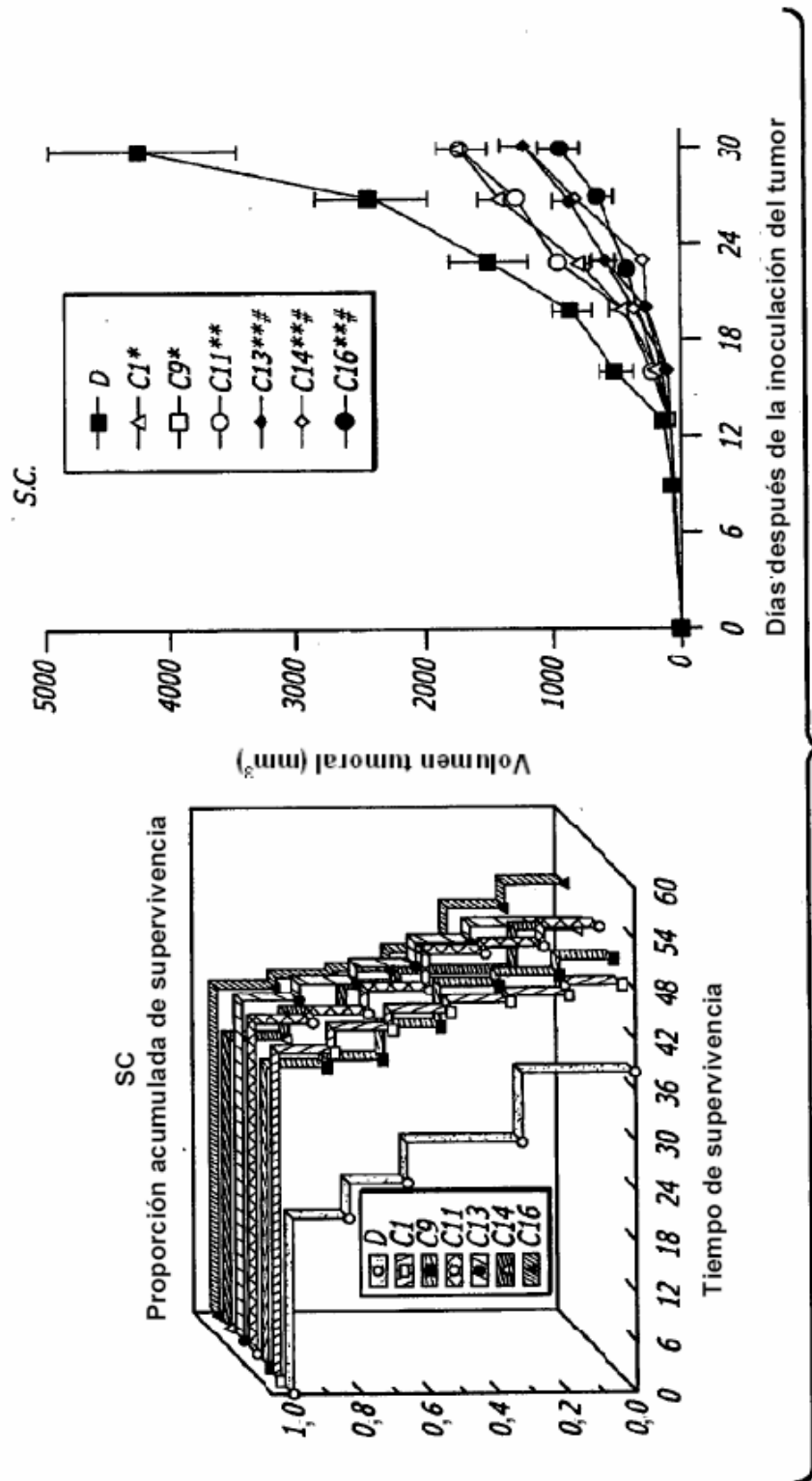
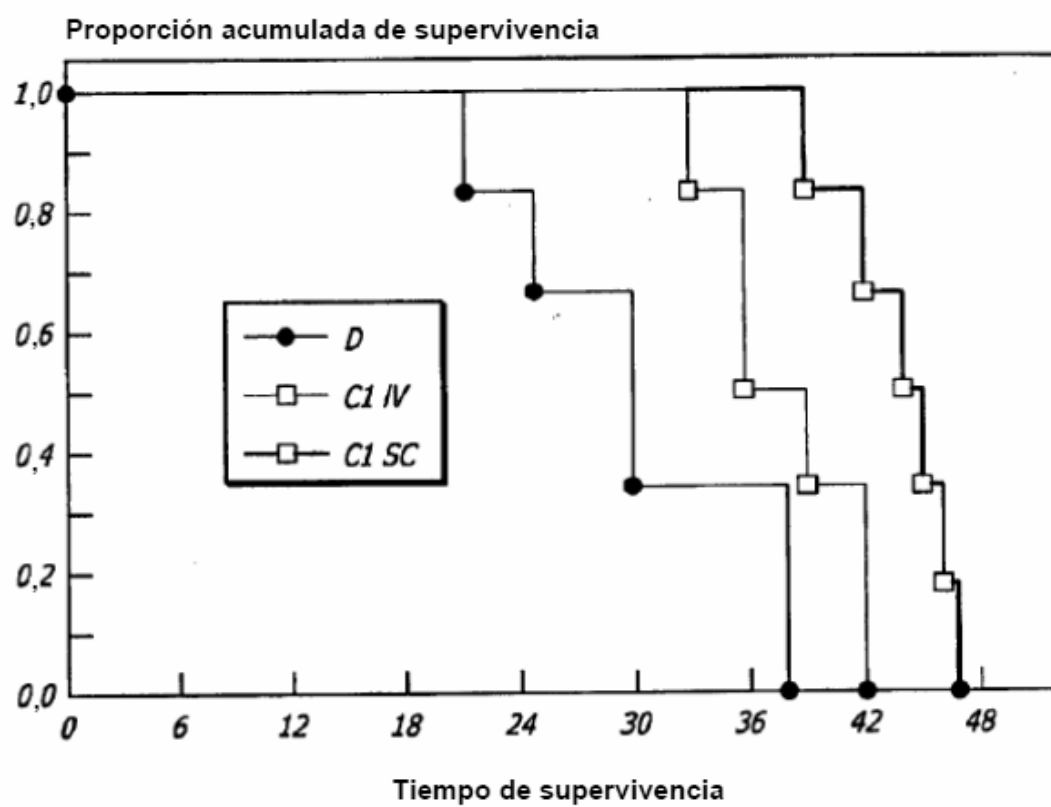


