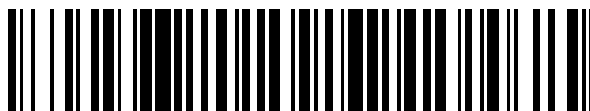


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 243**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/661 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009** **E 09835854 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2373342**

54 Título: **Miméticos del lípido A para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria**

30 Prioridad:

23.12.2008 US 140226 P

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

26.11.2015

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

JOHNSON, DAVID A.;
EVANS, JAY T.;
HUTTON, MELINDA M.;
BOWEN, WILLIAM S. y
MINNS, LAURIE A.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 552 243 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Miméticos del lípido A para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reclama beneficio de prioridad sobre la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 61/140226, presentada el 23 de diciembre de 2008.

Notificación de copyright conforme a 37 C.F.R. § 1.71(e)

Una parte de la divulgación del presente documento de patente contiene material sujeto a protección de derechos de autor. El propietario de los derechos de autor no ha presentado objeciones a la reproducción mediante copia del documento de patente o de la divulgación de patente por cualquiera, tal como aparece en el archivo o los registros de la oficina de patentes y marcas pero, por lo demás, se reserva todos los derechos de autor.

Declaración con respecto a la investigación patrocinada

Aspectos de esta invención se hicieron con el apoyo del gobierno de Estados Unidos de conformidad con el contrato nº HHSN266200400008C / N01-AI-40008 del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas; el gobierno de Estados Unidos puede tener ciertos derechos sobre la invención.

Antecedentes

Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores de reconocimiento de patrones que reconocen motivos microbianos conservados, incluyendo peptidoglicano (TLR2), CpG ADN (TLR9), ARN viral (TLR3 / 7/8), flagelina bacteriana (TLR5) y LPS (TLR4). En particular, los TLR4 se caracterizan por un dominio extracelular de repetición rico en leucina de unión a ligando y un / dominio de homología Toll-IL-1R citoplasmático (Nahori y col., 2005) que recluta adaptadores de señalización intracelulares. Se han descrito varios ligandos para TLR4, incluyendo lipopolisacárido (LPS), ácido lipoteicoico (LTA), fibronectina, la proteína fusión del RSV, taxol y el adyuvante de lípido A monofosforilo (MPL). Se han descrito dos vías de señalización principales se asocian con la activación de TLR4; las vías dependientes de MyD88 y las dependientes de TRIF.

Recientemente se ha informado de que el ligando de TLR4 MPL, un derivado de un, glicolípido destoxificado purificado de la pared celular de Salmonella Minnesota, exhibió un sesgo para la señalización dependiente de TRIF y la señalización menos dependiente de MyD88 en relación con otros antagonistas de TLR4, y se postuló que MPL puede inducir la represión activa de las vías inflamatorias dependientes de MyD88 mediante la inducción de vías de señalización adicionales corriente abajo, tal como la vía PI3-quinasa. (Mata-Haro y col. 2007).

Se proporciona un procedimiento para inducir una respuesta a TRIF relativamente sesgada que comprende administrar un isómero seleccionado de un aminoalquilo glucosaminida-4-fosfato (AGP). La inducción selectiva de la señalización dependiente de TRIF mediante el mimético sintético del lípido A como se divulga en el presente documento puede permitir el desarrollo de adyuvantes de vacuna o inmunomoduladores que alteran de forma selectiva las respuestas inmunitarias al tiempo que mitigan los efectos secundarios potencialmente tóxicos asociados con la inducción de citocinas/quimiocinas inflamatorias.

Sumario de la invención

La presente divulgación está dirigida al uso de un mimético sintético del lípido A, específicamente el compuesto AGP CRX 547, para inducir la señalización sesgada por TRIF a través del complejo de receptores TLR4. CRX 547 es el diaestereómero de AGP CRX 527. La expresión "sesgo de TRIF" se refiere a la reducción de la señalización dependiente de MyD88 de un compuesto (por ejemplo, CRX 547) respecto a la señalización dependiente de MyD88 de otro compuesto (por ejemplo, CRX527). En una realización preferida, el sesgo de TRIF proporciona una reducción de la señalización de MyD88 y mantiene o aumenta la señalización dependiente de TRIF. En otras realizaciones preferidas, la presente invención puede exhibir sesgo DE TRIF mediante la inducción de niveles significativos de citocinas que dirigen la inmunidad mediada por células Th1, IL-12, a partir de células dendríticas, *in vitro*, así como mediante la inducción mucho menor mediador inflamatorio IL-23, una citocina que favorece el mantenimiento de las células T Th17 que producen los mediadores inflamatorios, IL-17 y TNFα (Wilson y col. 2007). Las células T Th17 se han relacionado con el desarrollo de trastornos autoinmunes inflamatorios, incluyendo artritis, enfermedad inflamatoria intestinal y esclerosis múltiple (McGeachy y col. 2007).