FIG. 39B

*FIG. 40*

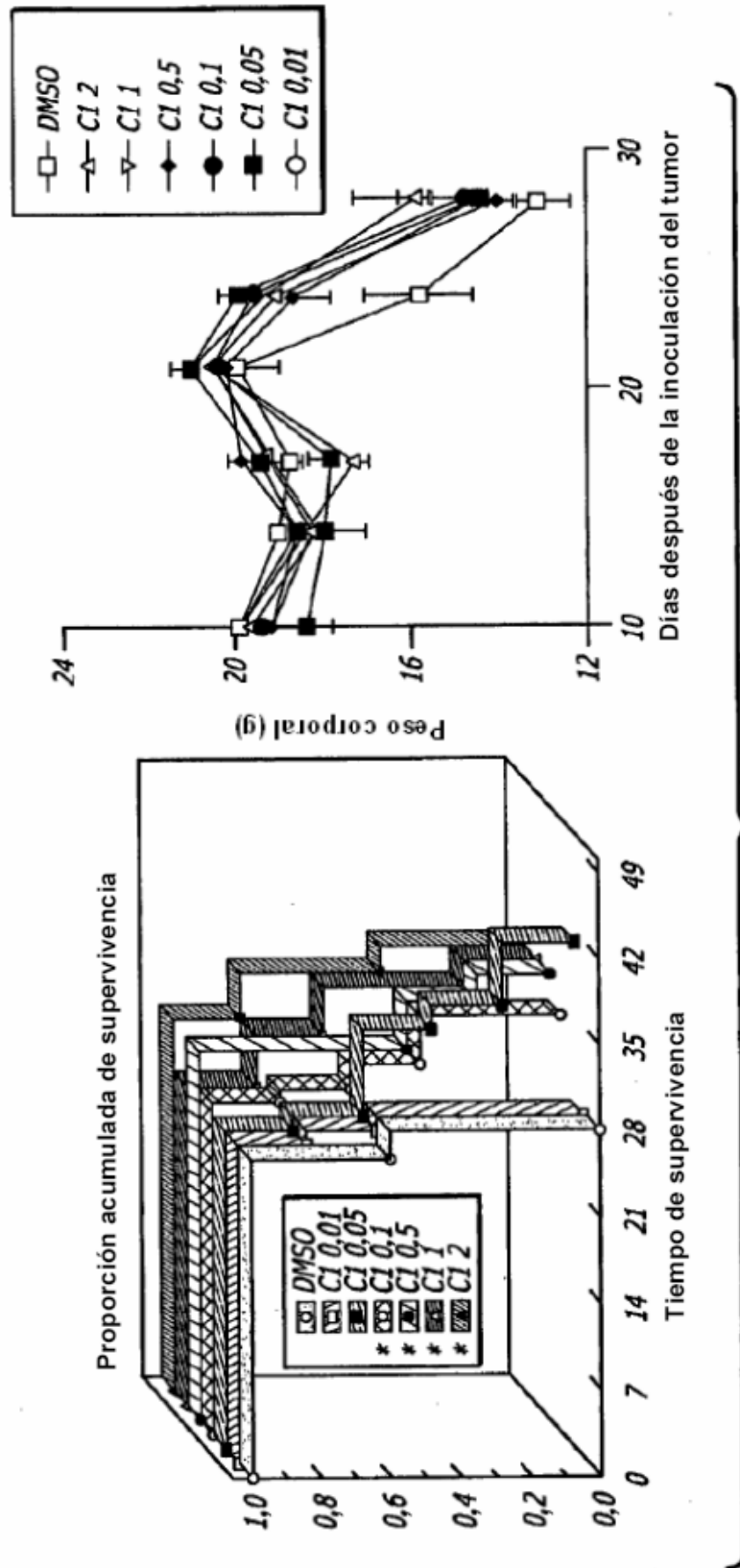


FIG. 41A

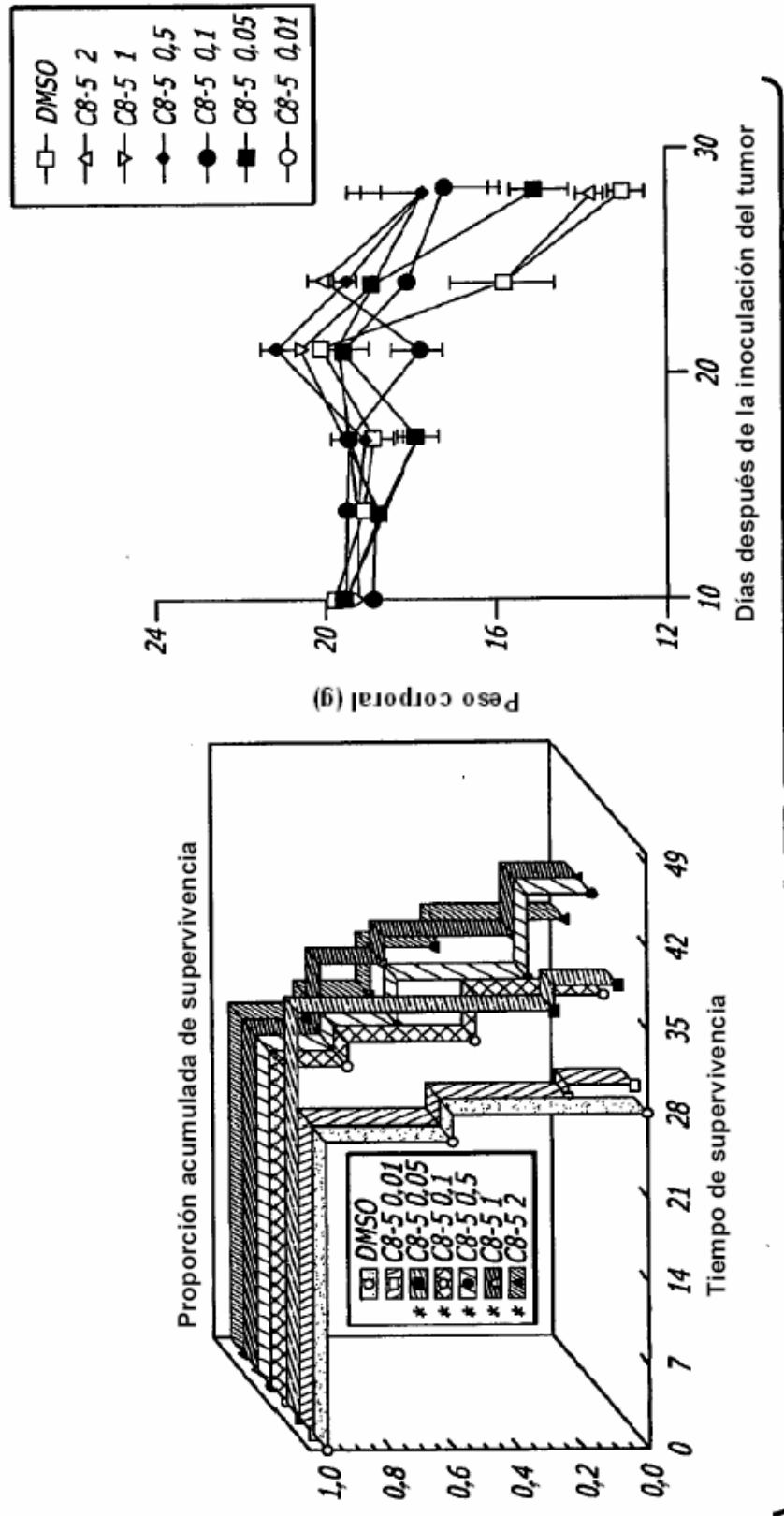


FIG. 41B

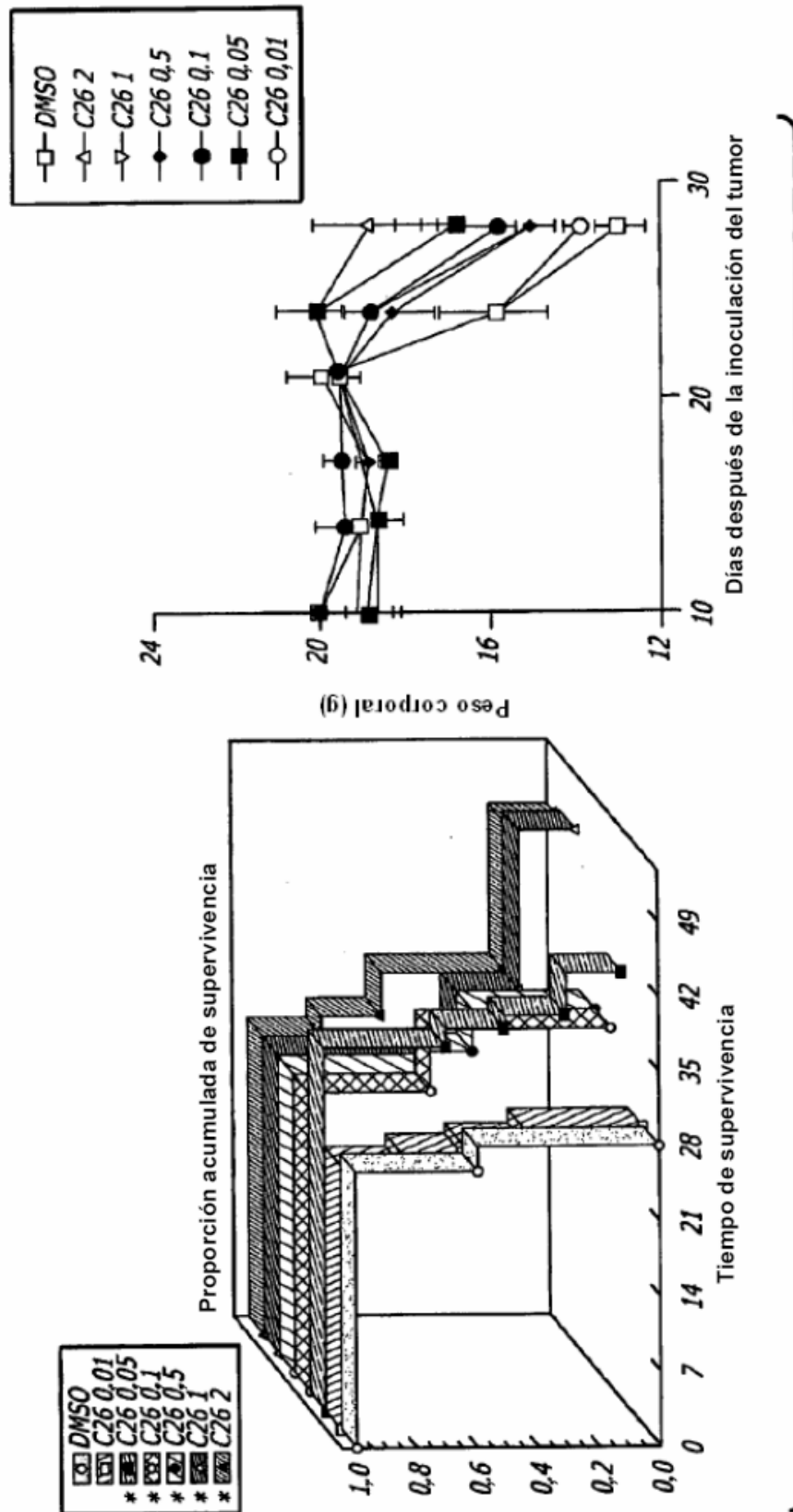


FIG. 41C

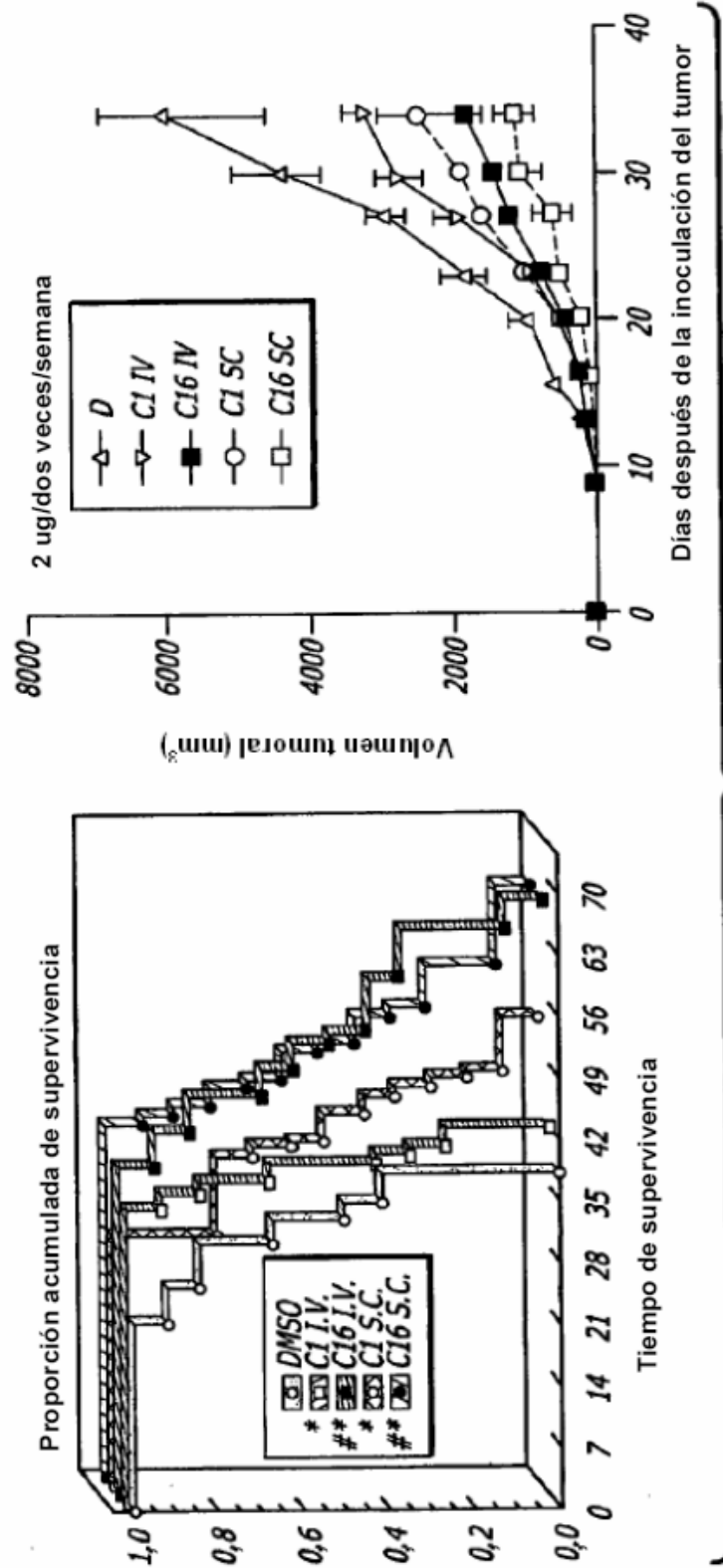


FIG. 42A

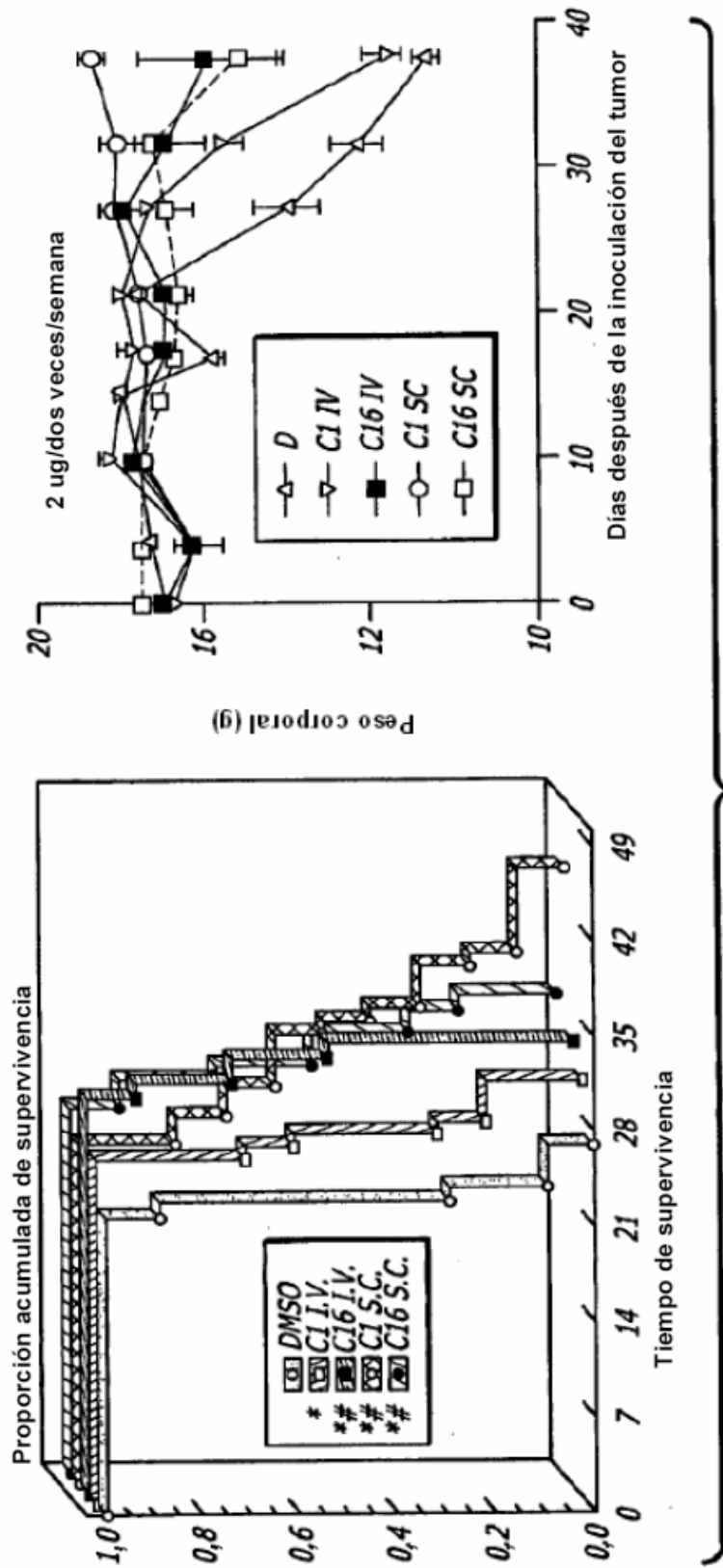


FIG. 42B

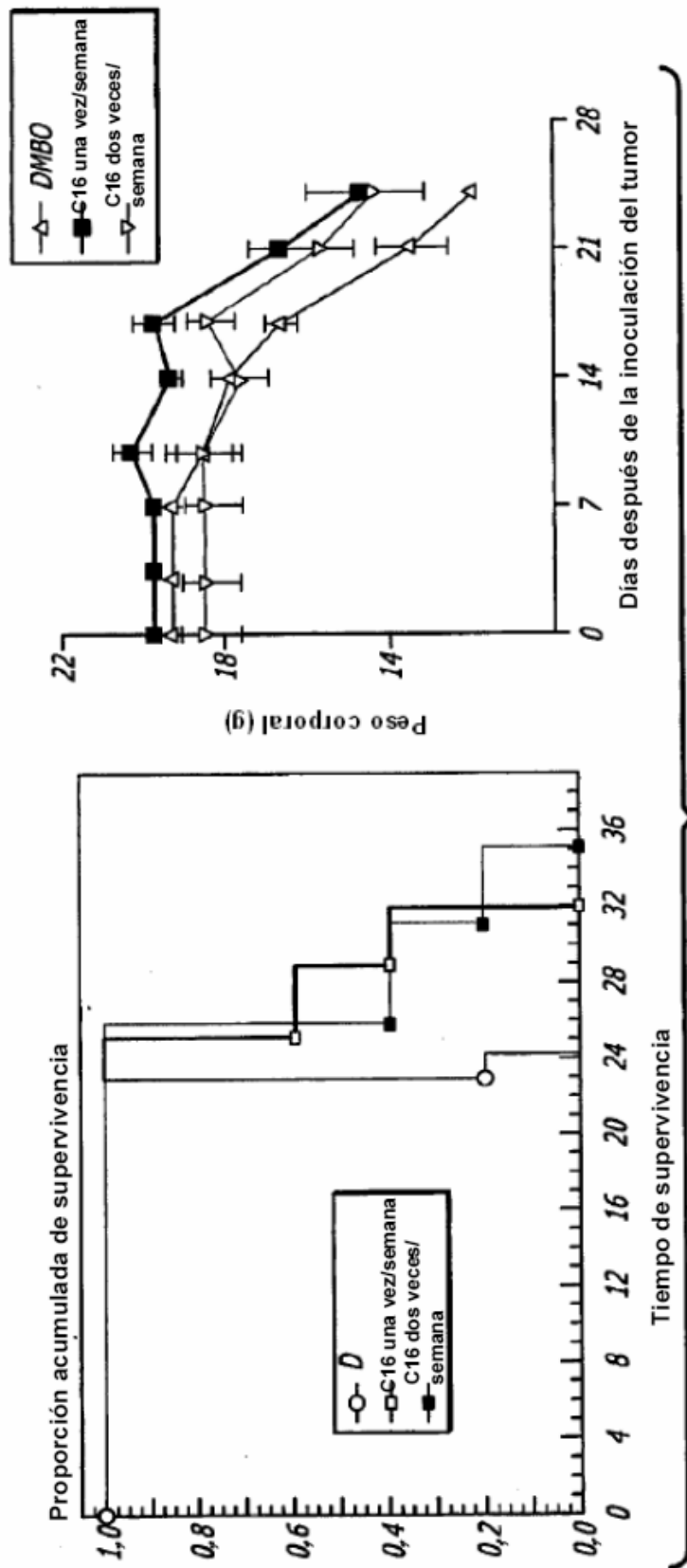


FIG. 42C

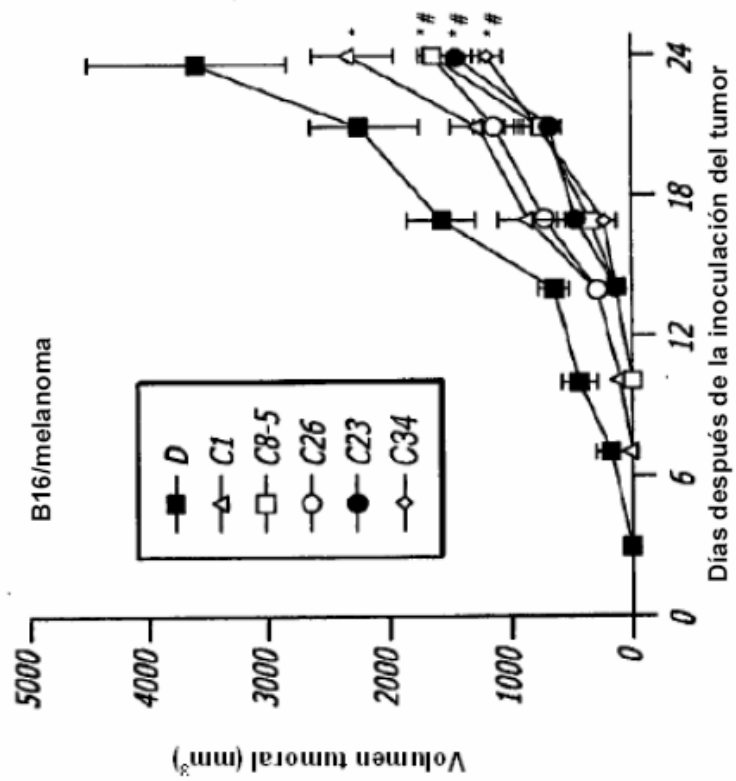


FIG. 43B

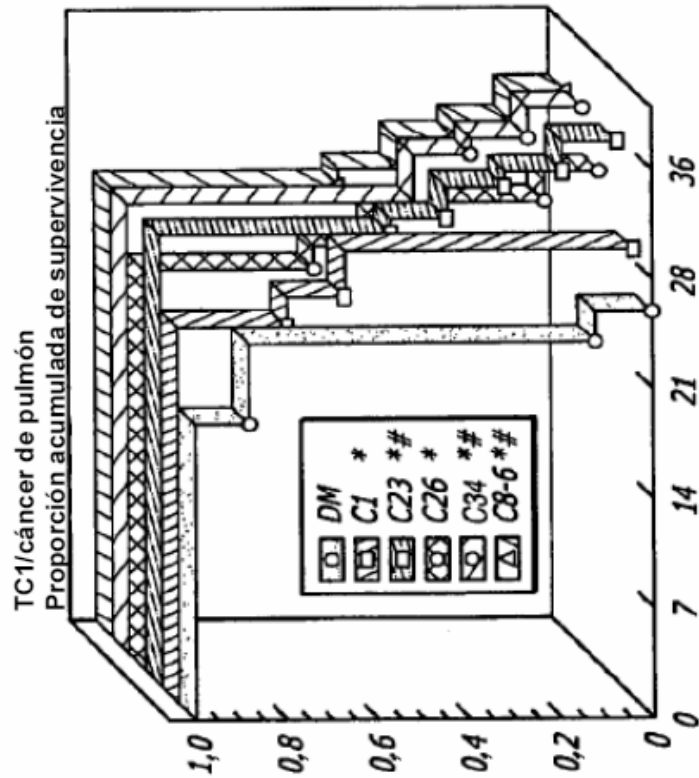
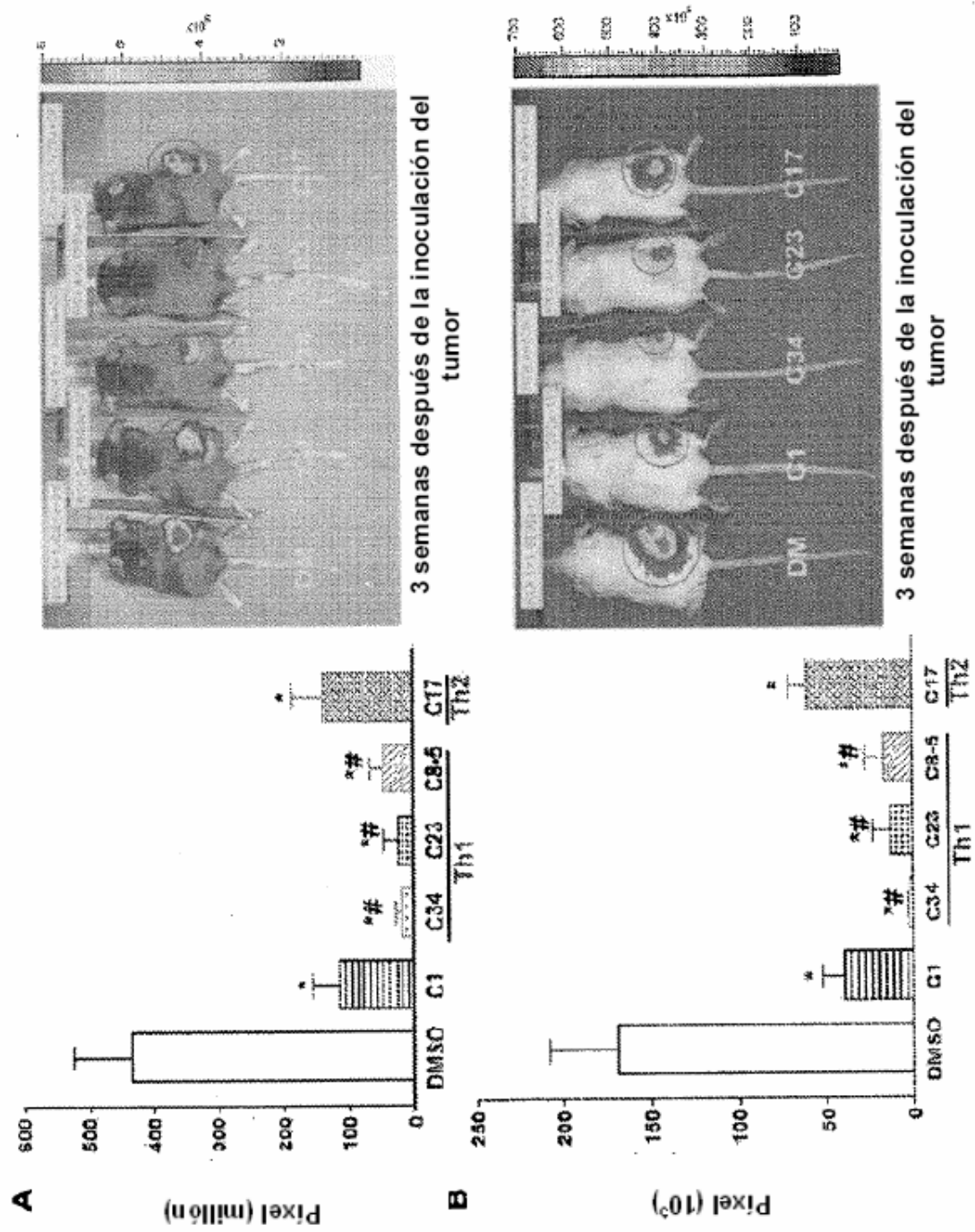


FIG. 43A



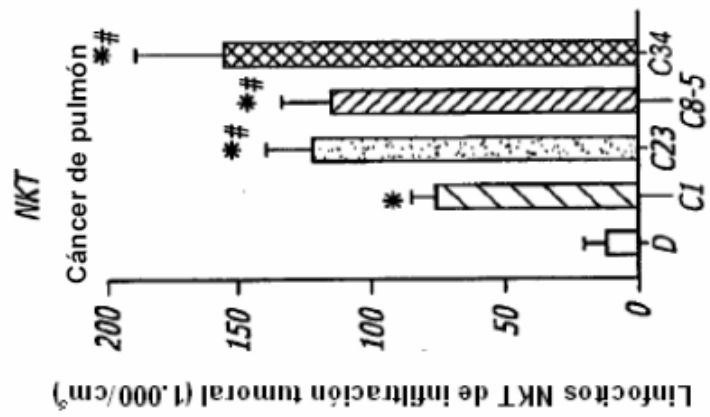


FIG. 45D

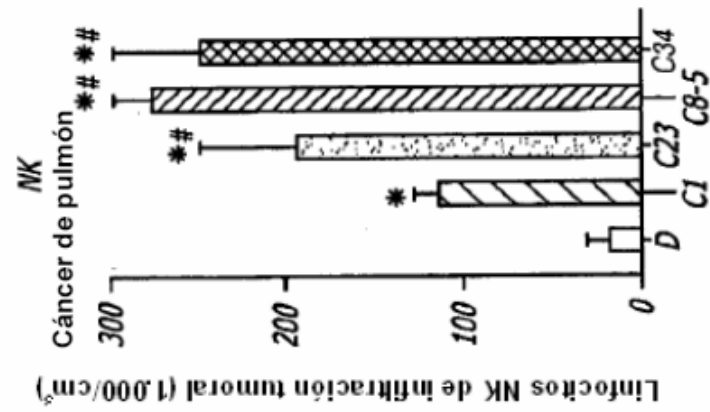


FIG. 45C

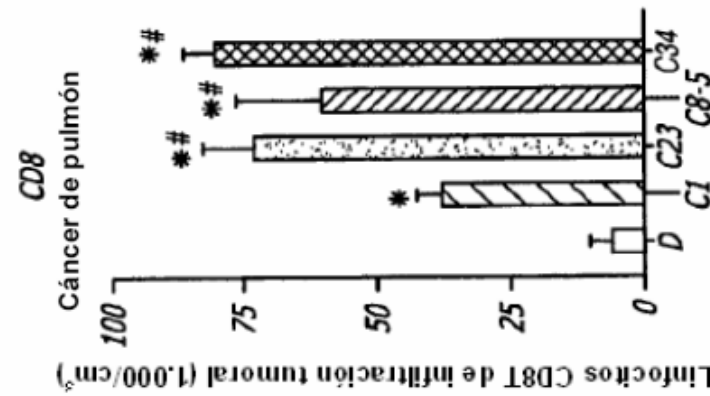


FIG. 45B

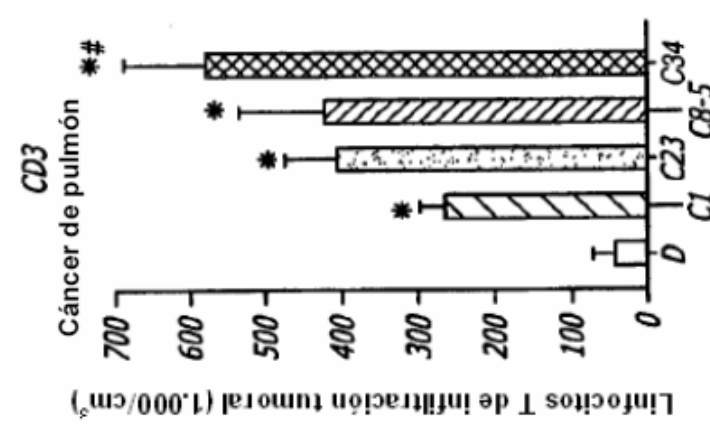


FIG. 45A

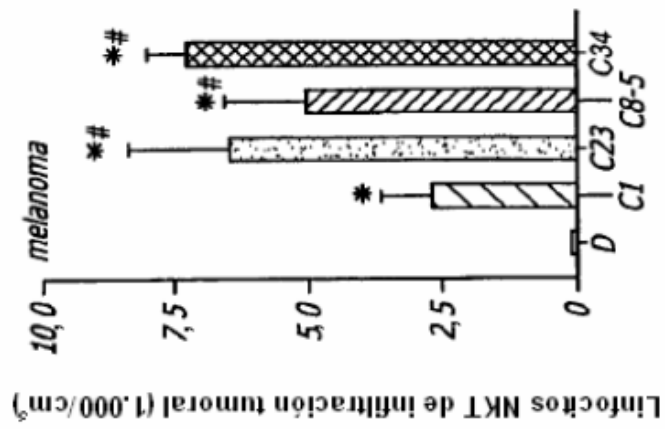


FIG. 45H

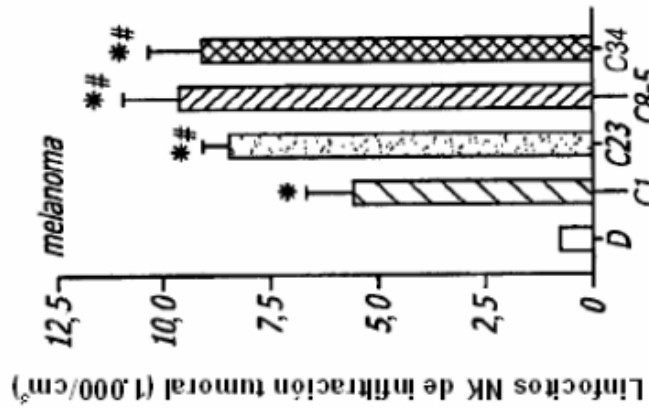


FIG. 45G

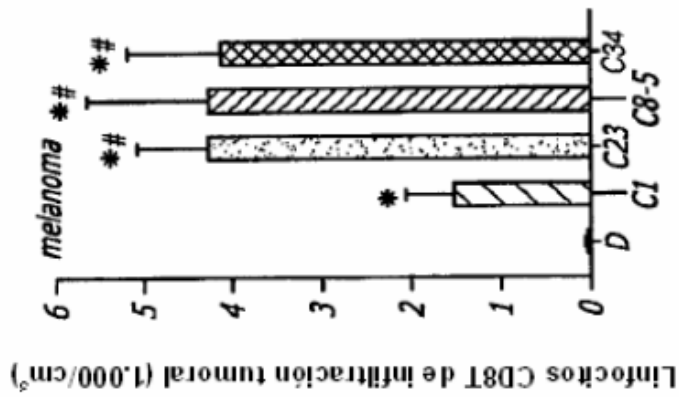


FIG. 45F

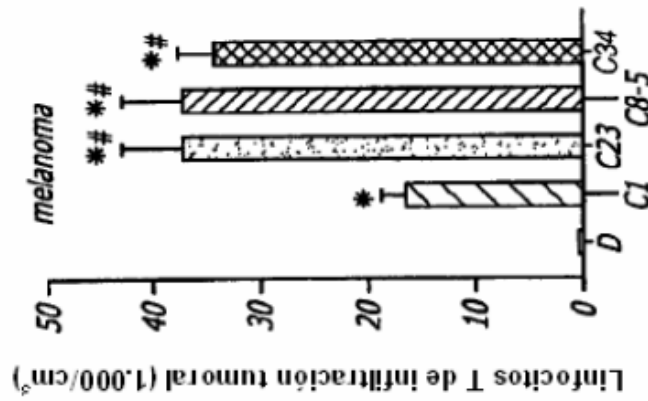


FIG. 45E

FIG. 46A

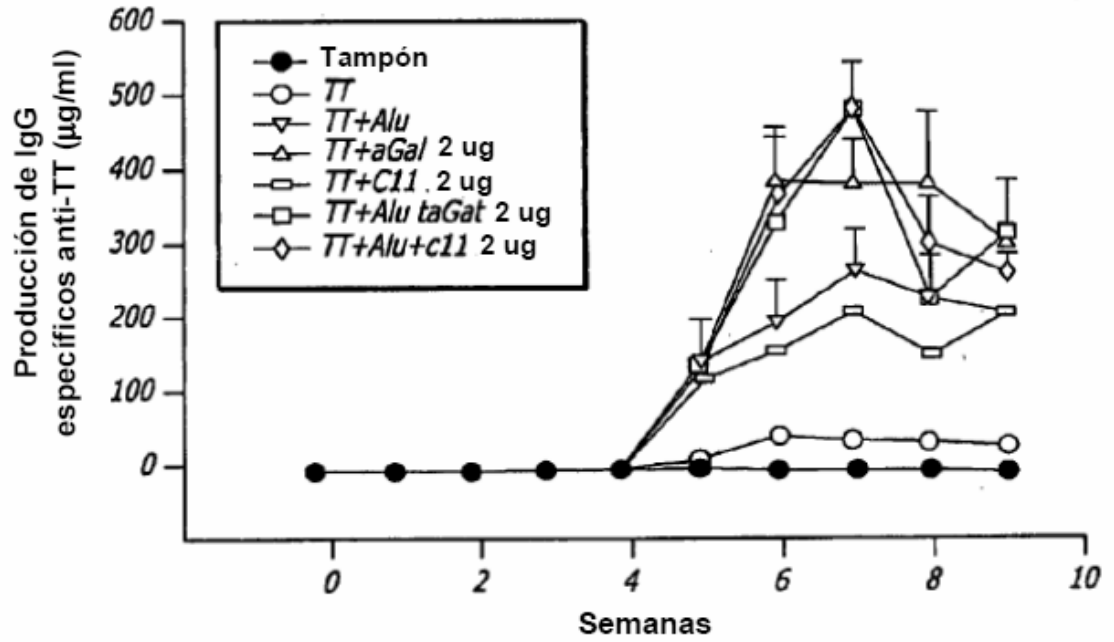
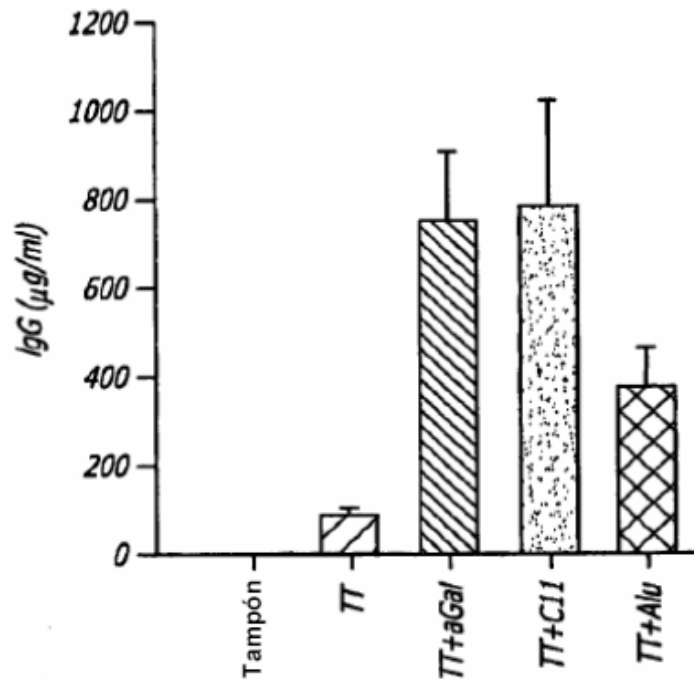


FIG. 46B



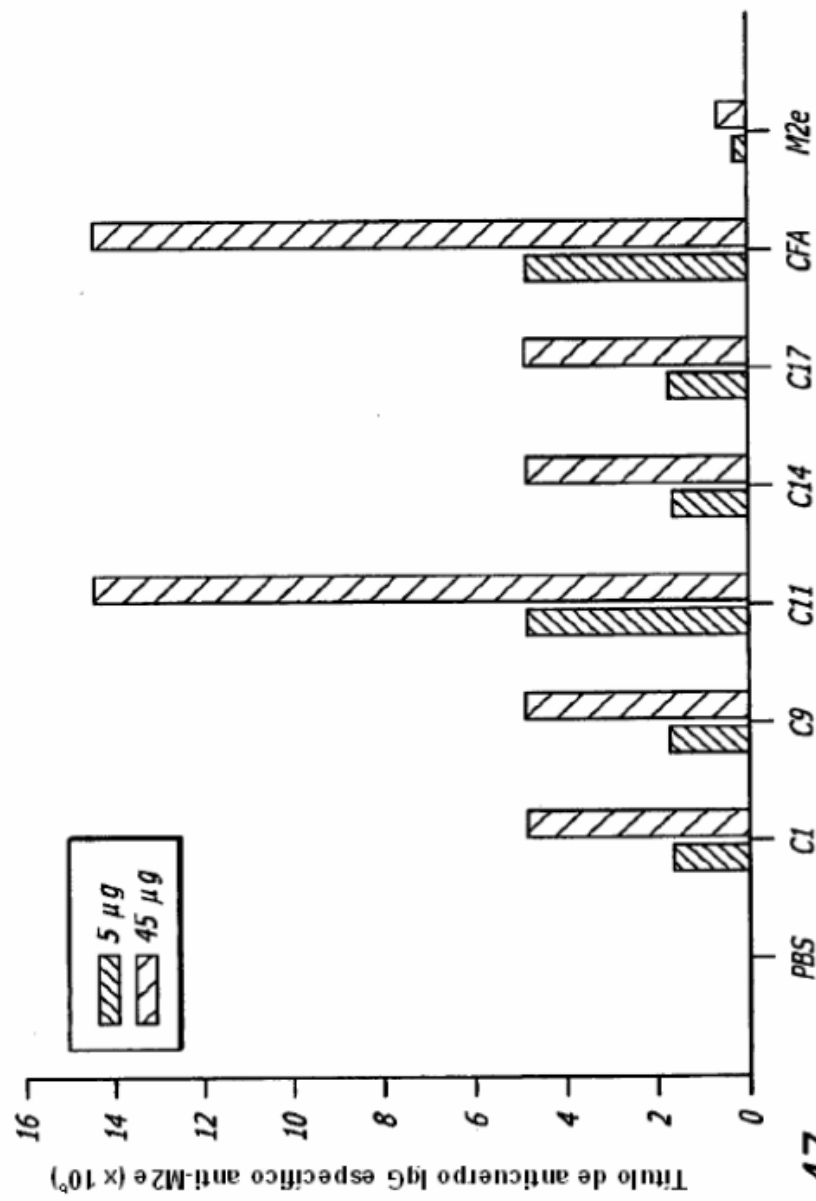


FIG. 47

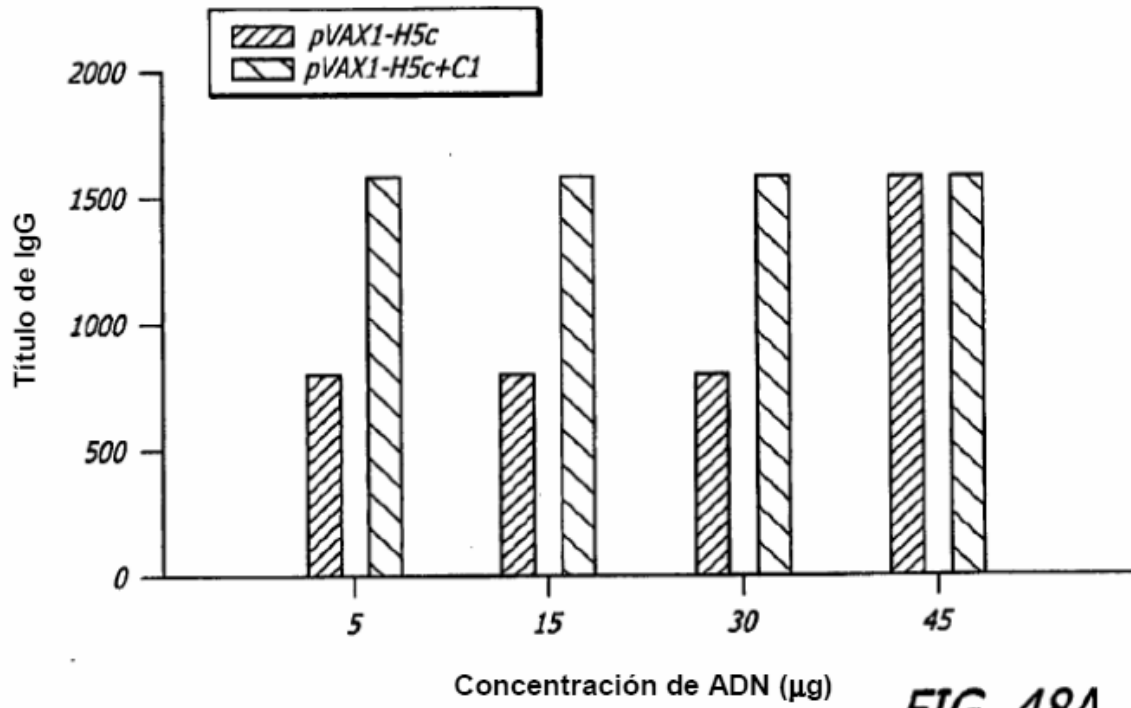


FIG. 48A

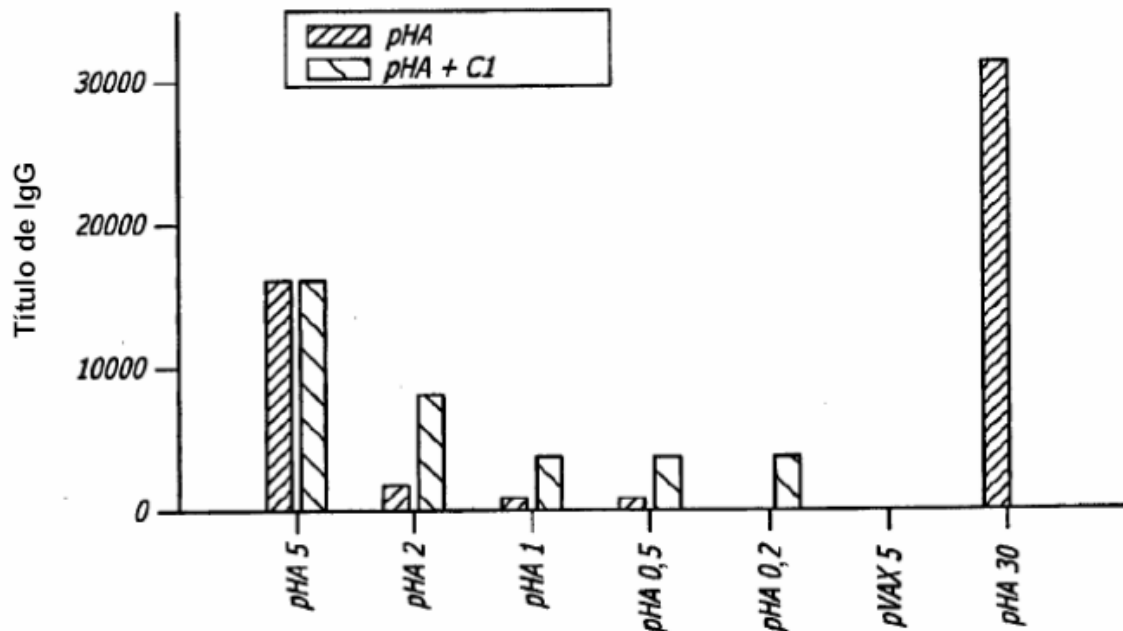


FIG. 48B

FIG. 48C

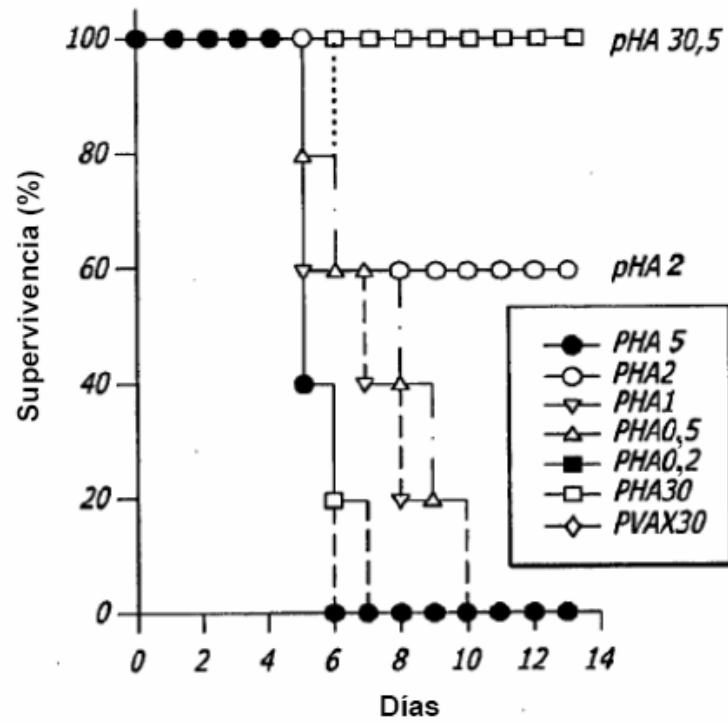
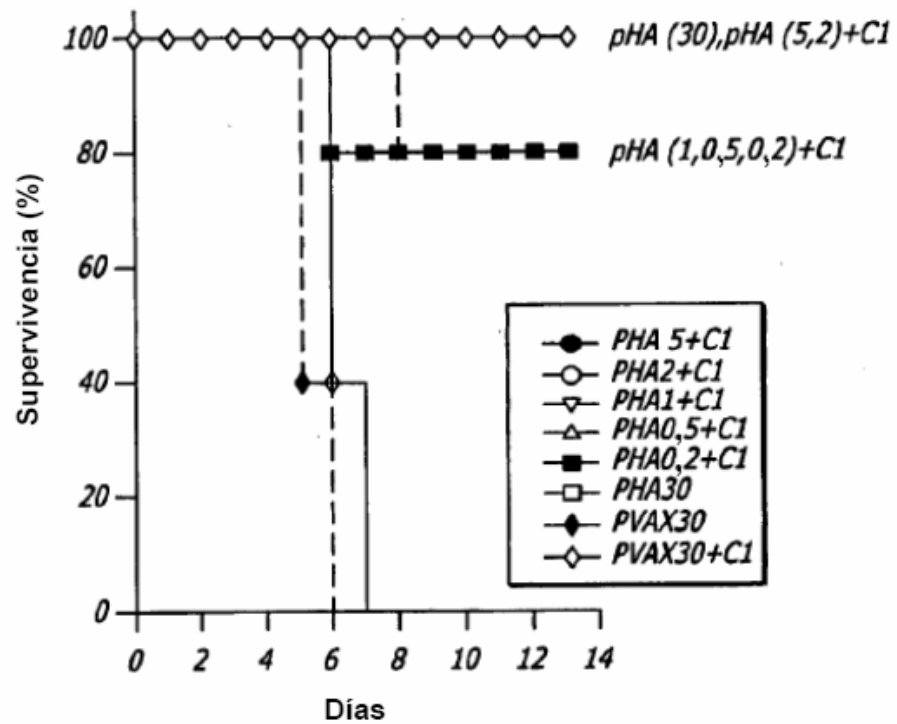


FIG. 48D



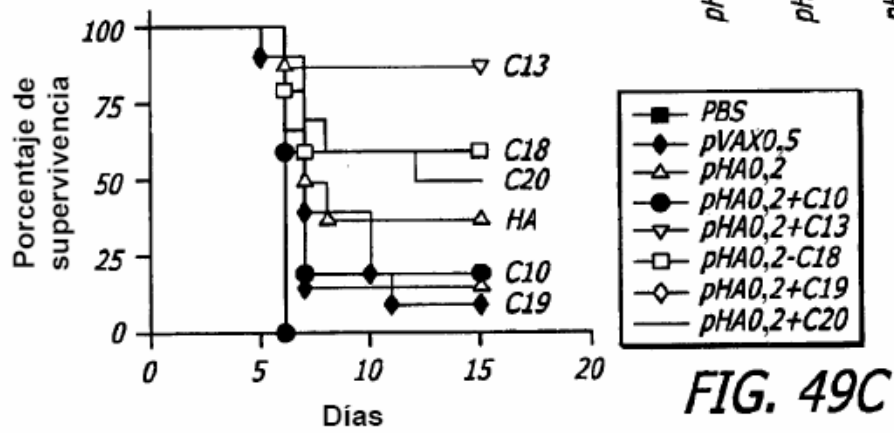
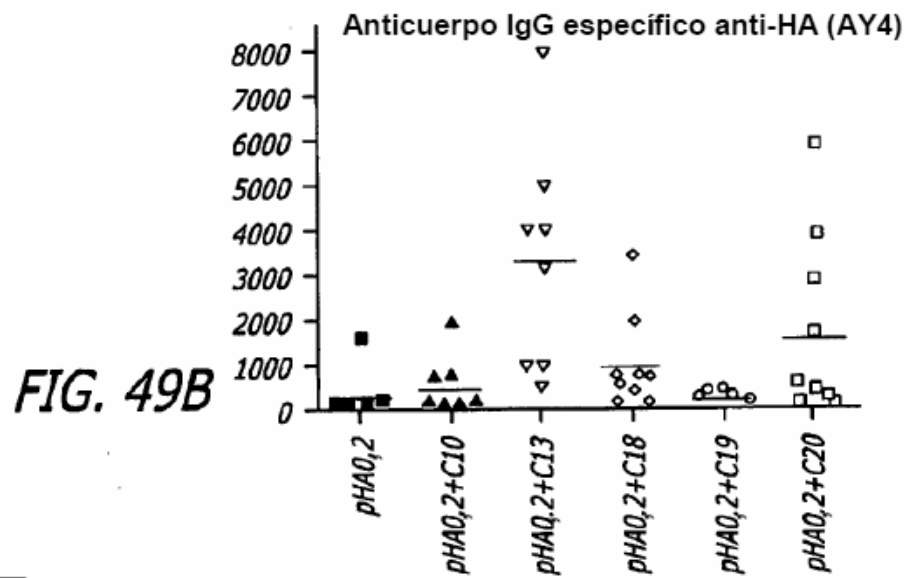
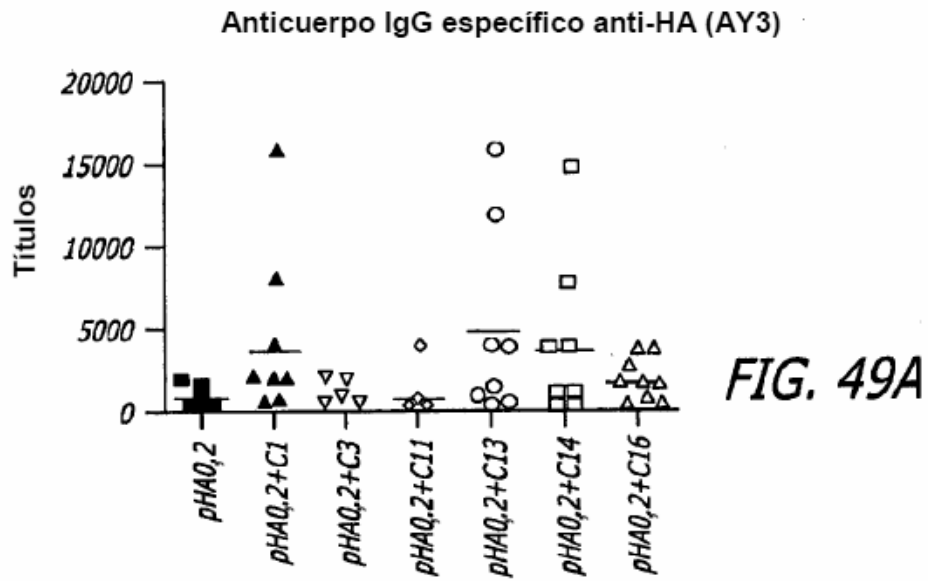


FIG. 50A

Anticuerpo IgG específico anti-HA (AY4)

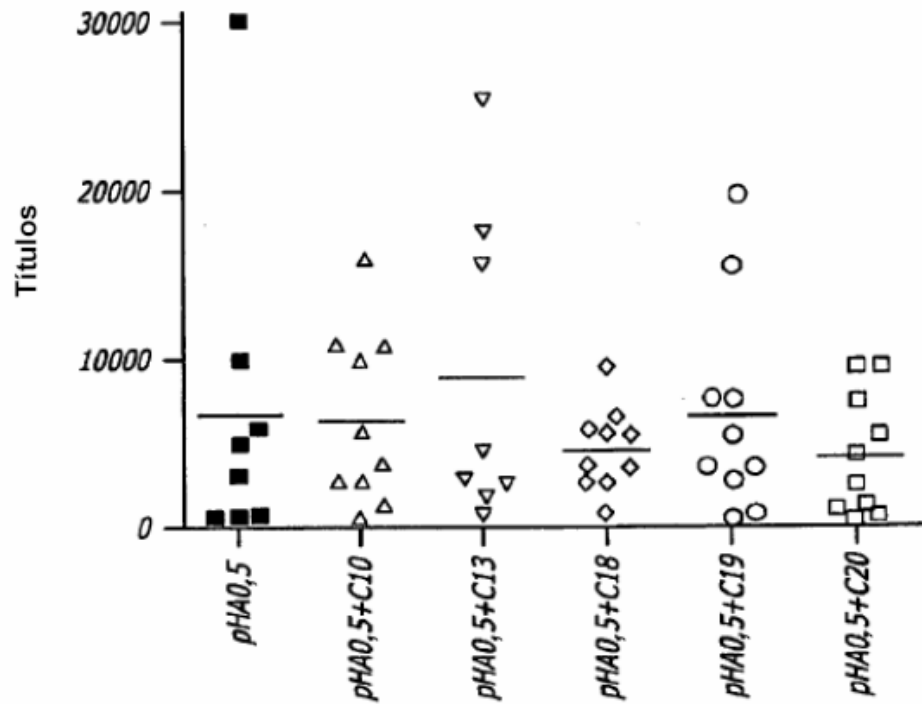


FIG. 50B

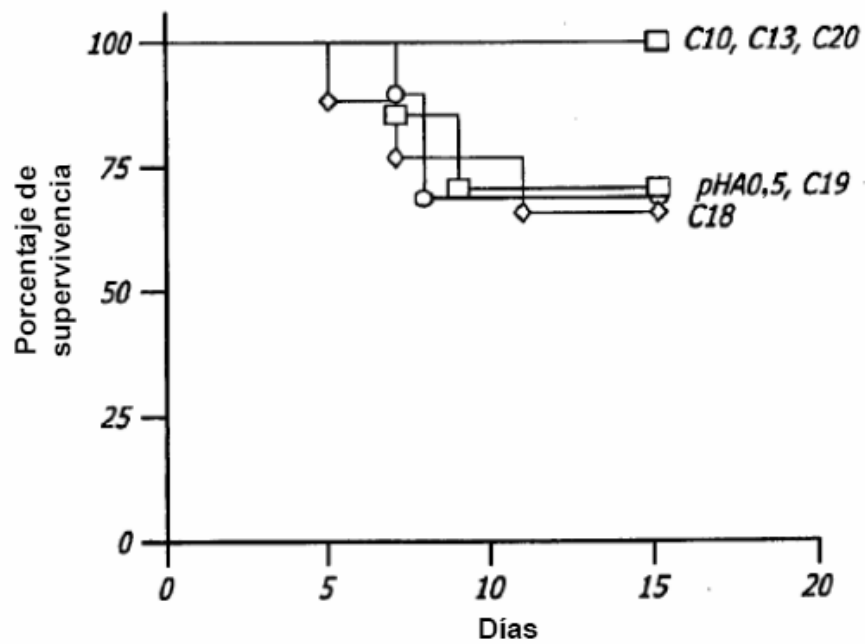


FIG. 51A

Anticuerpo IgG específico anti-HA (AY5)

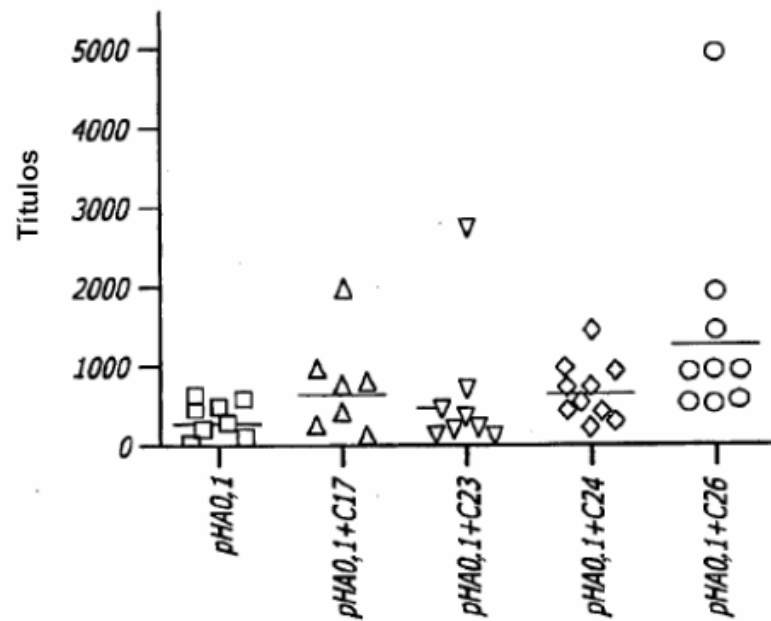


FIG. 51B

Anticuerpo IgG específico anti-HA (AY5)

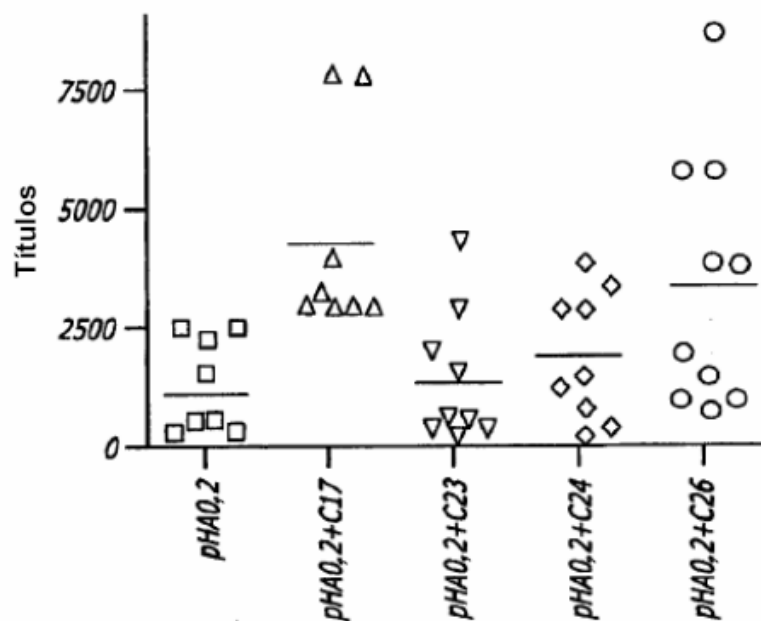


FIG. 52A

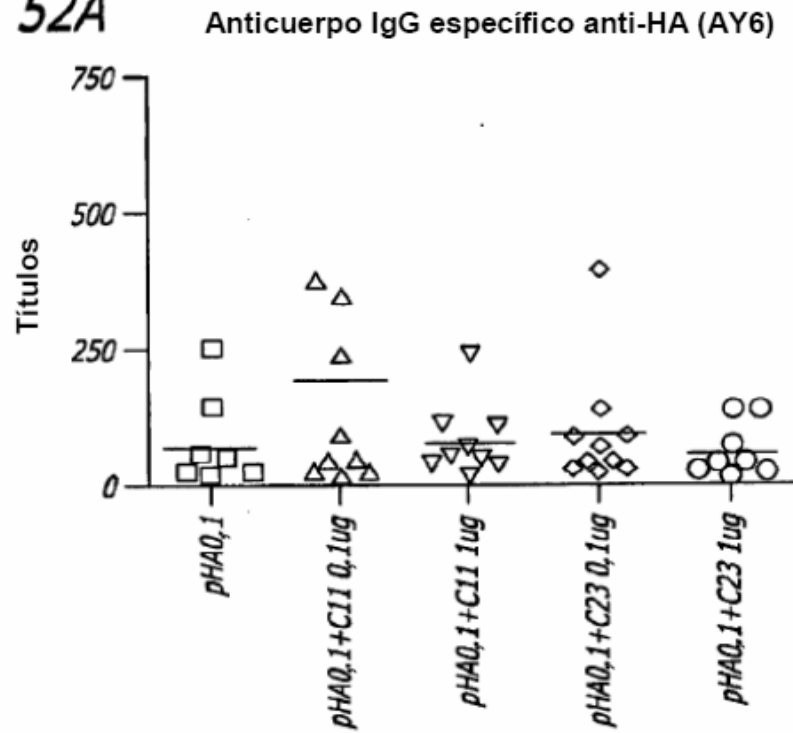
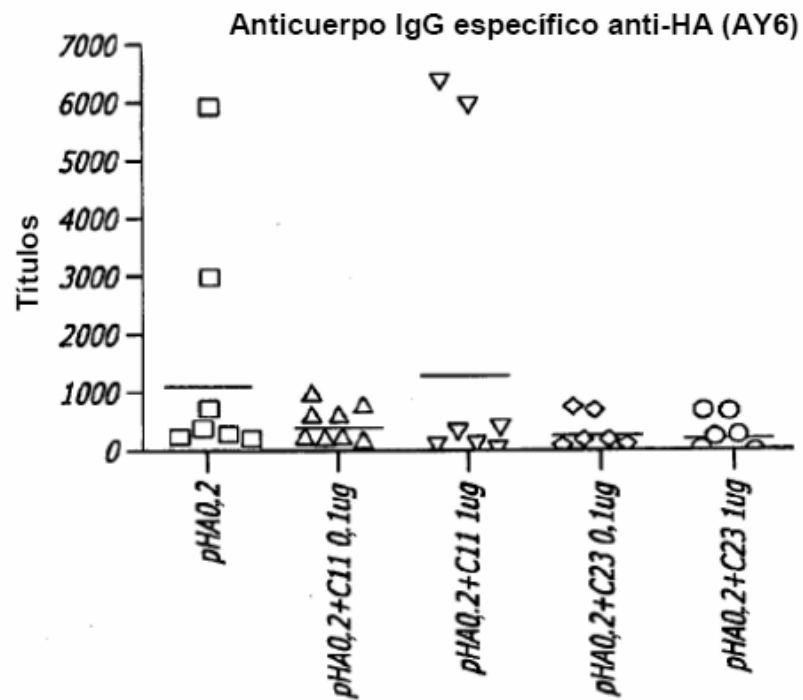
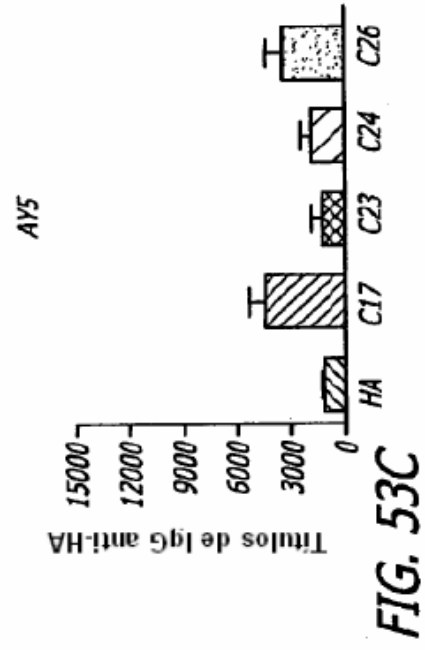
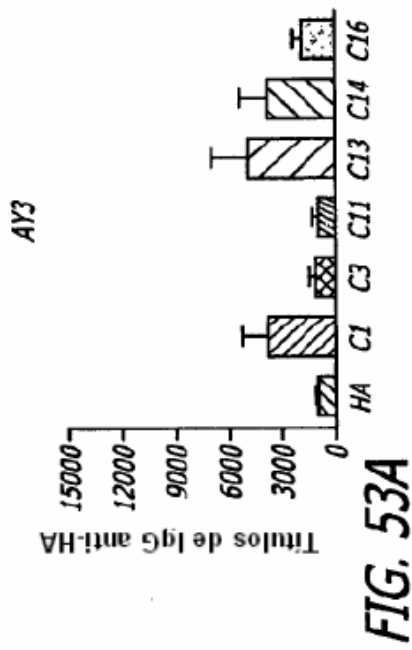
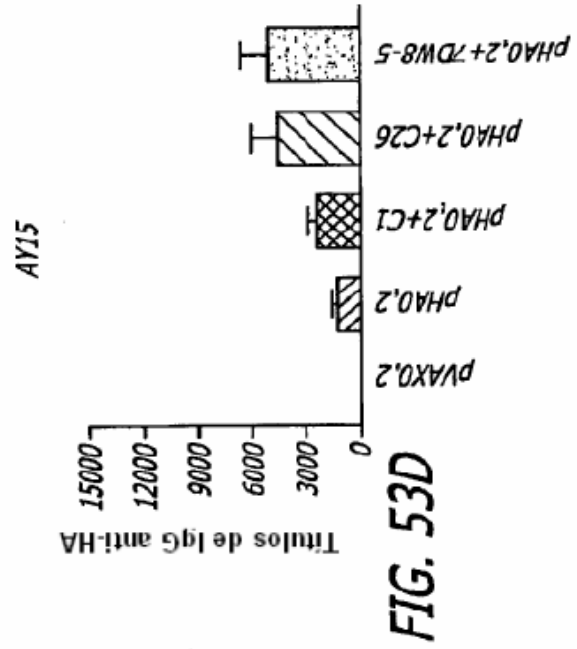
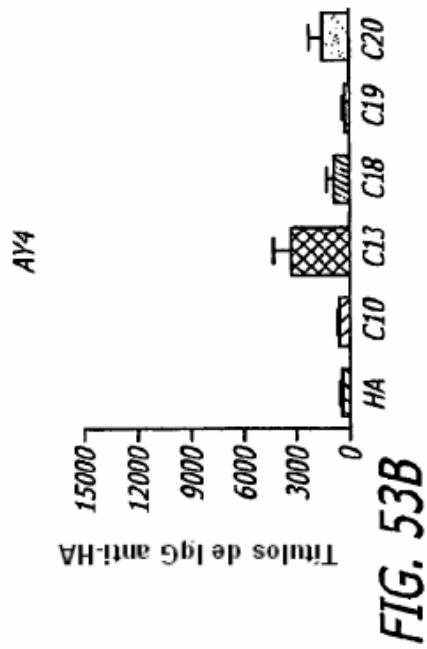
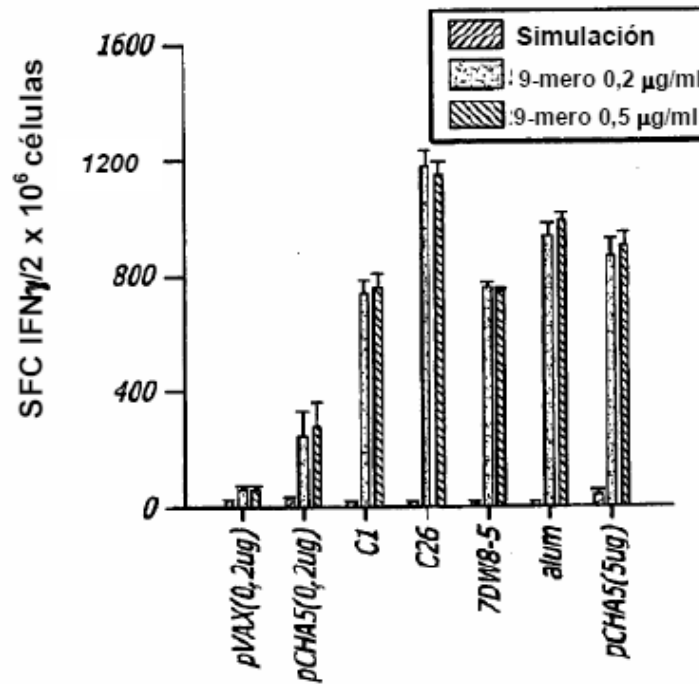
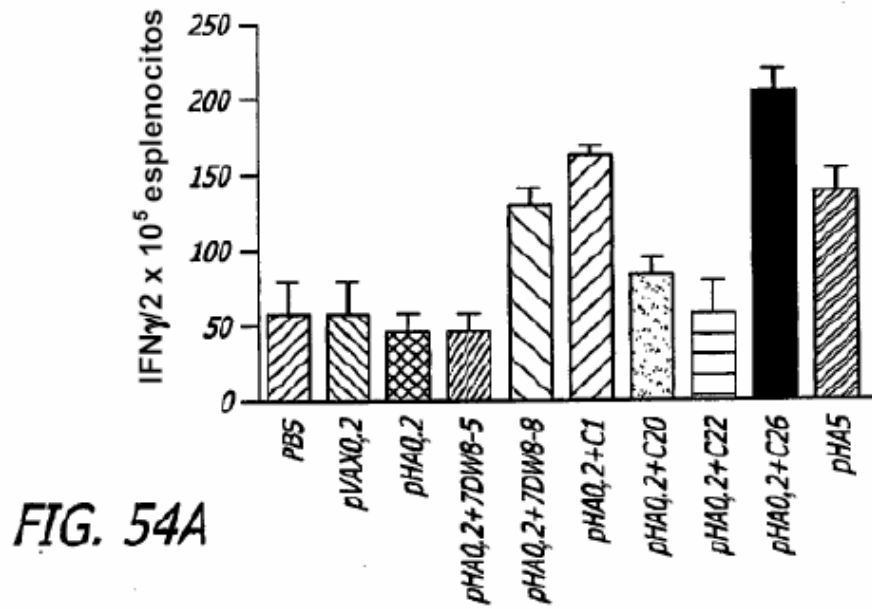