Varias formas de realización de la presente descripción se describen brevemente en el presente documento:

un procedimiento para reducir significativamente el potencial de la señalización dependiente de MyD88 inducida por una composición que contiene el L-seril AGP CRX 527, al tiempo que induce una señalización significativa dependiente de TRIF a través del complejo receptor TLR4, que comprende la sustitución del derivado de D-seril de la L-seril AGP en la composición.

- un procedimiento de inducción de citocinas dependientes de TRIF y de reducción de los niveles de las citocinas dependientes de MyD88 inducidos en células humanas mediante una composición adyuvante del mimético del lípido A; administrando CRX547 administrar a las células humanas;
- 5 un procedimiento de inducción de niveles más bajos de IL-12p70 e IL-23 en células humanas en comparación con los niveles inducidos por L-seril AGP CRX 527, que comprende administrar a las células humanas derivados sintéticos D-seril de CRX527;
- un procedimiento de activar niveles significativamente más bajos de actividad de NF-kappa B, pero niveles iguales o superiores de IRF3 inducidos por CRX527, que comprende administrar el diastereómero D-seril de 527;
- 10 un procedimiento de inhibición de la inducción de citocinas dependientes de MyD88 por un primer mimético del lípido A que comprende administrar un segundo lípido A sintético, CRX547; y
- un procedimiento para mejorar una inducción de composiciones adyuvantes de la señalización dependiente de TRIF beneficiosa en células humanas, en el que la composición adyuvante contiene un AGP que no es CRX547, que comprende incorporar CRX547 en la composición adyuvante.
- 15 Una composición de mimético del lípido A que comprende CRX547 para su uso en la producción de una respuesta inmunitaria en un ser humano, en el que las citocinas dependientes de TRIF se incrementan y las citocinas dependientes de MyD88 disminuyen en comparación con una composición de mimético del lípido A en ausencia de CRX547;
- una composición de mimético del lípido A que comprende CRX547 para su uso en la producción de una respuesta inmunitaria en un ser humano, en el que la actividad de NF-κB está disminuida pero se observan niveles iguales o más altos de IRF3 en comparación con una composición de mimético del lípido A en ausencia de CRX547;
- 20 una composición de mimético del lípido A que comprende CRX547 para su uso en la producción de una respuesta inmunitaria en un ser humano, en el que las citocinas dependientes de TRIF se incrementan y las citocinas dependientes de MyD88 disminuyen en comparación con una composición de mimético del lípido A en ausencia de CRX547;
- 25 Un adyuvante mimético del lípido A para su uso con un antígeno en la producción de una respuesta inmunitaria en un ser humano, en el que las citocinas dependientes de TRIF se incrementan y las citocinas dependientes de MyD88 disminuyen en comparación con un adyuvante mimético del lípido A en ausencia de CRX547;
- 30 Composiciones de mimético de lípido A que comprenden CRX527 y CRX547 para su uso en cualquiera de los procedimientos como se describe en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1.** CRX-527 y CRX-547 y aminoalquilglucosaminida 4-fosfatos con cadenas de acilos grasos unidos a éster, CRX-527 y CRX-547
- 35 **Figura 2.** Comparación de los miméticos de lípido A, CRX-527 y CRX-547 con *S. minn.* LPS de Re595 para la inducción de citocinas y quimiocinas (A) dependientes de MyD88 y (b) dependientes de TRIF en PBMC humanos.
- Figura 3.** Inducción de (A) IL-12p70 y (B) IL-23, mediante tratamiento de células dendríticas derivadas de monocitos humanos con *S. minn.* LPS de Re595, CRX-527 y CRX-547.
- 40 **Figura 4.** Inhibición de la inducción de citocinas/quimiocinas (A) dependientes de MyD88- y (B) dependientes de TRIF en una línea celular de macrófagos humanos mediante la transfección de plásmidos que expresan construcciones negativas dominantes de MyD88 (MyD88-DN) y TRIF (TRIF-DN).
- Figura 5.** Citocinas/quimiocinas (A) dependientes de MyD88 (MIP-1α) y (B) dependientes de TRIF (RANTES) inducidas por CRX-527, CRX-547 y LPS en presencia del inhibidor de la endocitosis, Dynasore.
- 45 **Figura 6.** Estrategia de acotamiento ImageStream.
- Figura 7.** Las células monocíticas humanas (MM6) se trataron durante 5, 15, 30, o 120 minutos con CRX-527 o CRX-547 y la translocación nuclear de NFκB se cuantificó como colocalización del factor de transcripción con el pigmento nuclear (DRAK-5).
- 50 **Figura 8.** Comparación de la actividad del promotor inducible NF-κB cuando las células HEK293 transfectadas con huTLR4/huMd-2/huCD14 se tratan con *S. minn.* LPS de Re595, CRX-527, y CRX-547.