FIG. 52B







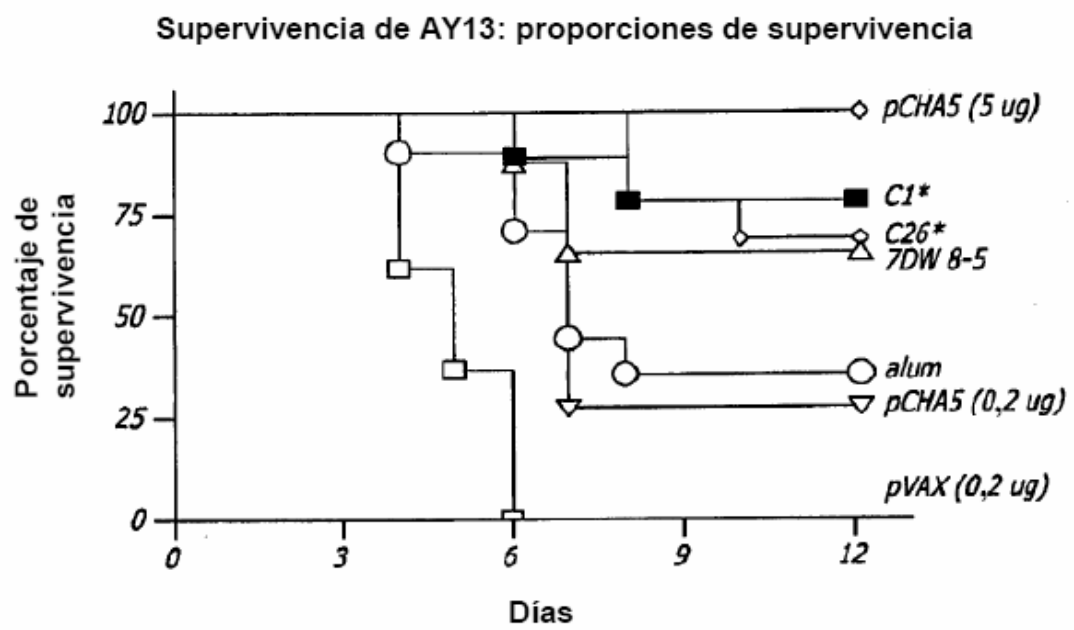


FIG. 55

FIG. 56A

AY20 (modificar)

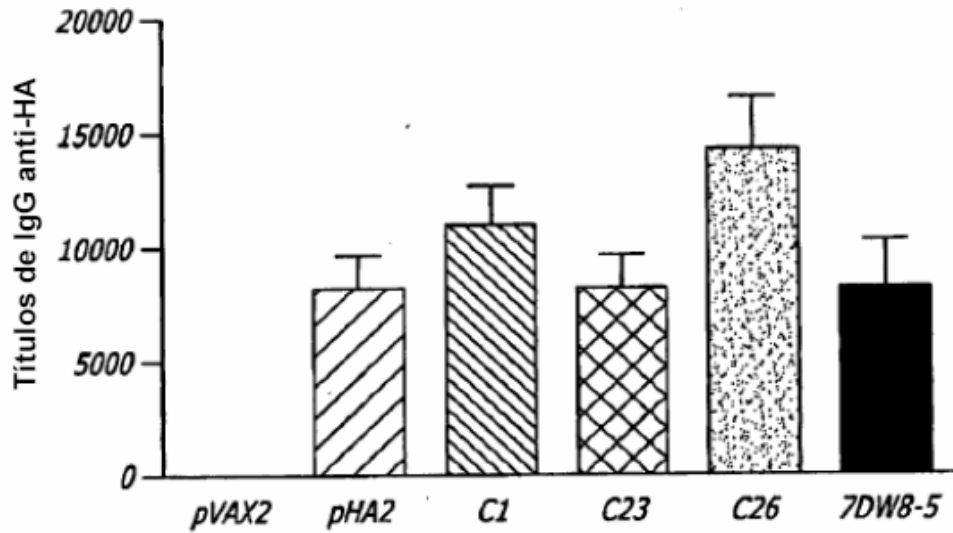


FIG. 56B

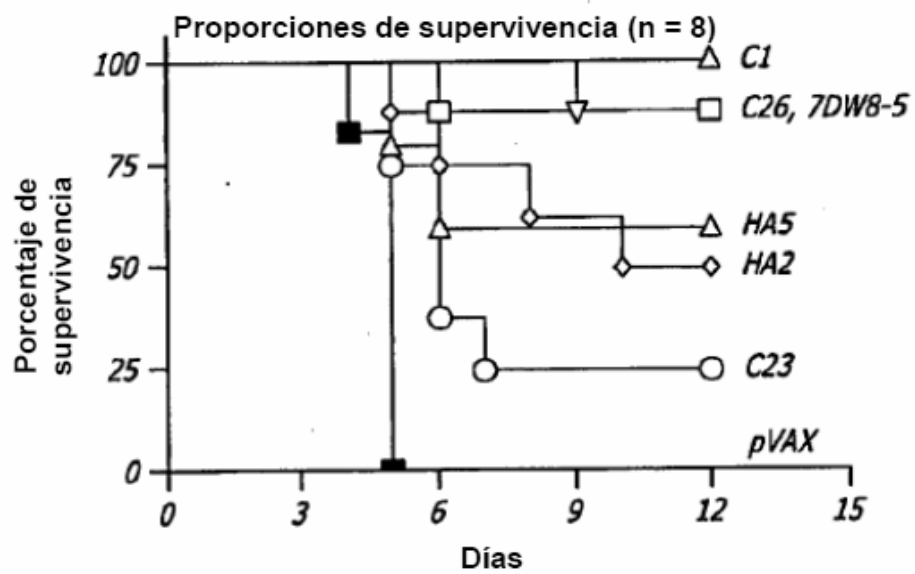


FIG. 57A

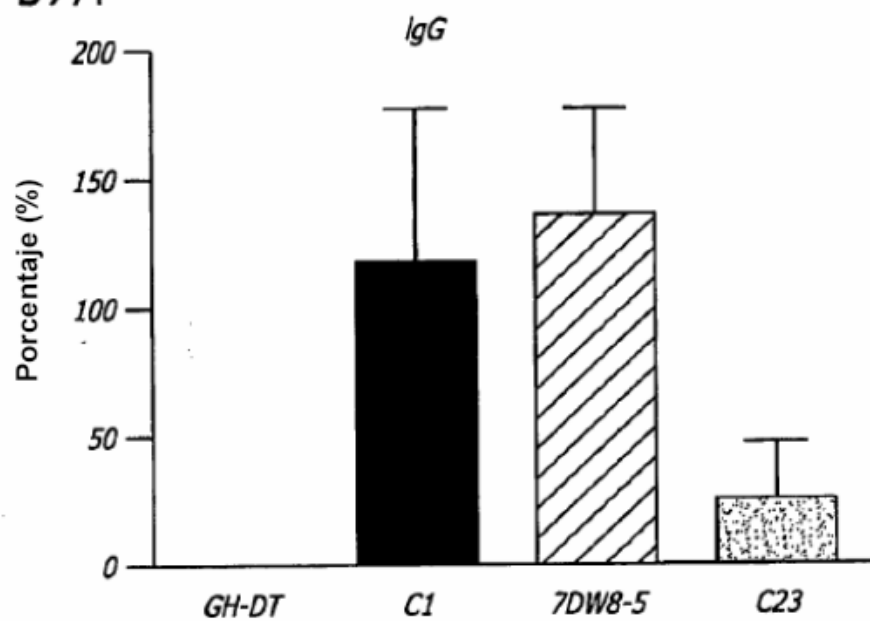
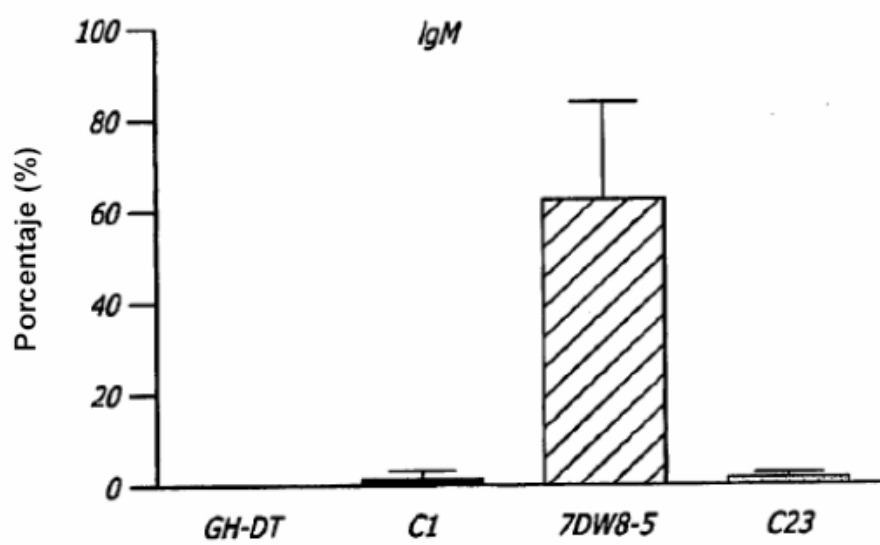


FIG. 57B



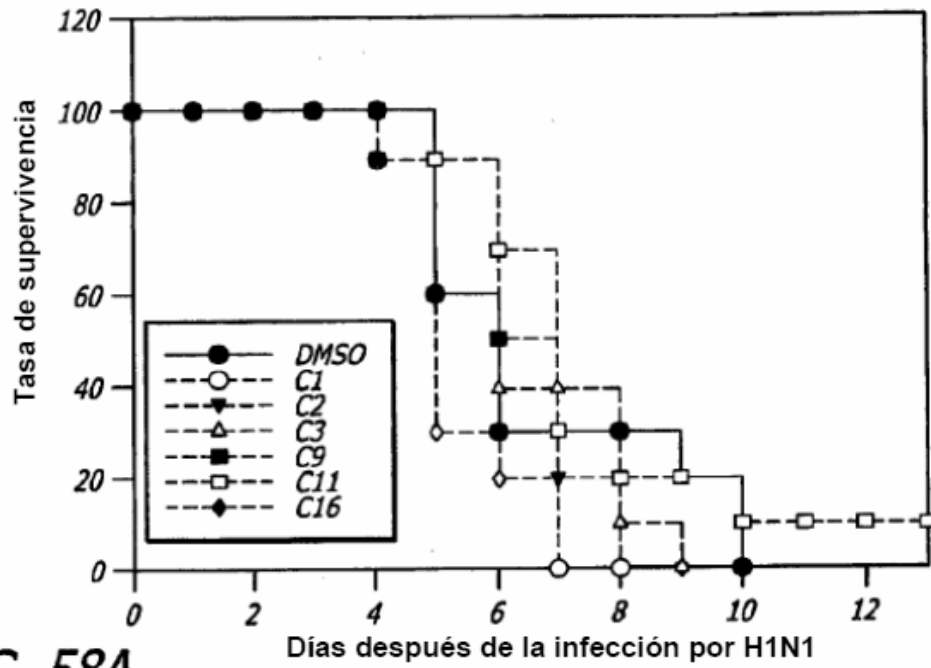


FIG. 58A

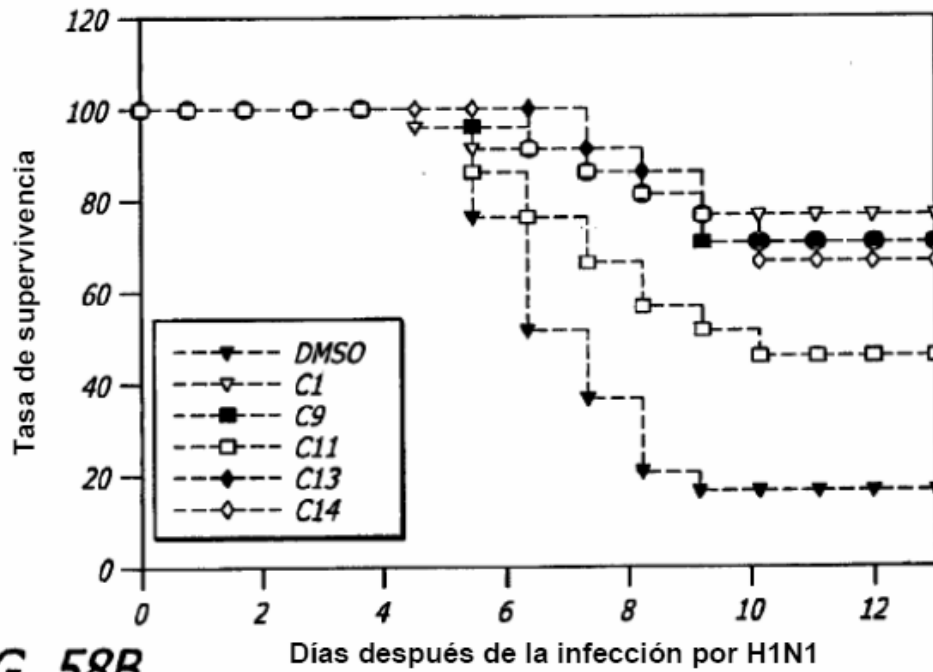


FIG. 58B

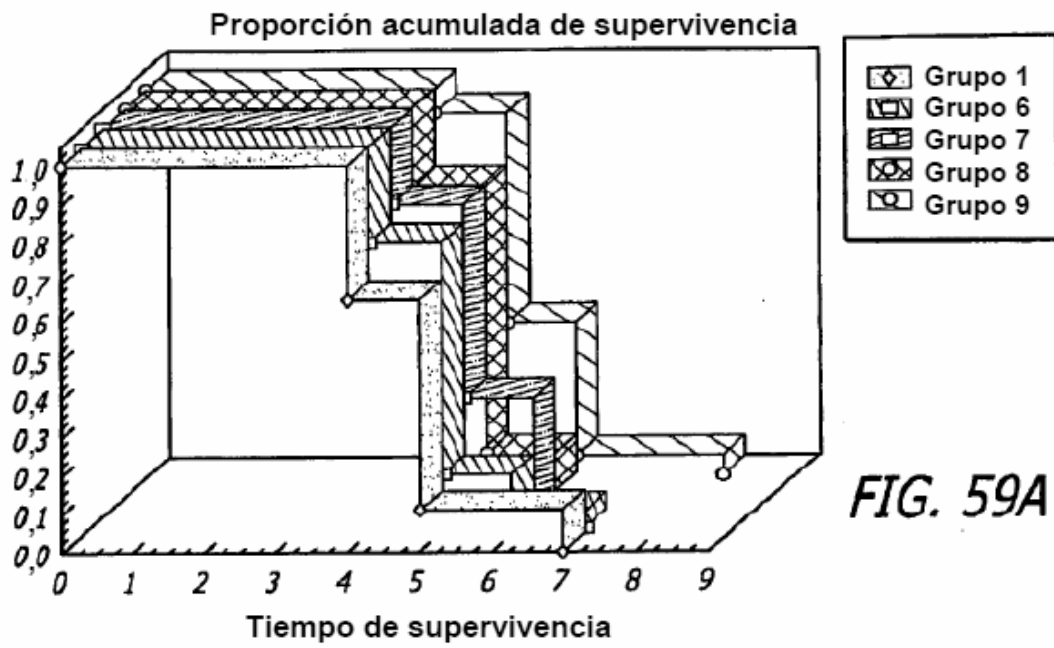


FIG. 59A

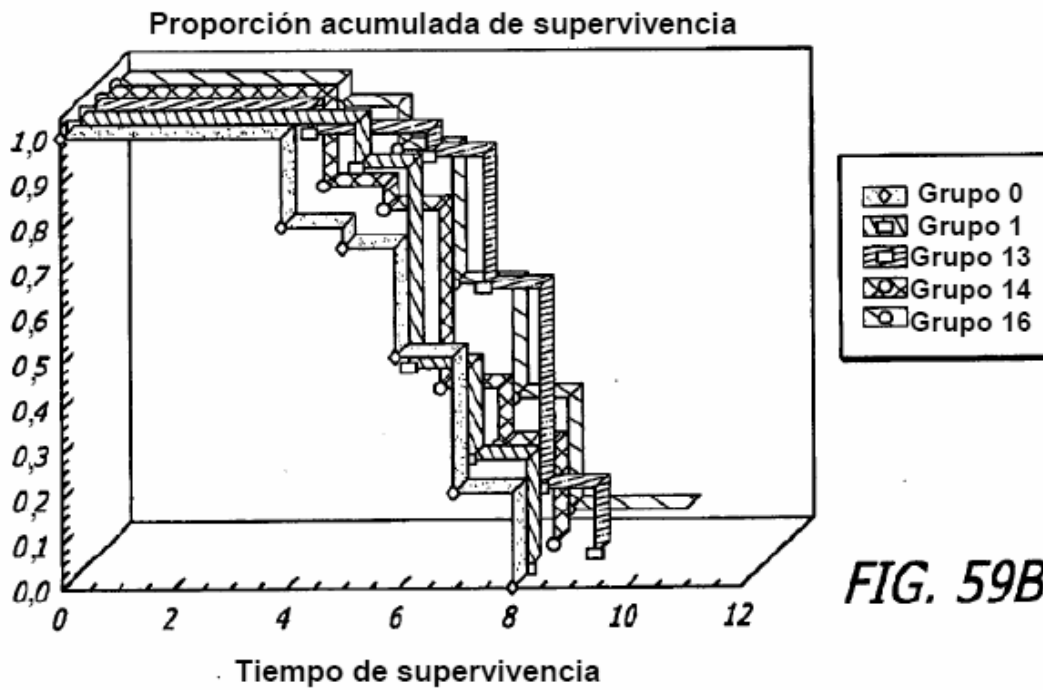
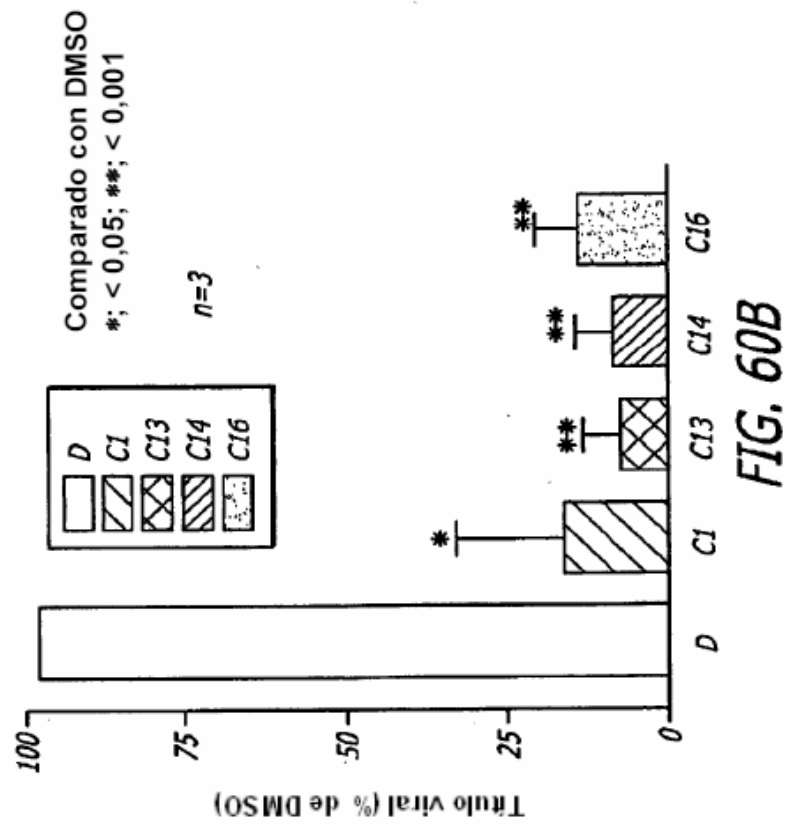
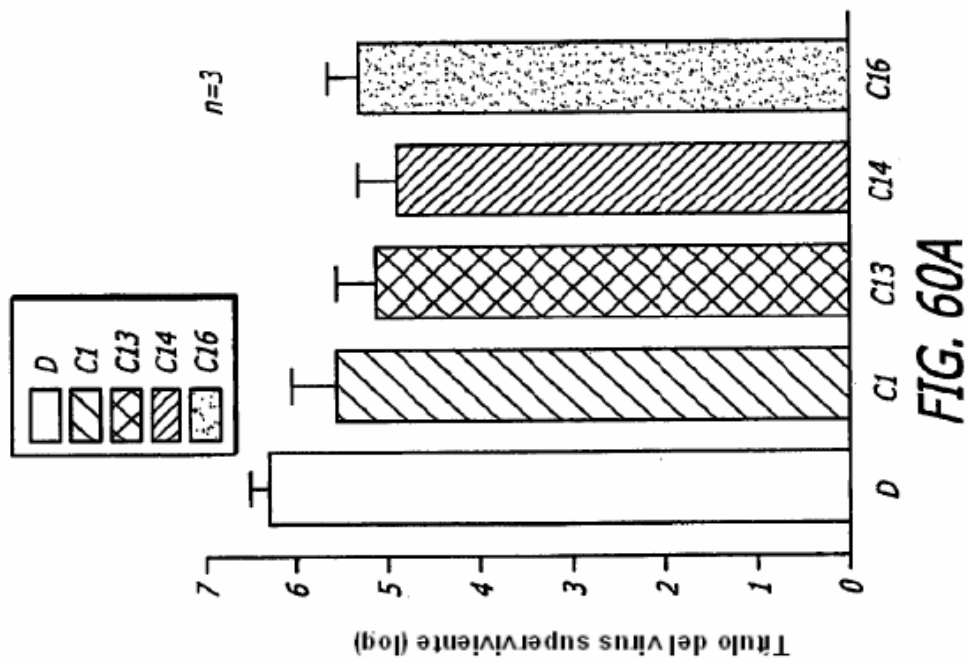