	Figura 9.	Inhibición de CRX-527 y LPS (A) dependiente de MyD88 e (B) inducción de citocinas/quimiocinas dependientes de TRIF en presencia de concentraciones crecientes de CRX-547.
5	Figura 10.	(A) Inhibición de TNF α inducida por CRX-527 mediante la adición de concentraciones crecientes de CRX-547. (B) El análisis de regresión de Schild da una estimación de la afinidad de CRX-547 (0,33 nM) similar a las CE ₅₀ de CRX-527 y CRX-547.
	Figura 11.	Inhibición de la inducción de citocinas dependientes de MyD88 (TNF α) por CRX527 y LPS en presencia de concentraciones crecientes de CRX547.
	Figura 12.	Inhibición de la translocación nuclear de NF κ B inducida por CRX527 en presencia de concentraciones crecientes de CRX547.
10	Figura 13.	Efectos de la modificación potenciadora de la estabilidad de CRX-527/CRX-547 sobre la actividad de señalización y la inducción de quimiocinas. Comparación de (A) señalización de NF κ B en células HEK293 transfectadas con huTLR4/huMD-2/huCD14 y (B) inducción de MIP-1 β dependiente de MyD88 en células monolíticas humanas (MM6) por los pares de isómeros L y D CRX-527/CRX-547 y 1a/1b
15	Figura 14.	Análisis de transferencia Western de monocitos primarios humanos derivados de PBMC tratados con CRX-527 que muestran una cinética y niveles de activación similares de fosfo-IRF3 aguas abajo de TRIF y mayor degradación de IRAK1 aguas abajo de MyD88 que las células estimuladas con CRX-547
20	Figura 15.	Análisis de transferencia Western de MM6 tratadas con CRX-527 que muestran mayor degradación de IRAK4 aguas abajo de MyD88 que las células estimuladas con CRX-547
	Figura 16.	Comparación de (A) señalización de NF κ B en células HEK293 transfectadas con huTLR4/huMD-2/huCD14 y (B) inducción de MIP-1 β dependiente de MyD88 en células monolíticas humanas (MM6) por los pares de isómeros L y D, compuestos 2a y 2b.
25	Figura 17.	Inducción de la actividad promotora dependiente de NF κ B por CRX-527, CRX-547, y LPS en las células HEK293 transfectadas con TLR4/MD-2/CD14 humano (arriba) y de ratón (abajo).
	Figura 18.	Inducción de la actividad promotora dependiente de NF κ B en las células HEK293 transfectadas con TLR4/MD-2 de ser humano/ratón afín o combinaciones quiméricas (huTLR4/muMD2 o muTLR4/huMD-2).
	Figura 19.	Cambio en el peso en conejos tratados con los agonistas indicados
30	Figura 20.	Temperatura posvacunación en conejos tratados con el agonista indicado
	Figura 21.	Reactividad en el lugar de la inyección por Draize en conejos tratados con los agonistas indicados
	Figura 22.	Histopatología en el sitio de inyección en conejos tratados con los agonistas indicados. Cambio de peso en conejos tratados con los agonistas indicados
35	Figura 23.	Inducción de la expresión de genes de citocinas/quimiocinas (A) dependientes de MyD88 y (B) dependientes de TRIF en monocitos derivados de PBMC humanos tras el tratamiento con CRX-527 o CRX-547 0,01 μ M
	Figura 24.	PBMC de ratones BALB/c analizados con CRX-547 (dos lotes) y CRX-527 (experimento realizado una vez).
	Figura 25.	Inducción de dependientes de TRIF (IP-10) por CRX-527, CRX-547, Compuesto 1a y 1b
40	Figura 26.	Inducción de citocinas/quimiocinas dependientes de MyD88 (TNF α) por CRX-527, CRX-547, Compuesto 1a y 1b
	Figura 27.	Niveles de TNF α después de cuatro horas de estimulación con AGP y sus isómeros D.
	Figura 28.	Niveles de IP-10 después de cuatro horas de estimulación con AGP y sus isómeros D.
45	Figura 29.	Análisis de transferencia tipo Western de las proteínas de señalización tras estimulación con CRX-547 y CRX-527 en células RAW264.7
	Figura 30.	Células RAW264.7 transfectadas de forma estable
	Figura 31.	Producción de IP-10 tras 20 horas de estimulación con los isómeros L y D (líneas celulares de ARNip en comparación con el control irrelevante en cada experimento).