FIG. 59B



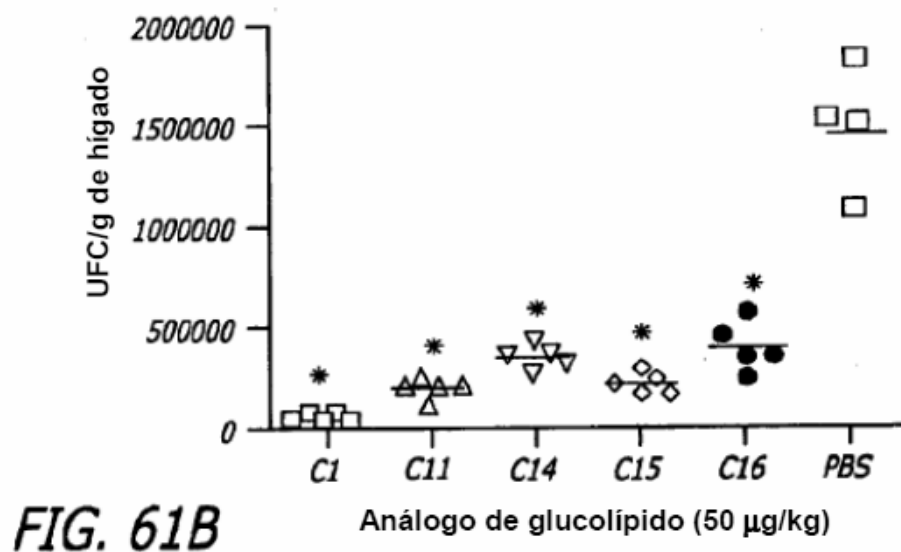
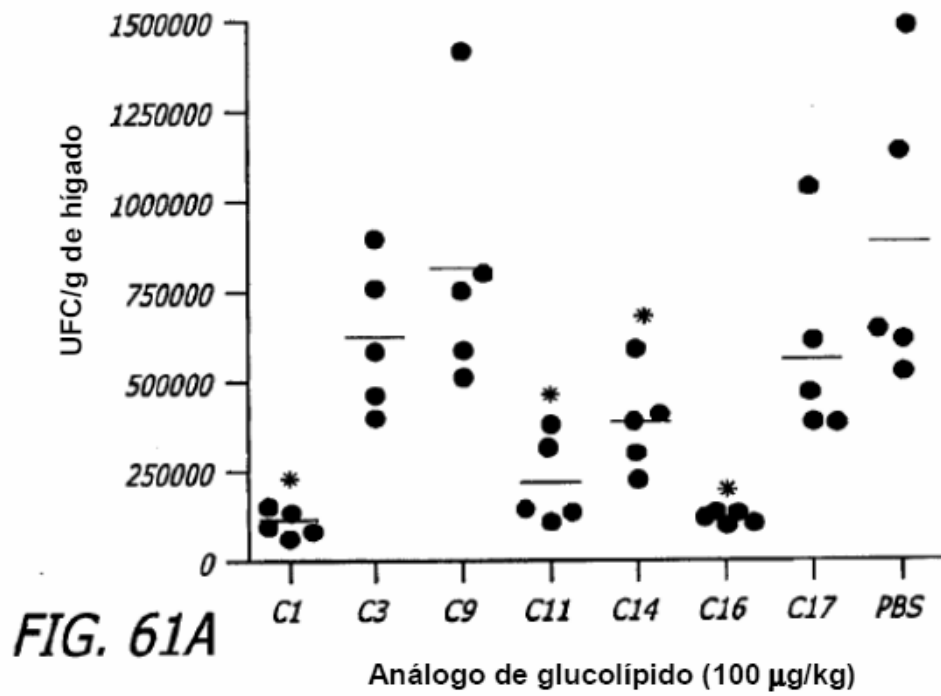
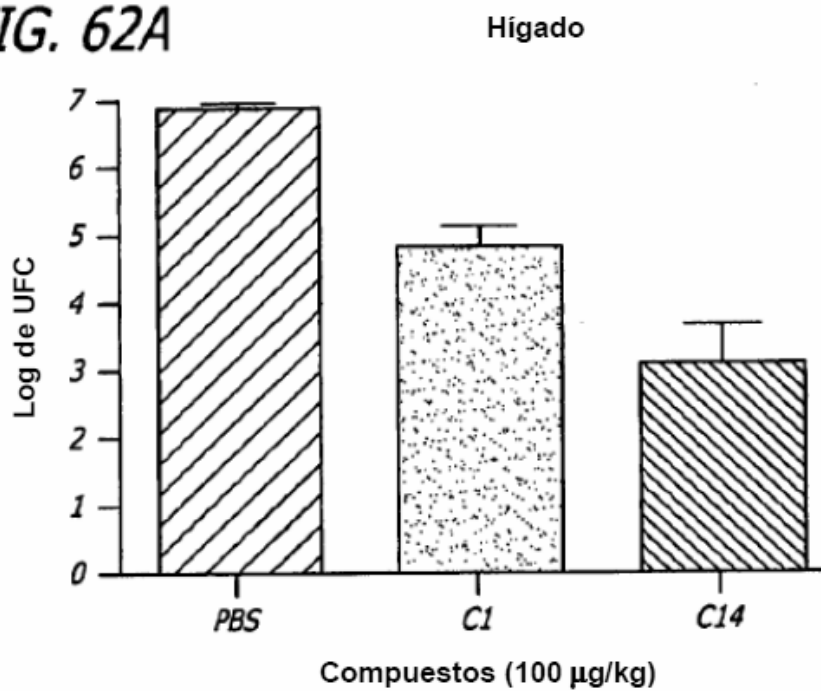
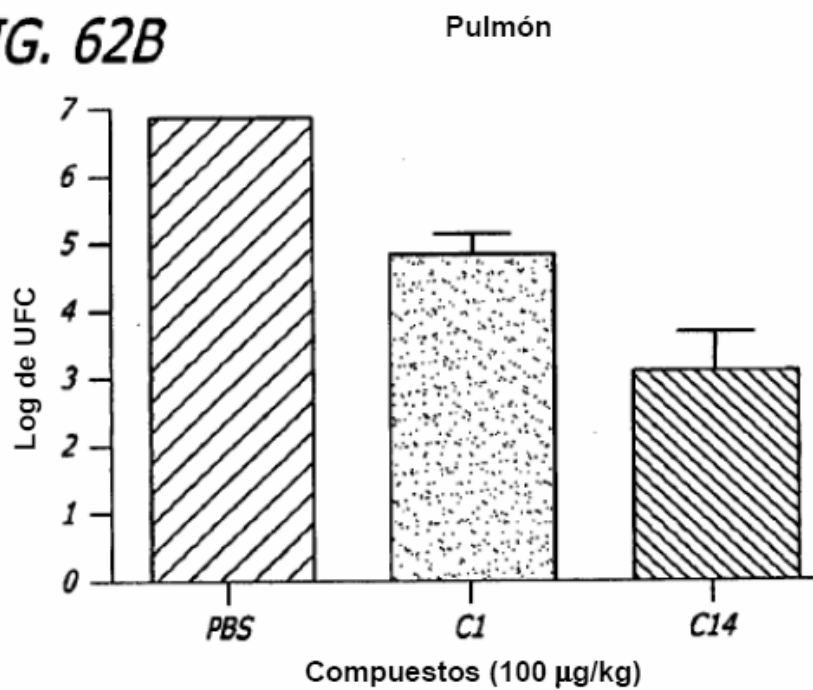


FIG. 62A**FIG. 62B**

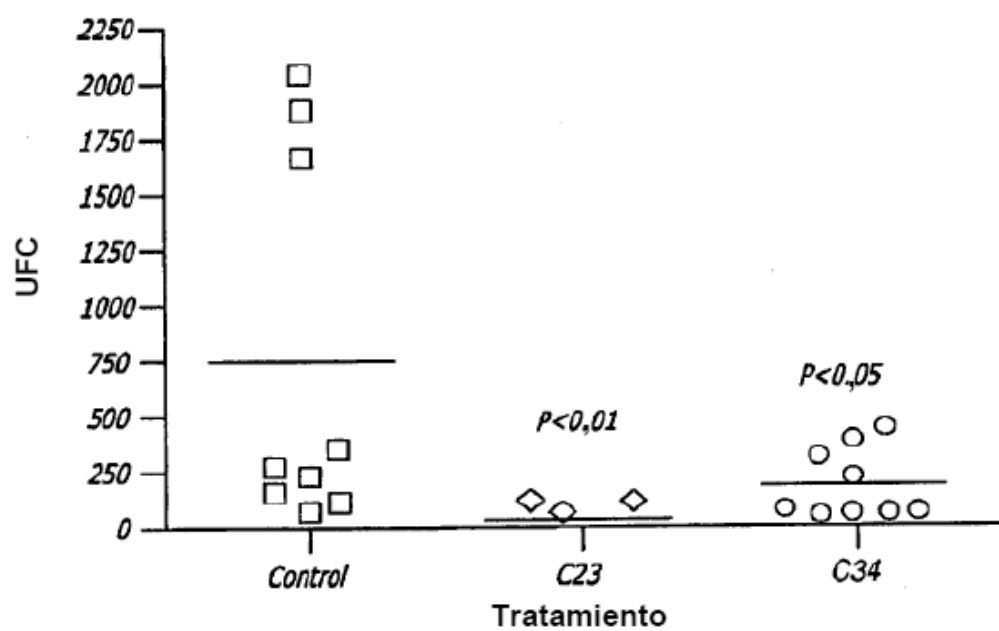


FIG. 63

Fig. 64A

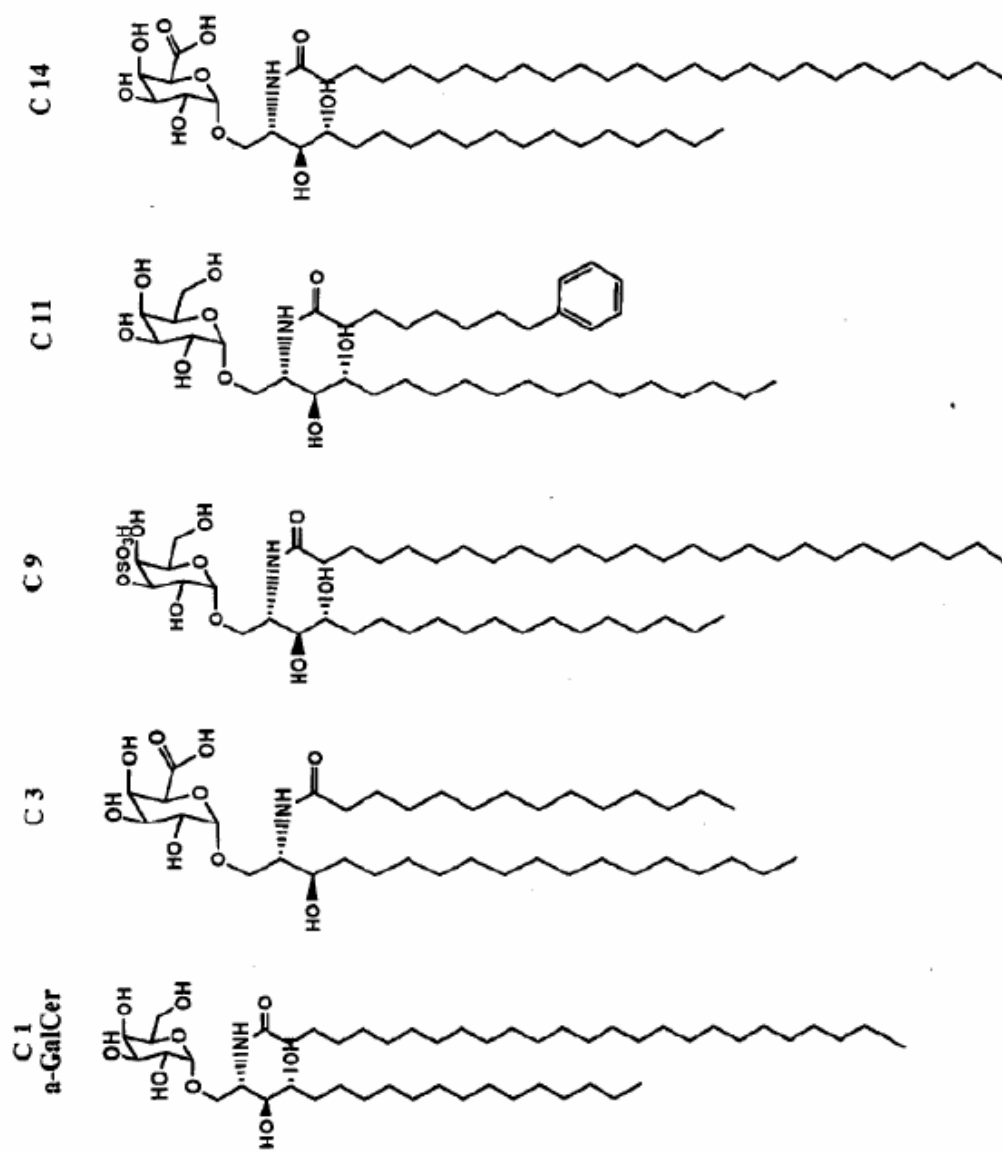


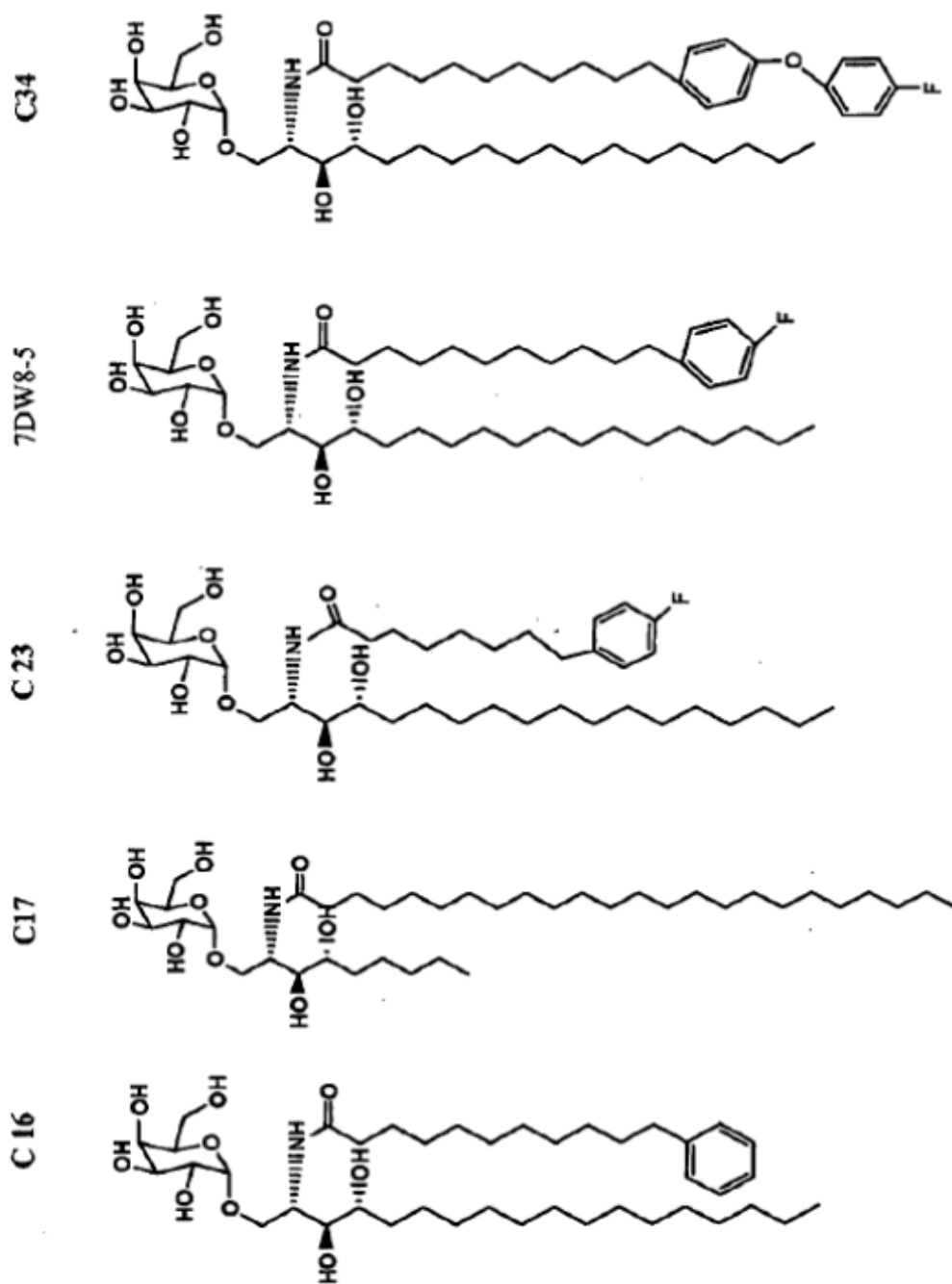
Fig. 64B

Fig. 65

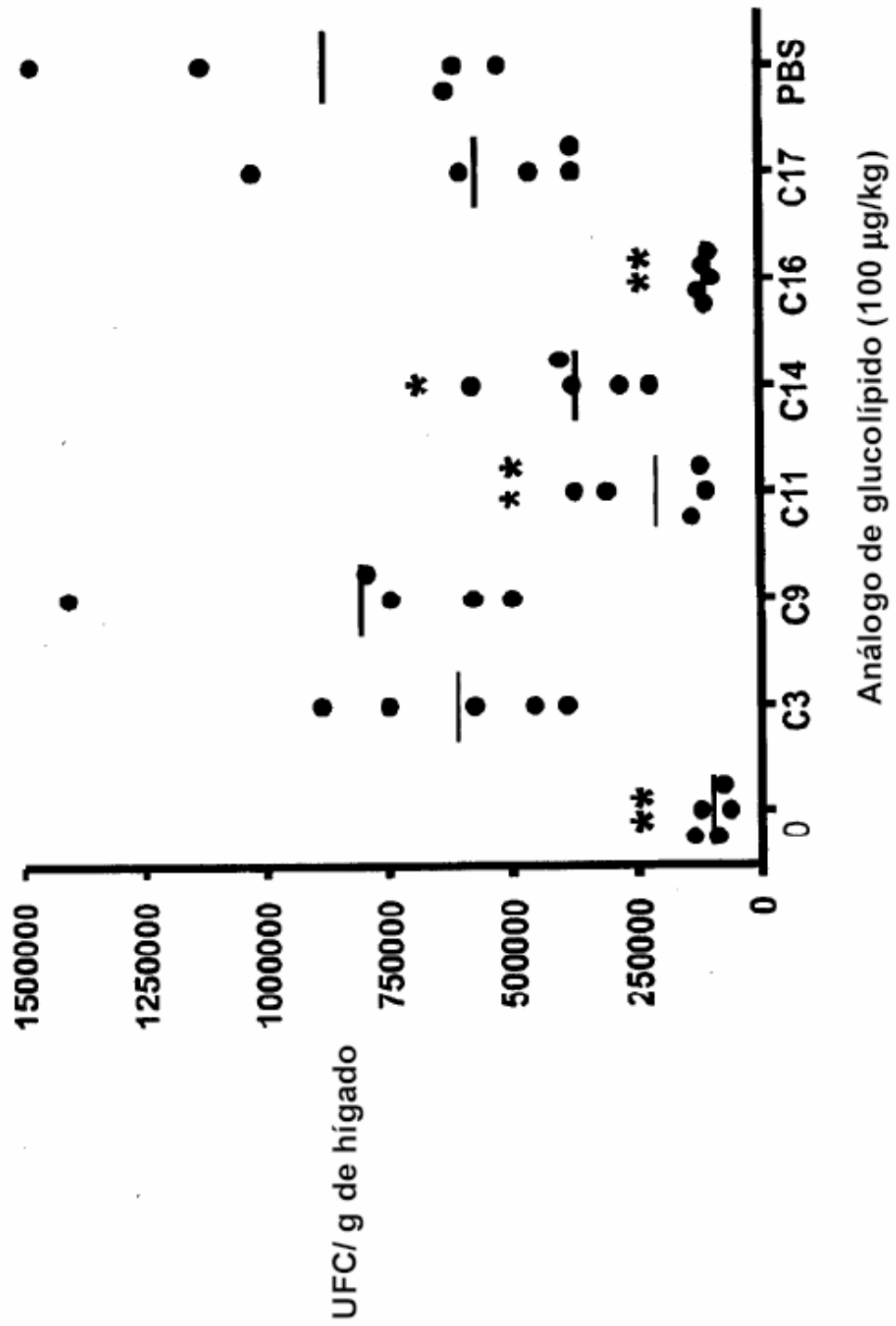


Fig. 66A

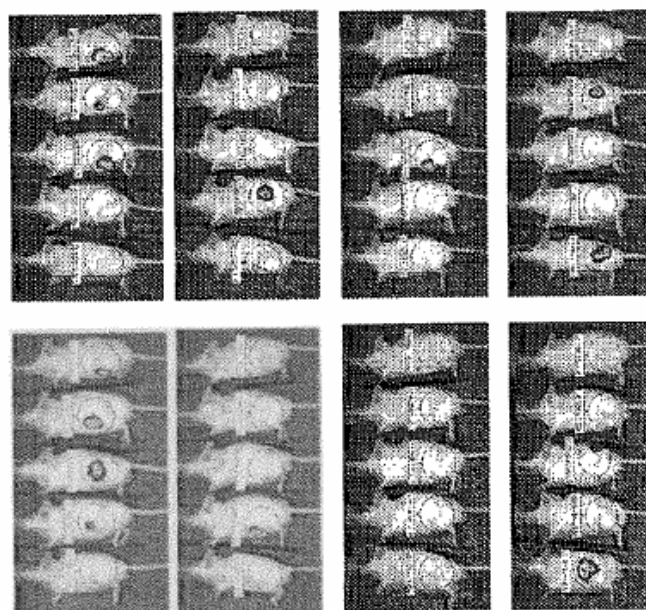


Fig. 66B

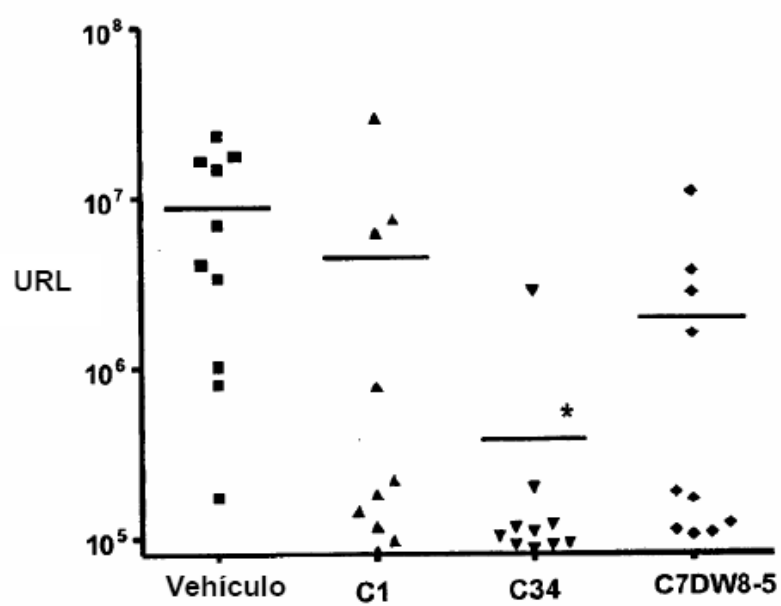


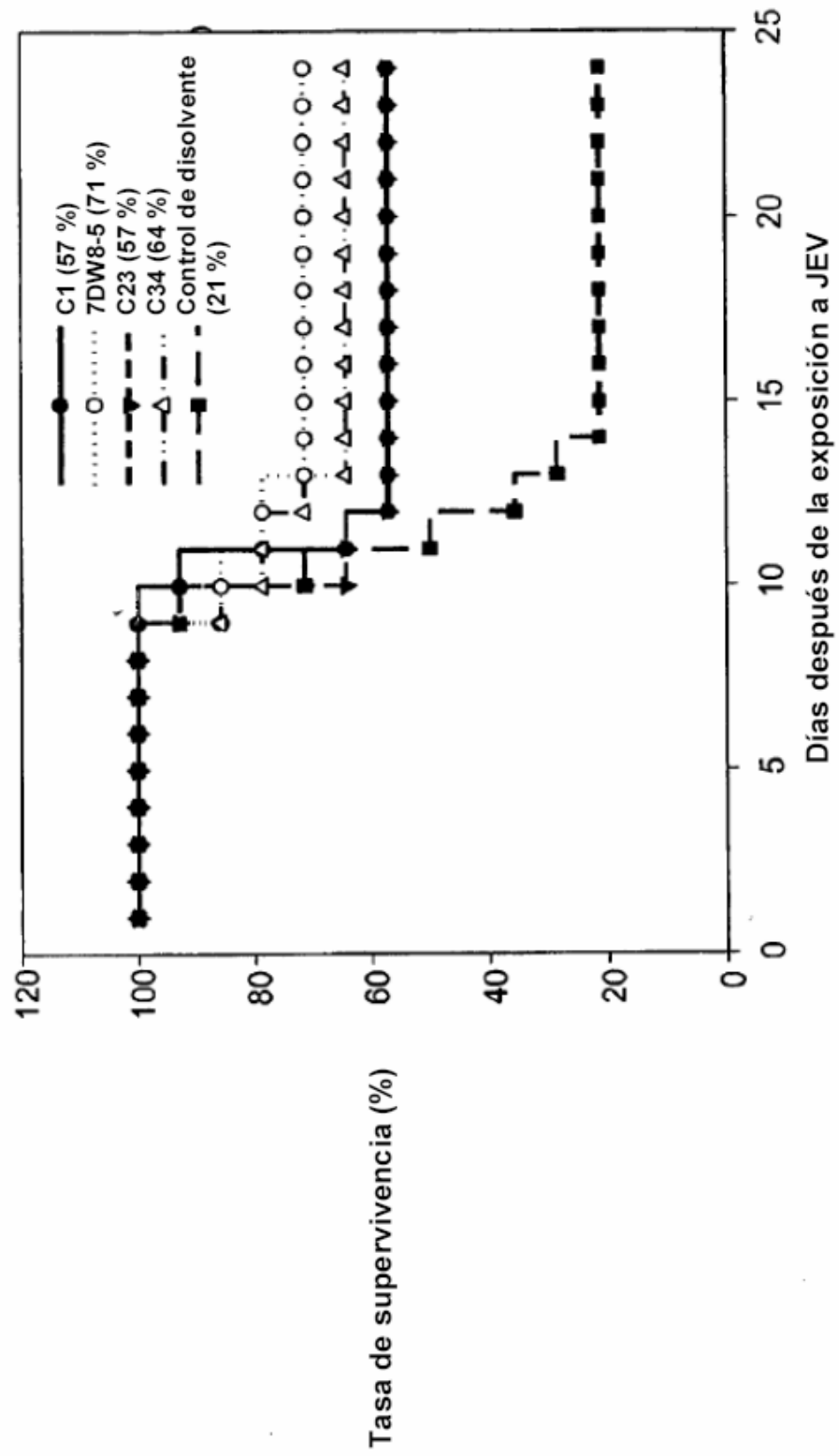
Fig. 67

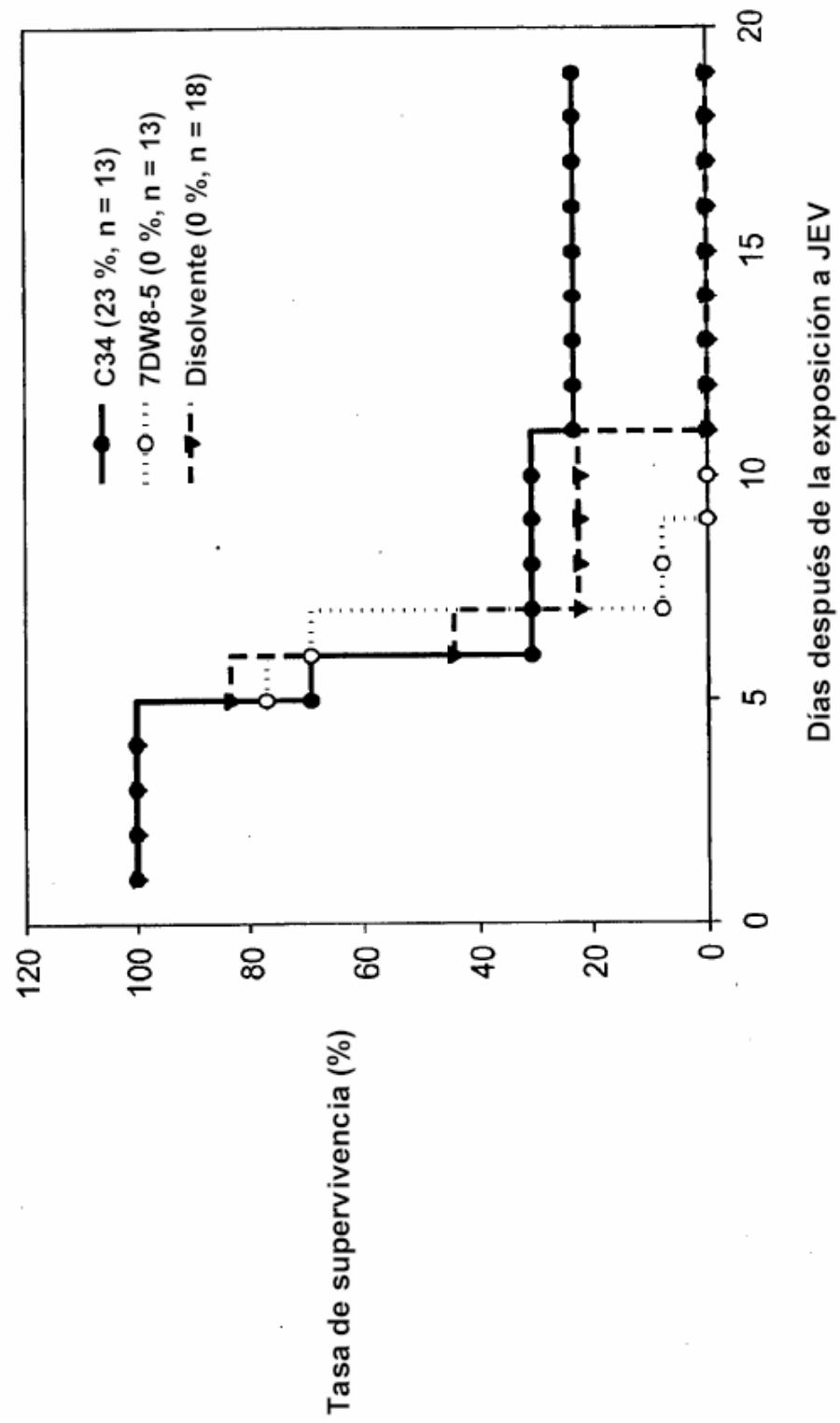
Fig. 68A

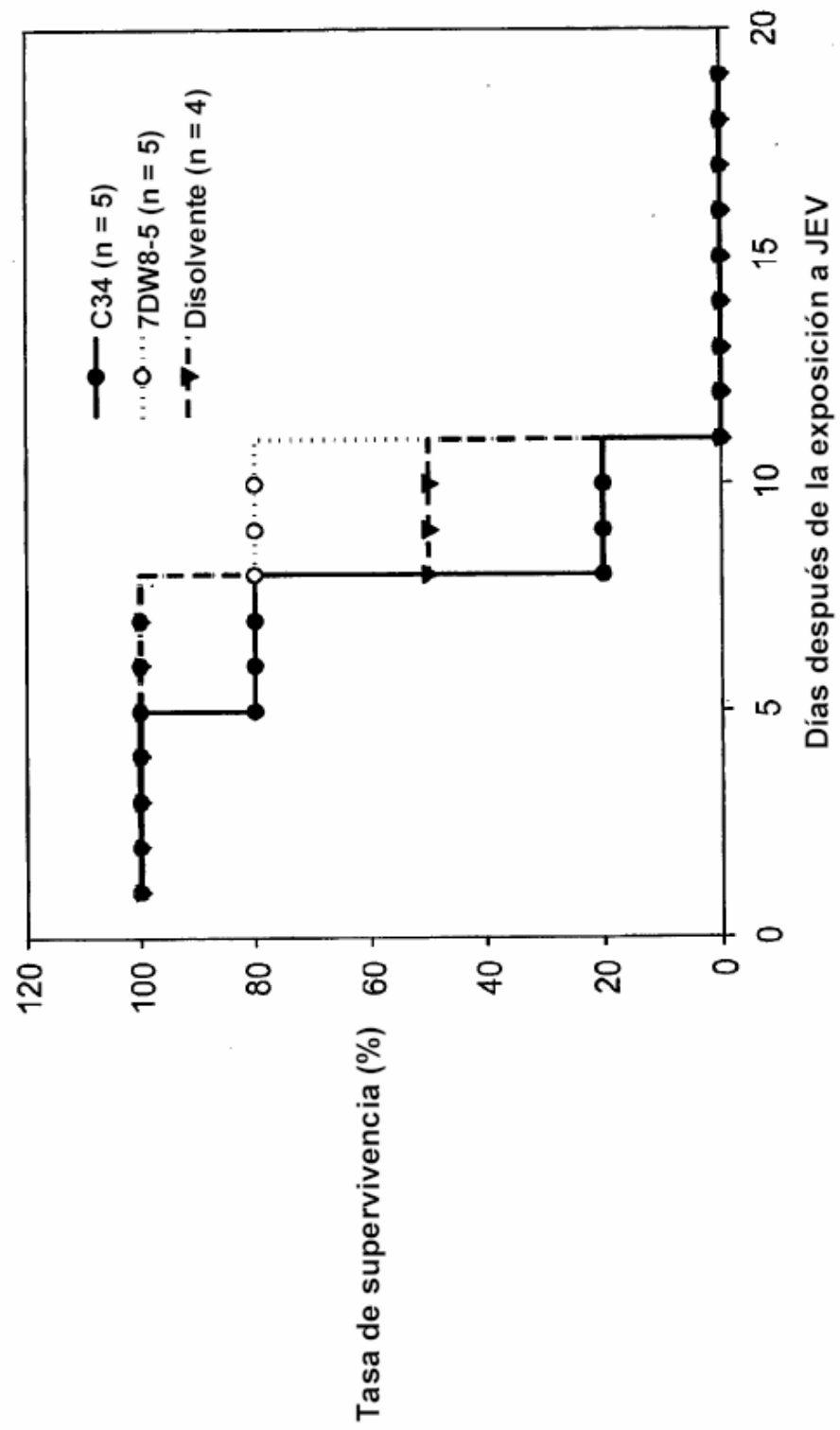
Fig. 68B

Fig. 68C

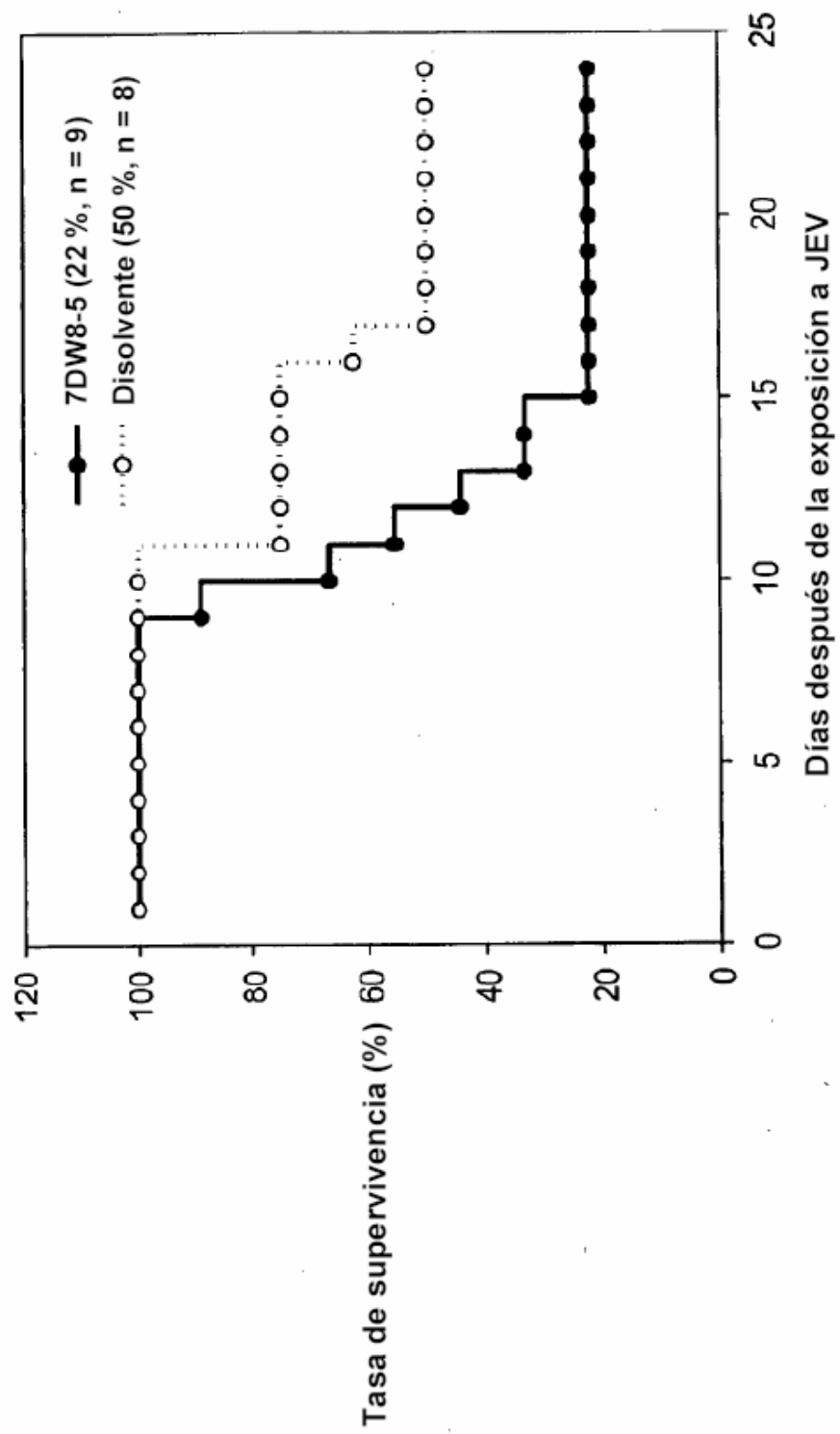


Fig. 69A

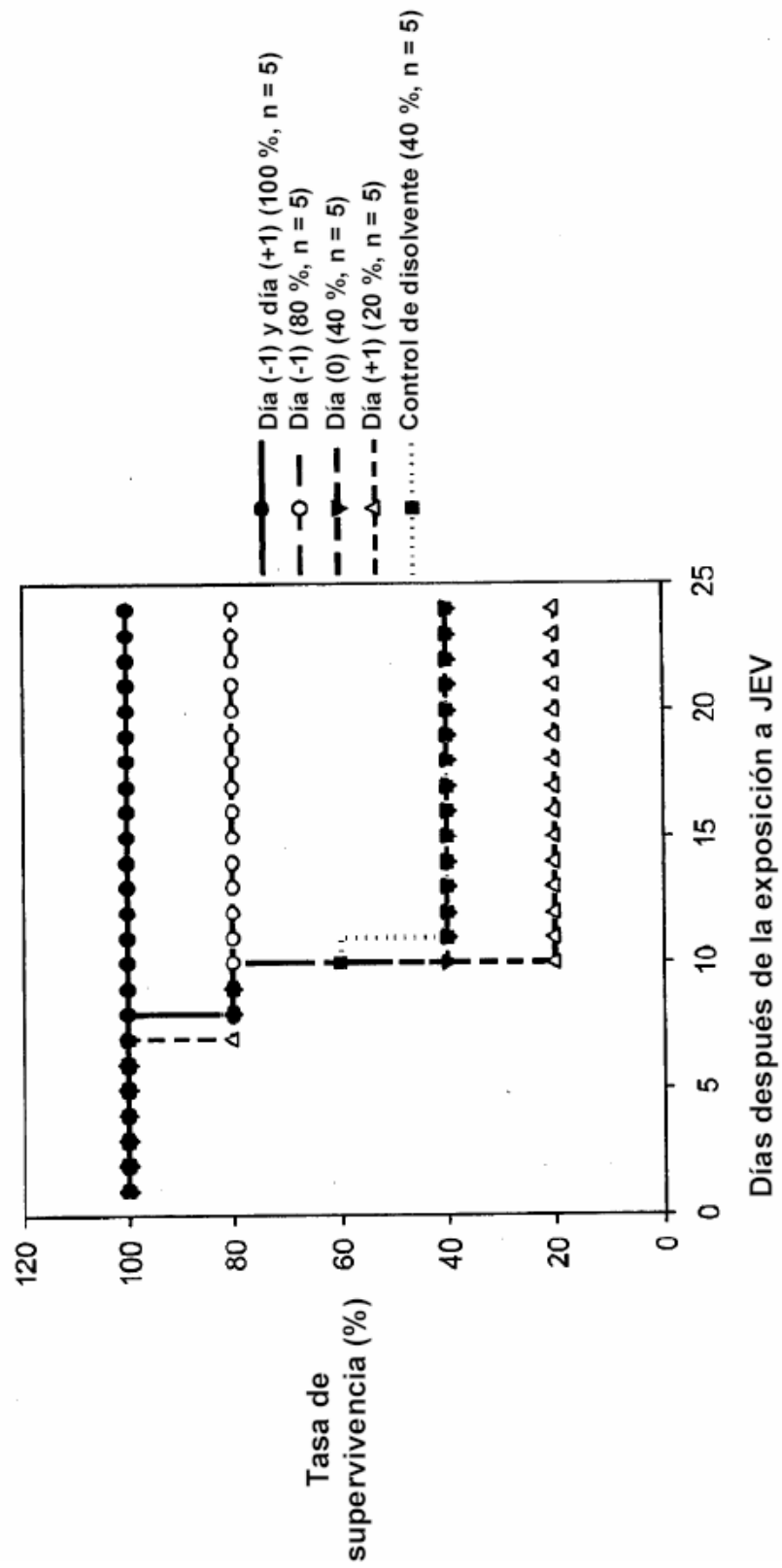


Fig. 69B

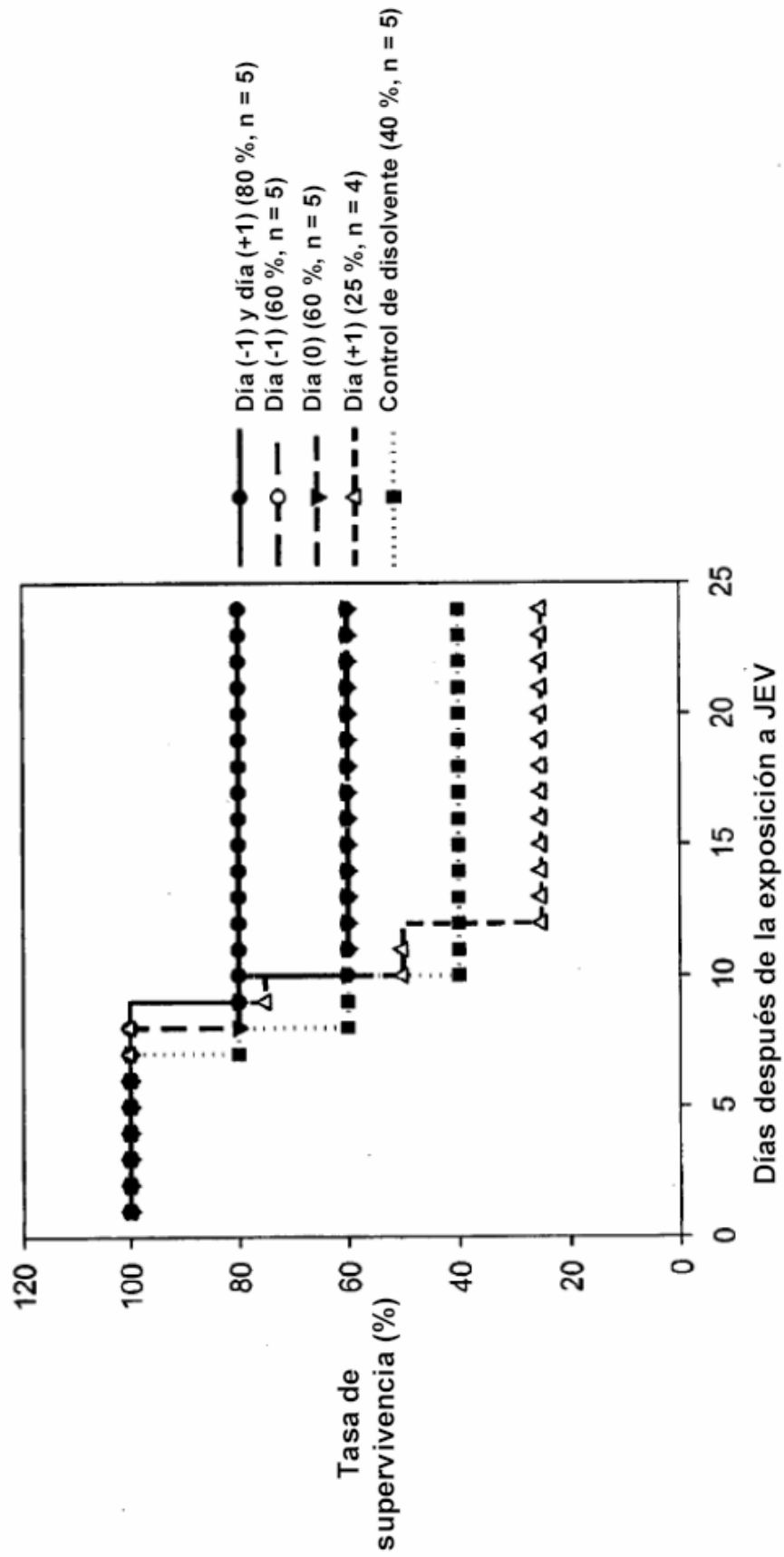


Fig. 70A

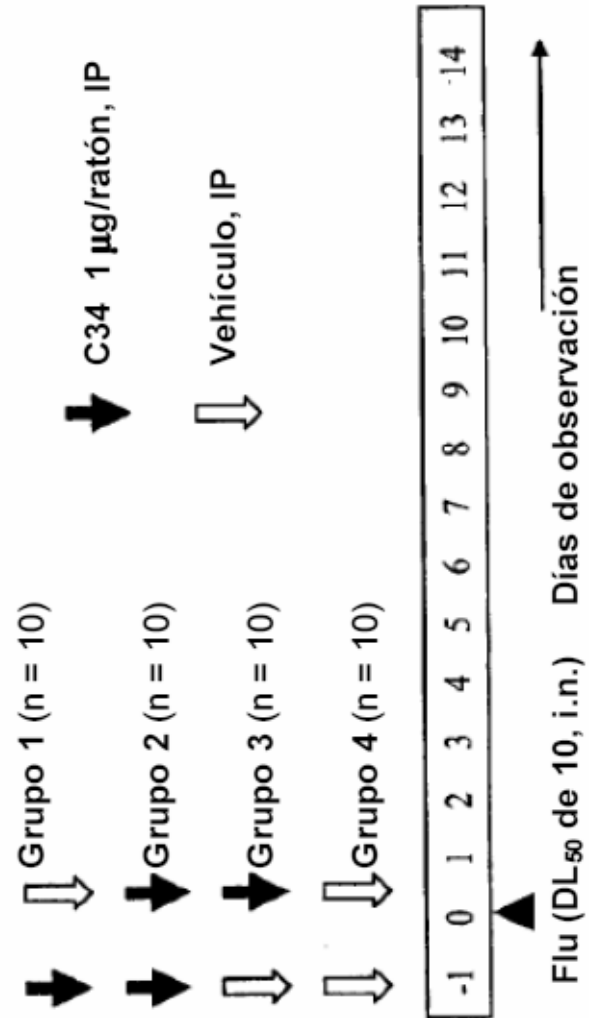


Fig. 70B

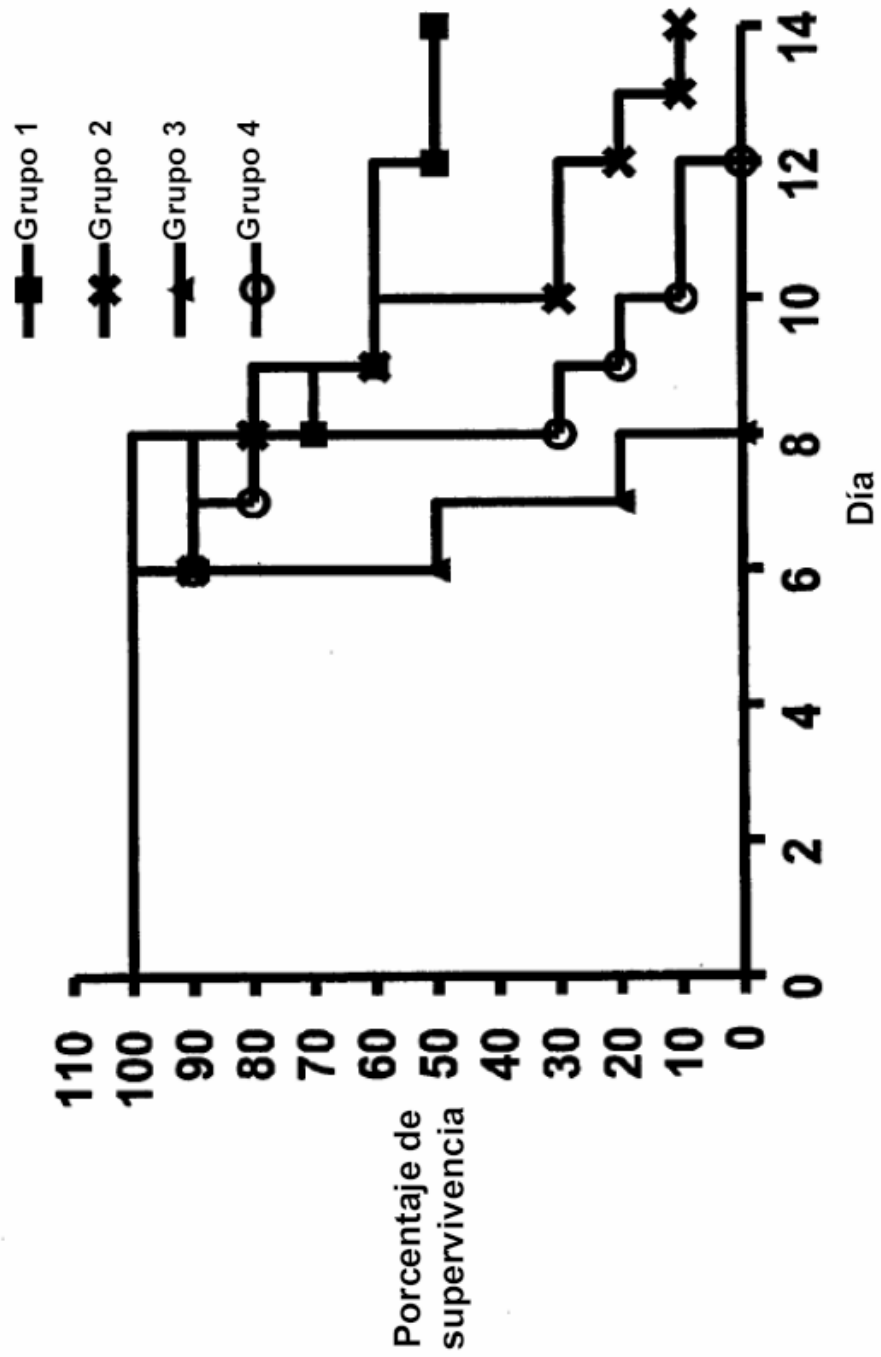


Fig. 71

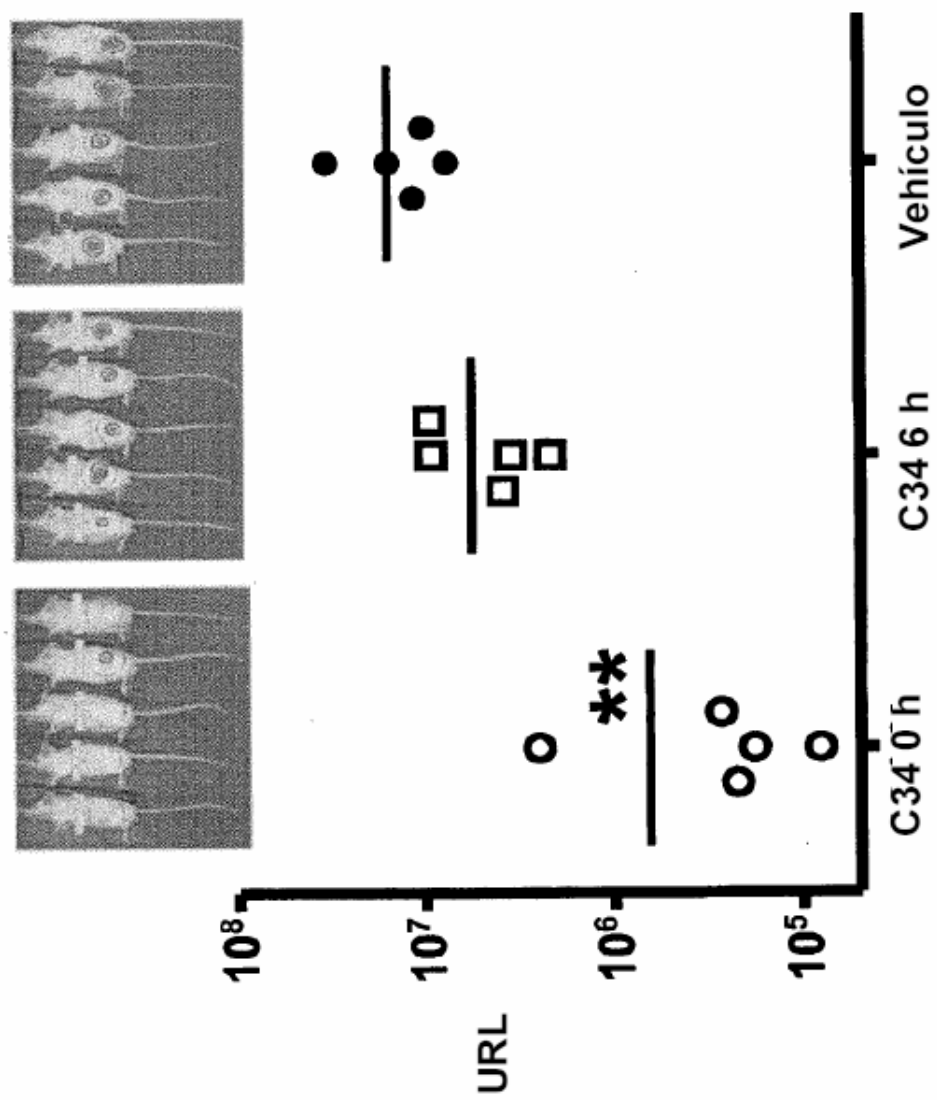


Fig. 72Eficacia de glucolípidos seleccionados para suprimir las infecciones por *S. capsulate*

Tratamiento ^a	Vehículo	C1	7DW8-5	C23	C34
n =	7	7	7	7	7
UFC/g de hígado ^b	2,1E + 07	3,8E + 06	1,8E + 06	3,5E + 06	1,4E +06
Valor de p		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

^aRatones C57Bl recibieron por inyección IP glucolípidos a 50 µg/ml a las 4 h de la infección.^bValores medios de UFC/g de hígado determinados a las 24 horas de la infección.

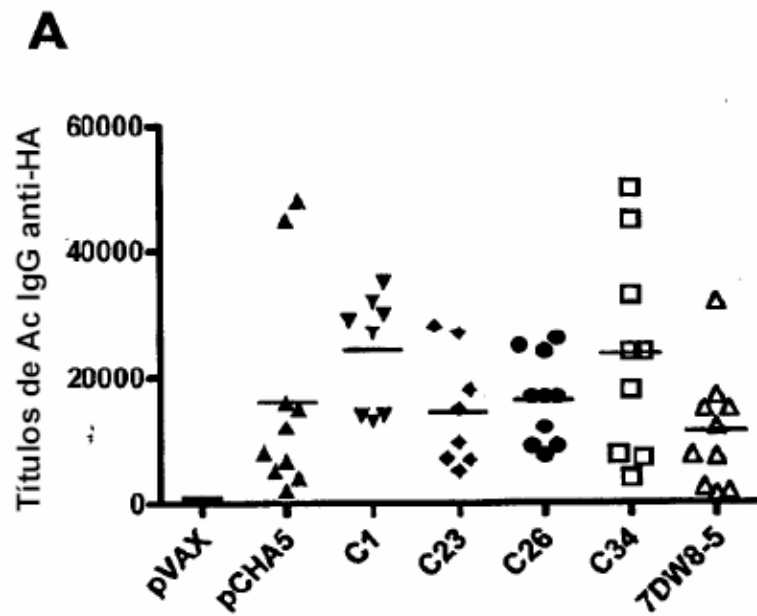


FIG. 73A

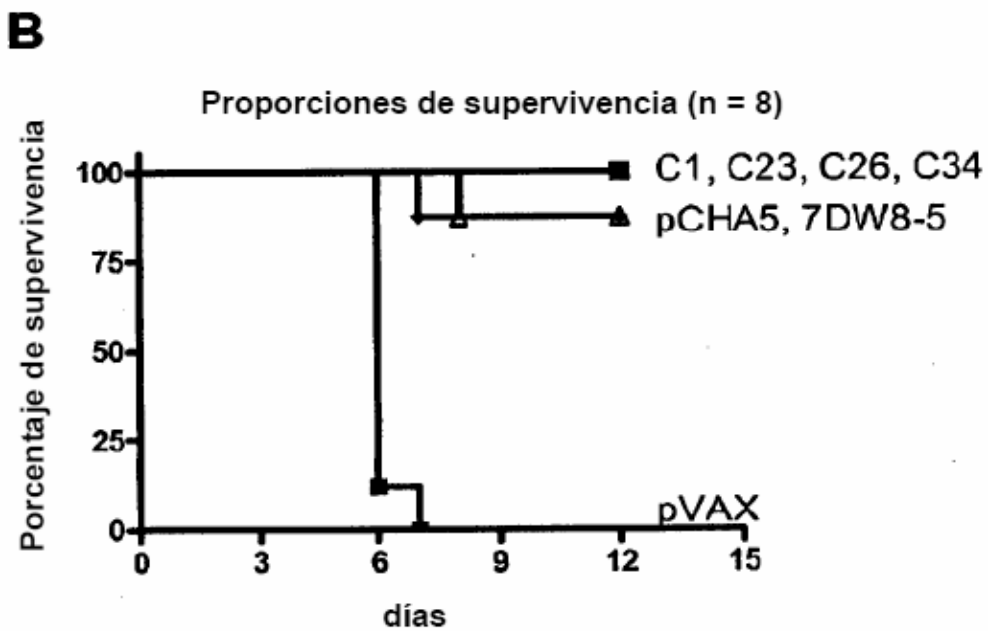


FIG. 73B

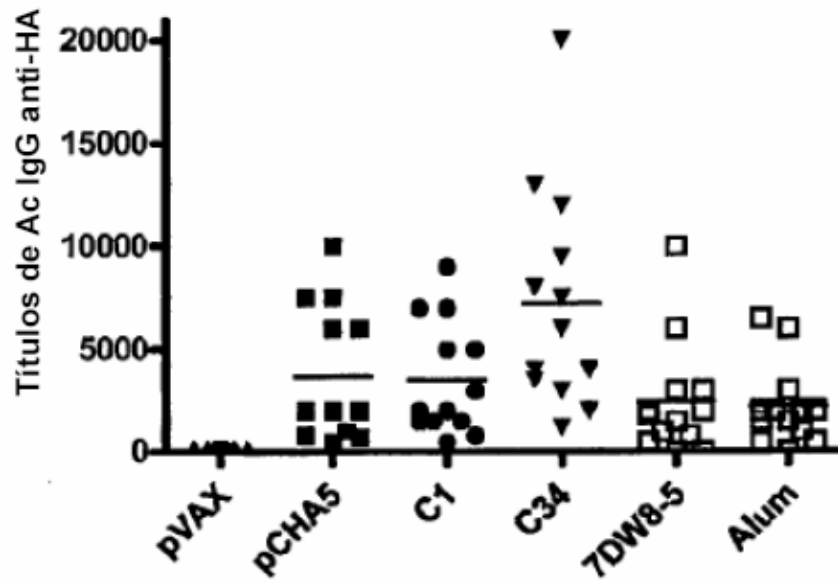


FIG. 74A

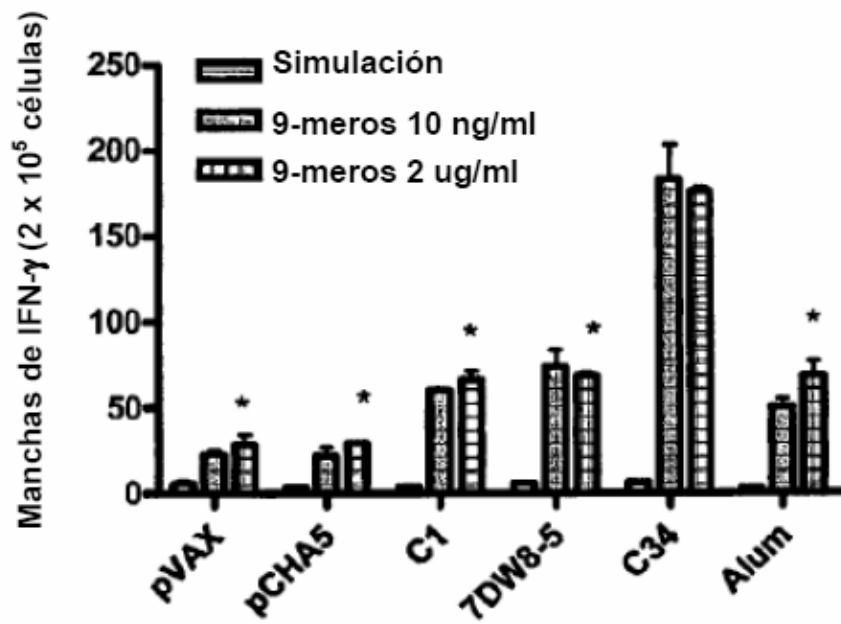


FIG. 74B

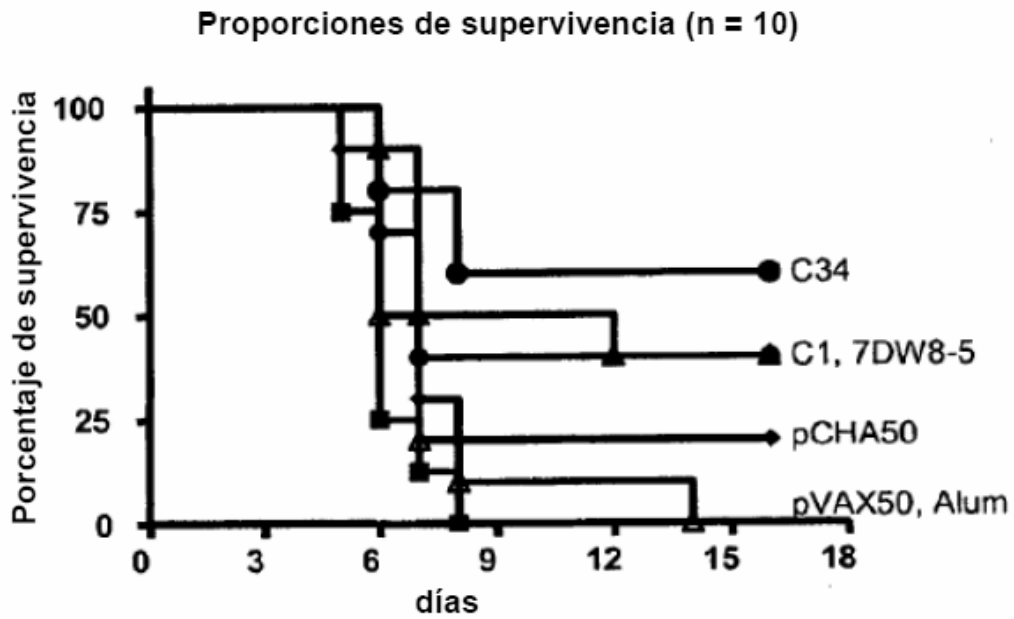


FIG. 74C

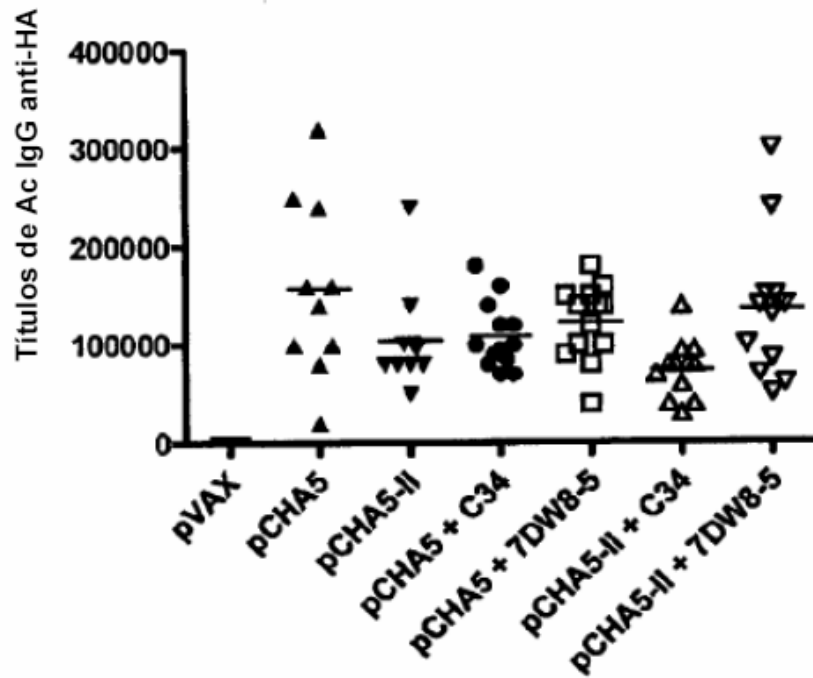


FIG. 75A

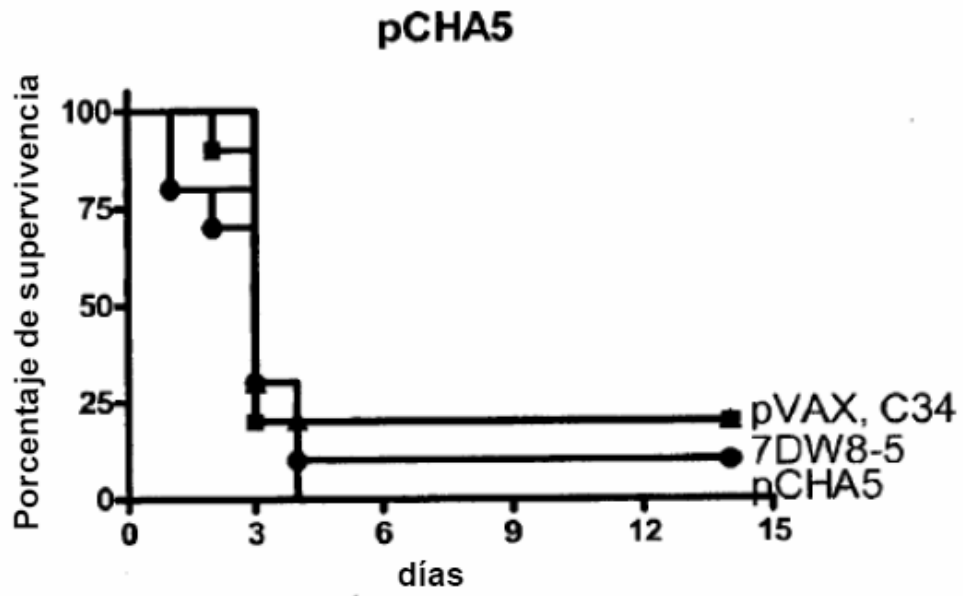


FIG. 75B

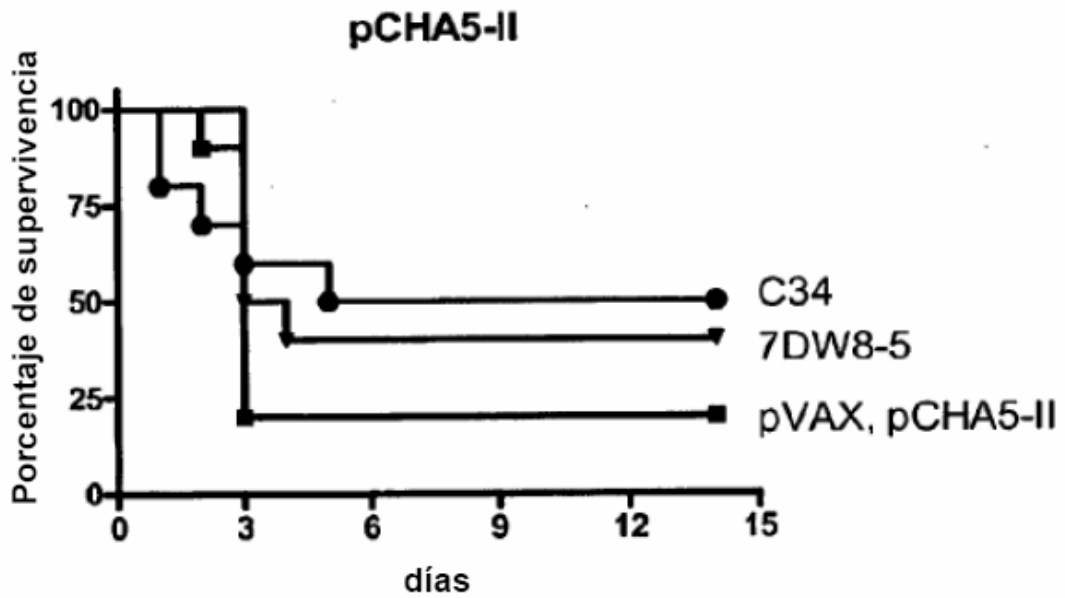


FIG. 75C

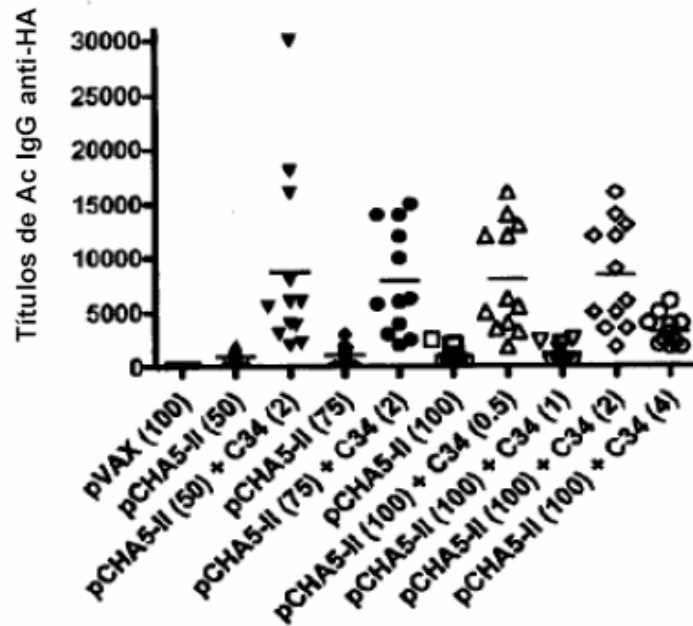


FIG. 76A

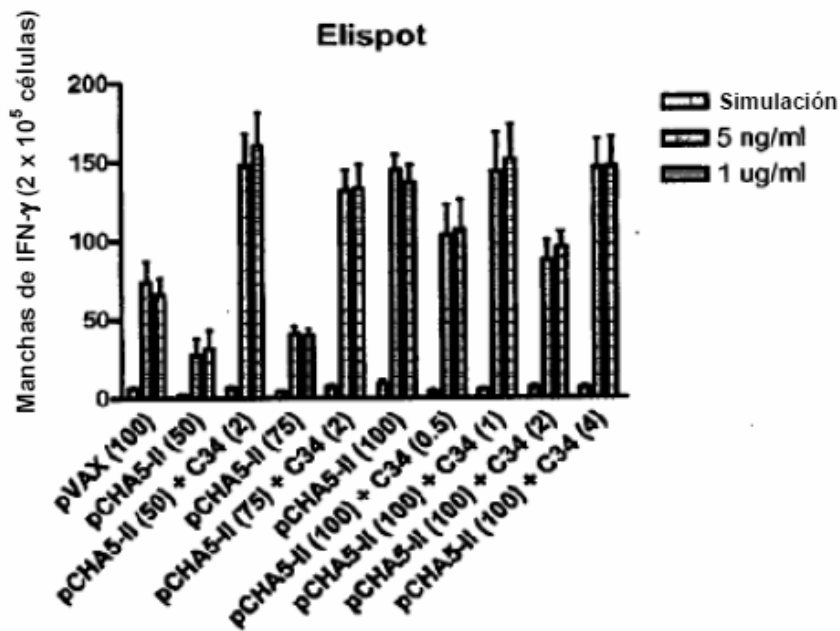


FIG. 76B

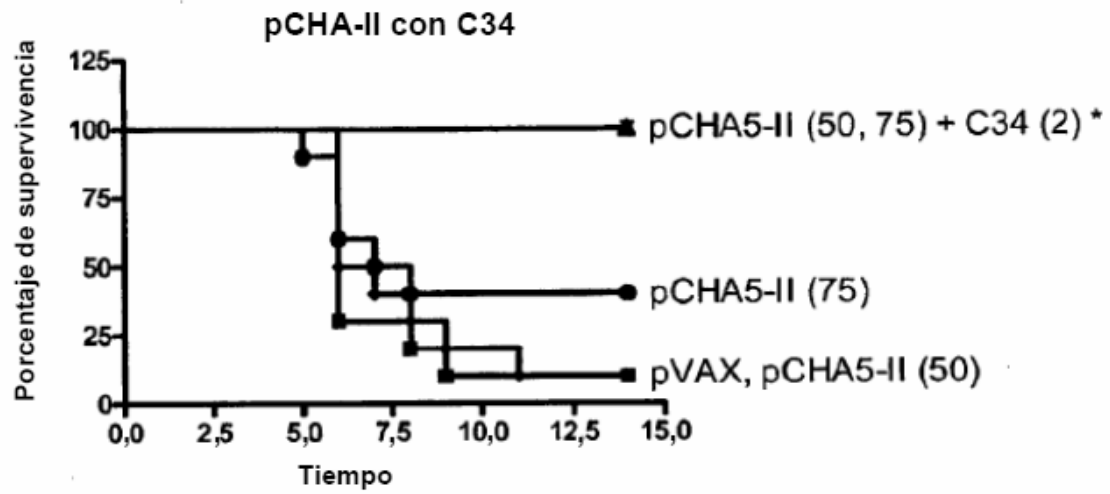


FIG. 76C

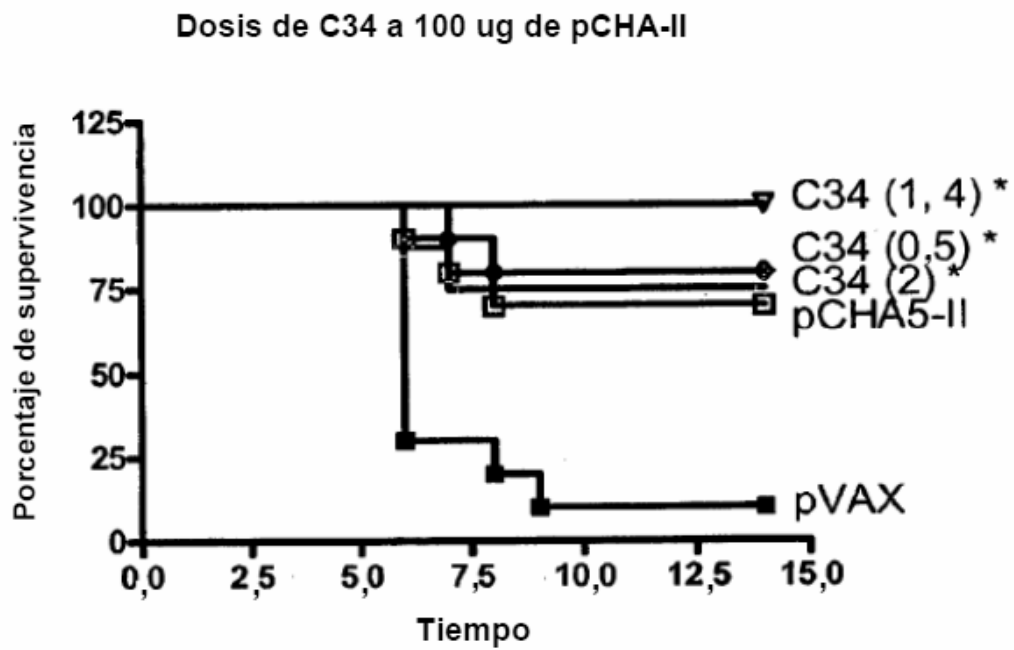


FIG. 76D

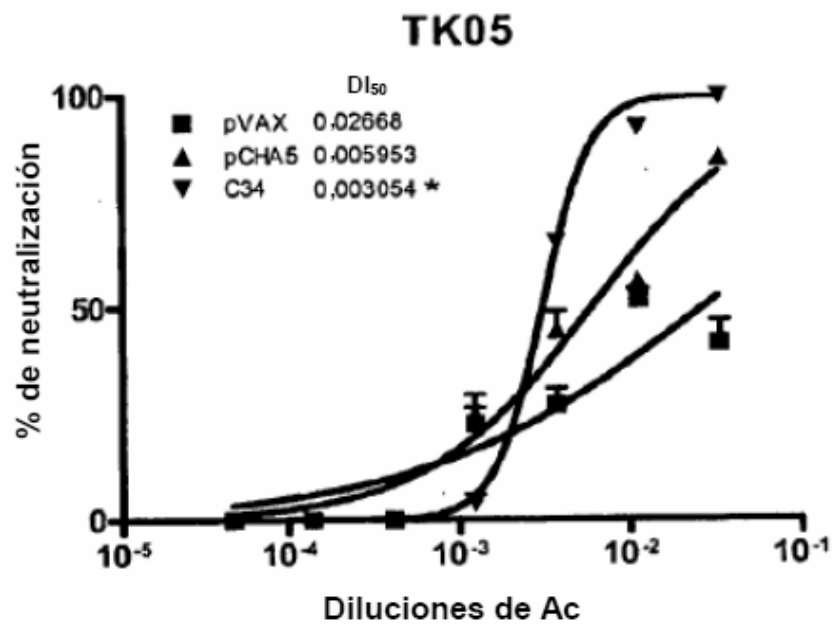


FIG. 77A

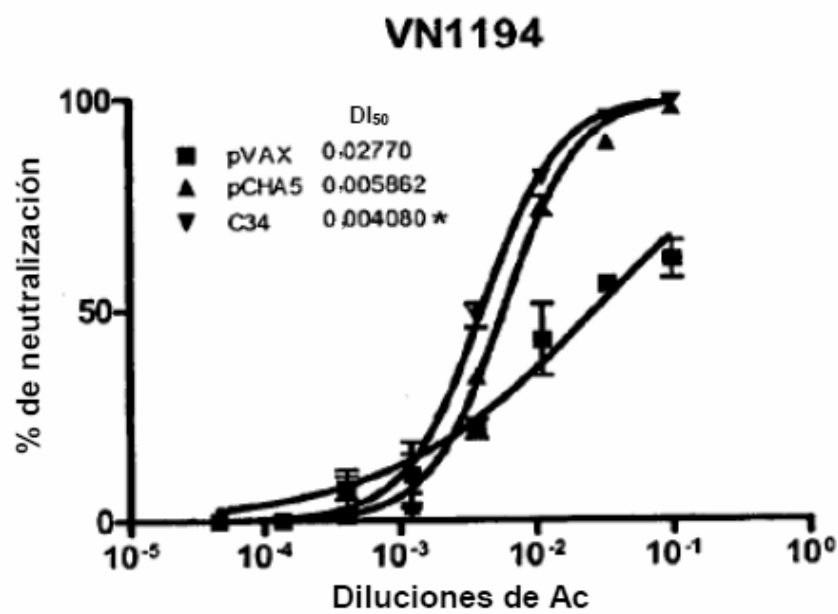


FIG. 77B

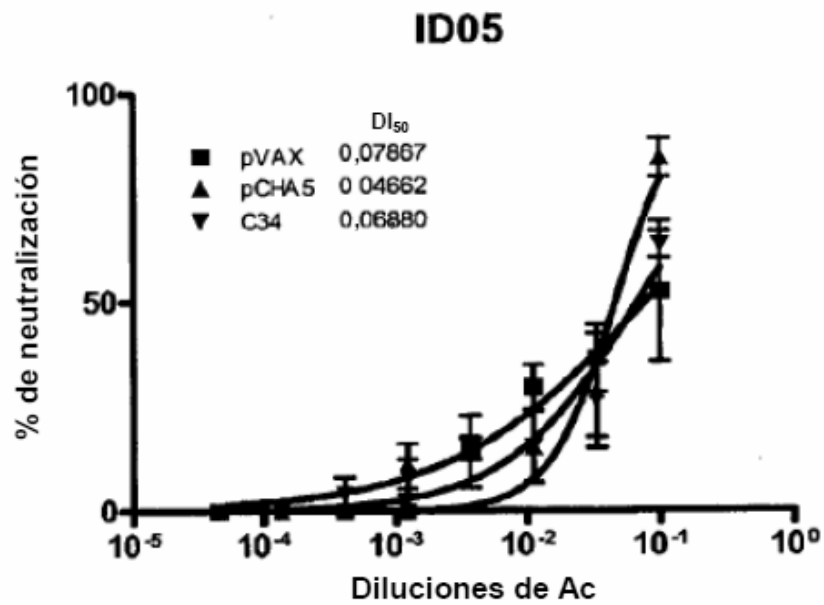


FIG. 77C

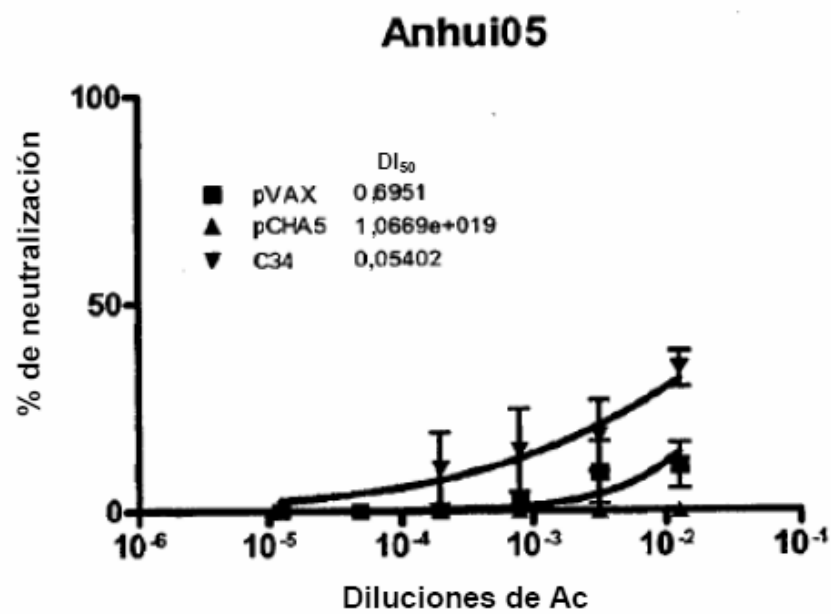


FIG. 77D

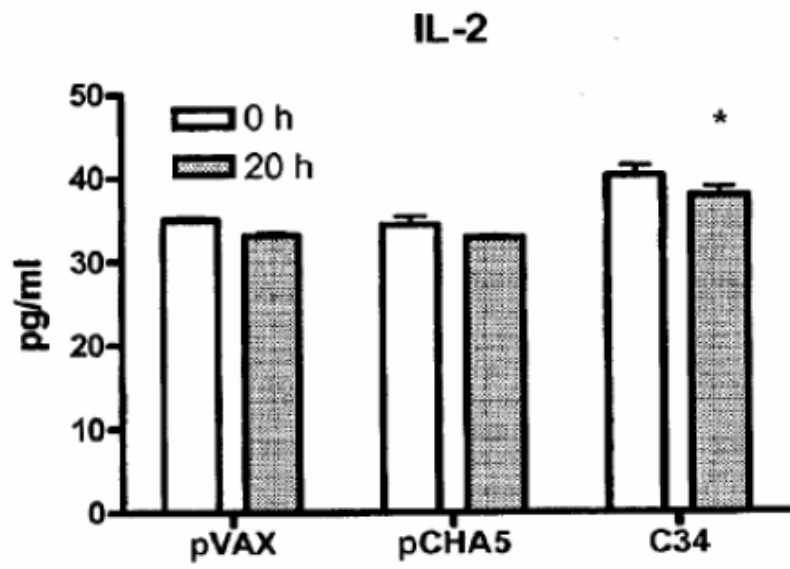


FIG. 78A

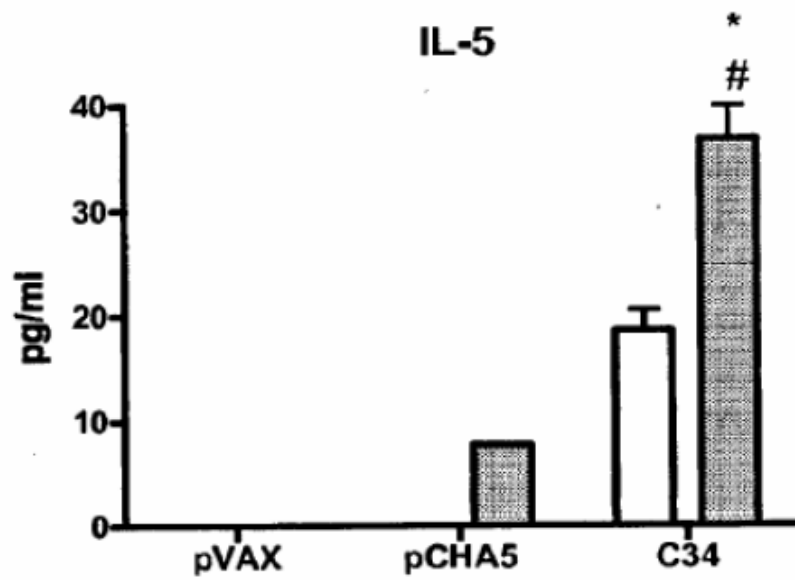


FIG. 78B

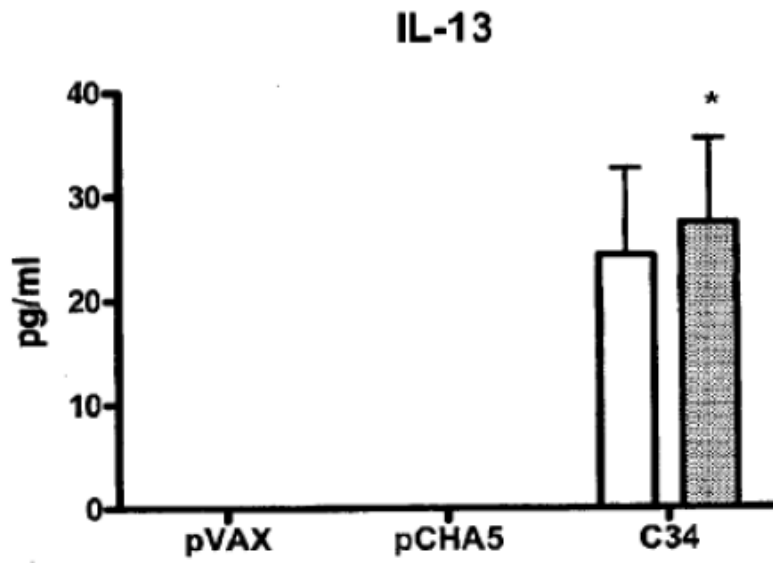


FIG. 78C

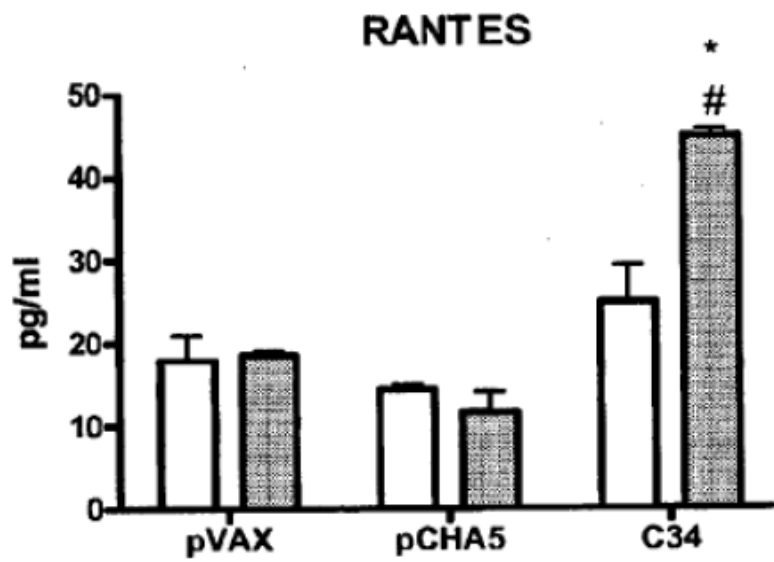


FIG. 78D

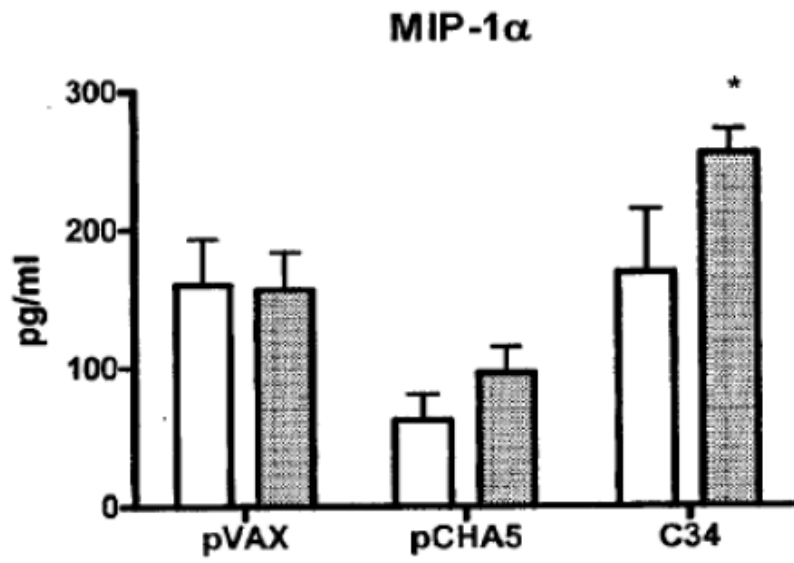


FIG. 78E

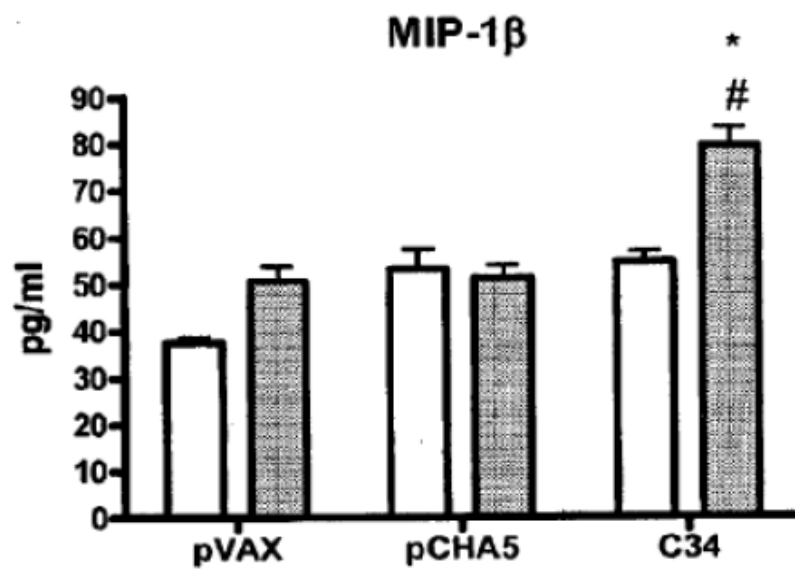


FIG. 78F

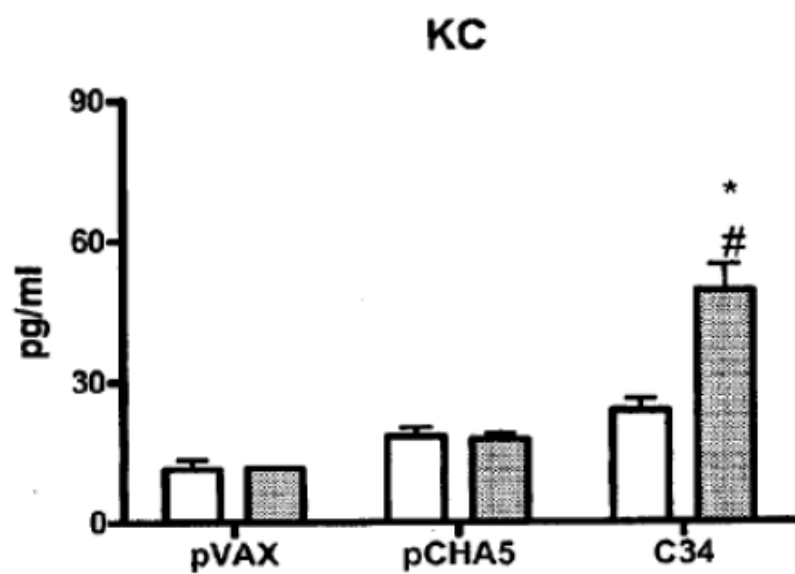


FIG. 78G

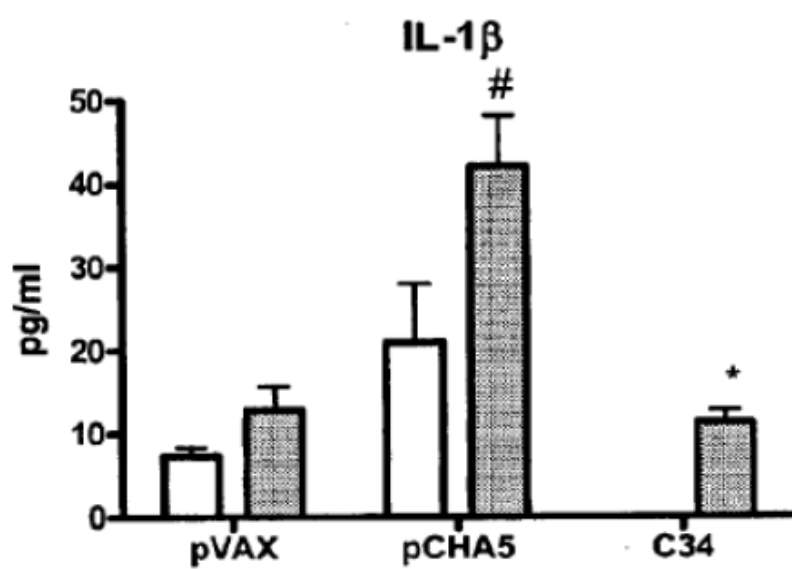


FIG. 78H

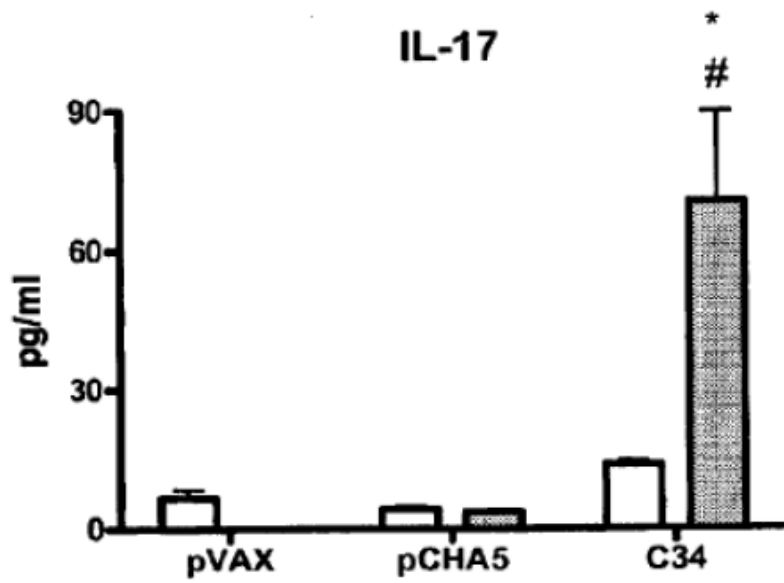


FIG. 78I

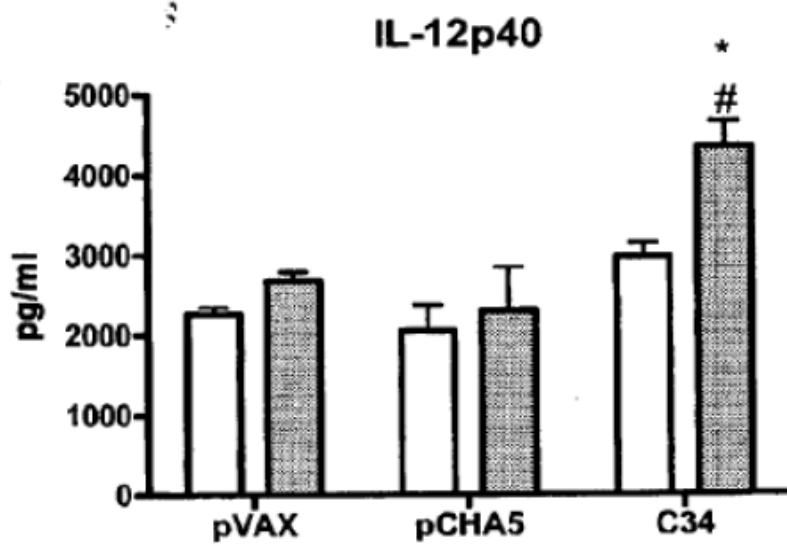


FIG. 78J

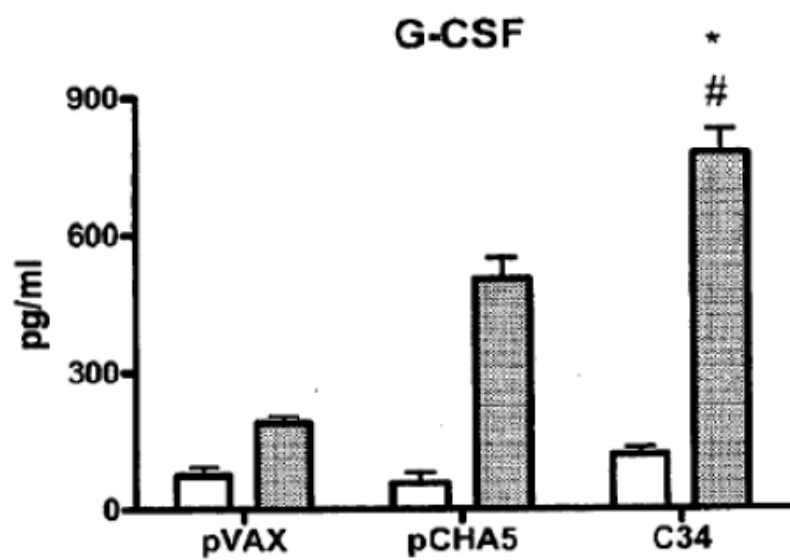


FIG. 78K

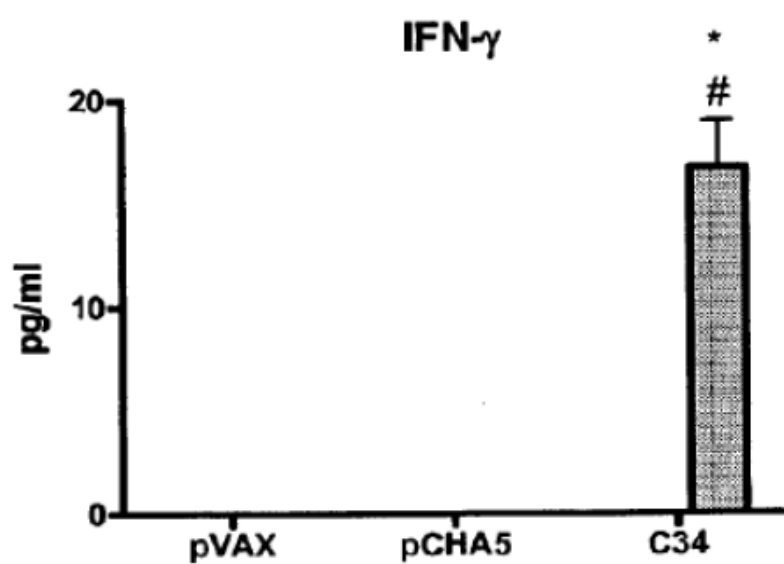


FIG. 78L

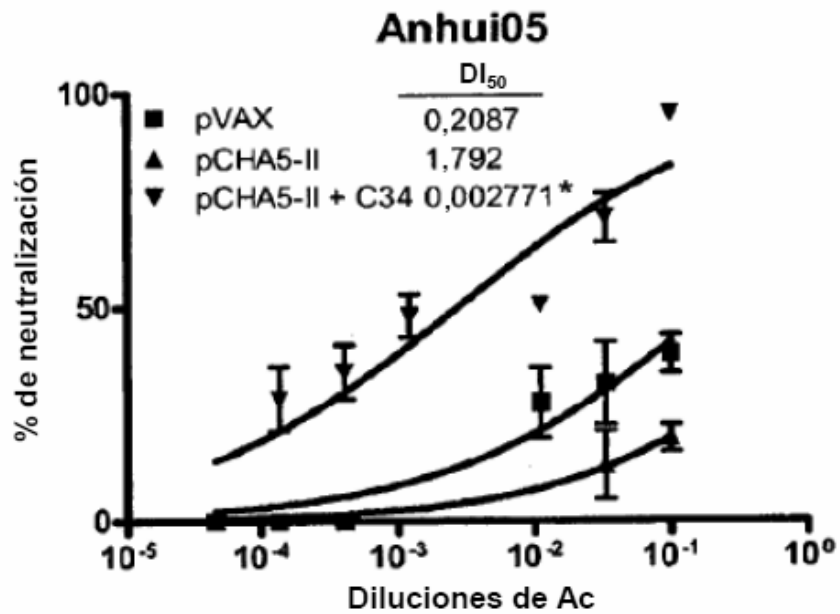


FIG 79A

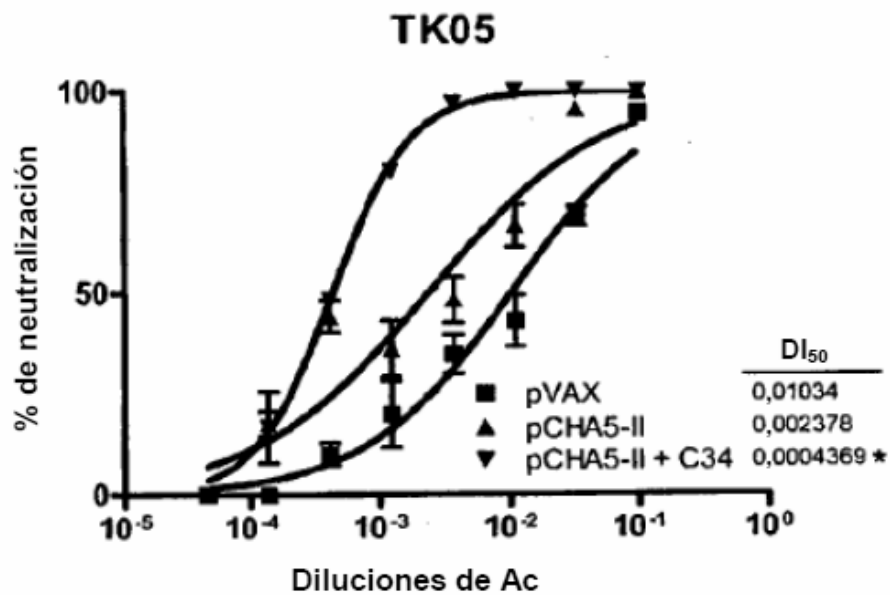


FIG. 79B

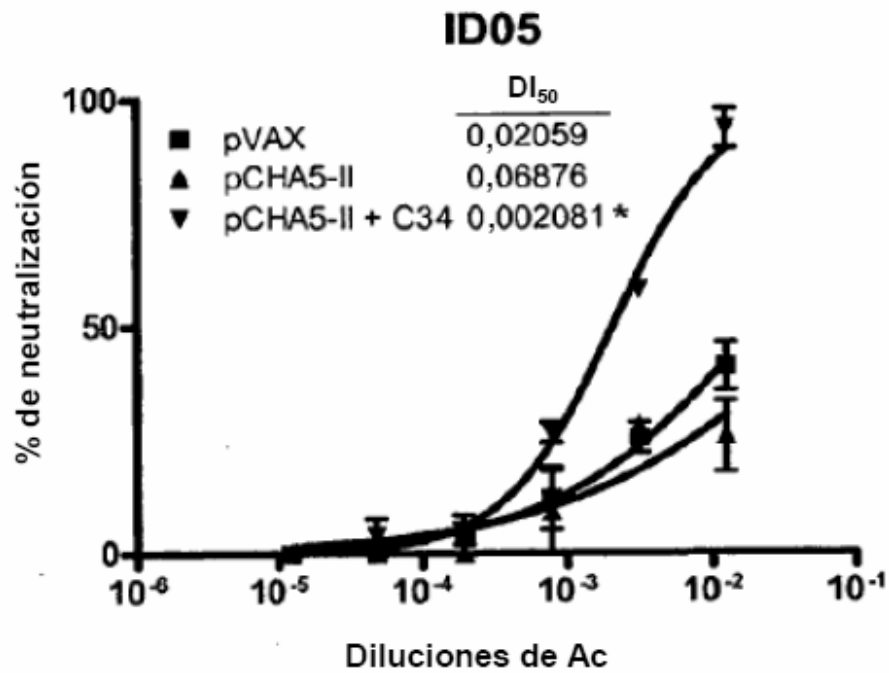


FIG. 79C

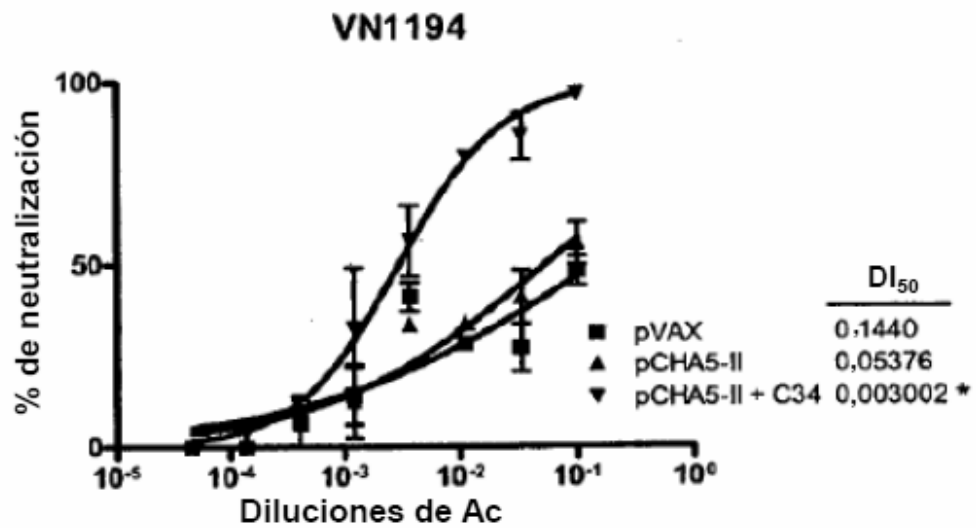


FIG. 79D

Fig. 80