Figura 32. Producción de IP-10 tras 20 horas de estimulación con los isómeros L y D (líneas celulares de ARNip en comparación con el control irrelevante en cada experimento).

Figura 33. Producción de TNF α después de 20 horas de estimulación con los isómeros L y D

Figura 34. Producción de TNF α después de 20 horas de estimulación con los isómeros L y D

5 **Figura 35.** ARNip de líneas celulares RAW264.7 Siria estimuladas durante 4 horas con CRX-527, CRX-547, Compuestos 1a y 1b para la producción de TNF α

Descripción detallada

INTRODUCCIÓN

10 El lípido A es el motivo estructural hidrofóbico activo dentro de la molécula de LPS que se une al complejo receptor TLR4/MD-2 unido a la membrana. Las estructuras de lípido A pueden mostrar una considerable variabilidad entre especies bacterianas. Especies gramnegativas individuales pueden modular la estructura del lípido A en su superficie, dando lugar a diferentes grados de inflamación (Bishop y col., 5071 – 80; Guo y col., 189 – 98). Se ha demostrado que los cambios en el número y la longitud de las cadenas acilo y el patrón de fosforilación se alteran drásticamente la actividad de las moléculas de lípido A desde agonistas altamente potentes a antagonistas {Hawkins, 2002 30067 /id, Stover et al, Seydel y col. 2000}. La toxicidad de la mayoría de especies de LPS se determina mediante la interacción de la parte de lípido A con el complejo receptor TLR4 (Baker y col., 1992). Se ha demostrado que las diferencias en el número de cadenas de acilo, la longitud y disposición, así como el número y posición de grupos cargados afectan significativamente tanto al nivel como al carácter de la respuesta inmunológica al lípido A (Teghanemt y col., 2005, Stover y col. 2004, Schromm y col., 1998). El diseño y la síntesis de una biblioteca de monosacáridos, miméticos de lípido A, los fosfatos de aminoalquilglucosaminida (AGP), con actividad agonista y antagonista de TLR4 también se han descrito (Stover y col., 4440 – 49; Persing y col., S32–S37; Johnson y col., 2273 – 78).

25 Como se mencionó anteriormente, se han descrito dos vías principales de señalización después de la activación de TLR4 por un agonista de TLR4; las vías dependientes de MyD88 y dependientes de TRIF. La señalización dependiente de MyD88 depende de la unión secuencial o simultánea de las proteínas adaptadoras que contienen el dominio receptor de interleucina-1/Toll (TIR), Mal / TIRAP y MyD88, al dominio TIR de TLR4 (Fitzgerald y col. 2001). La señalización dependiente de TRIF requiere la unión secuencial o simultánea de las proteínas adaptadoras que contienen el dominio TRAM/TICAM-2 y TRIF/TICAM-1, Al dominio TLR4-TIR (Rowe y col., 6299 – 304; Yamamoto y col., 1144 – 50). Ambas vías están involucradas en la conexión entre la inmunidad innata y adaptativa (Kawai y col. 2001, Kaisho y col., 2001).

35 Aguas abajo de la interacción lípido A-receptor, las vías de señalización específicas dependientes de TLR4, (las vías dependientes de MyD88 y dependientes de TRIF) determinan la respuesta celular a la unión al receptor. La señalización dependiente de MyD88 favorece una respuesta inflamatoria, caracterizada por la síntesis y secreción de mediadores inflamatorios tales como TNF α e IL-1 β (Huang y col. 2004). La señalización a través de la vía dependiente de MyD88 induce la activación precoz de NF- κ B y la liberación de citocinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina (IL) -1 β y la quimiocina, MIP-1 α .

40 La señalización dependiente de TRIF favorece la producción de mediadores inmunitarios, tales como los IFN tipo 1, algunos miembros de la familia de IL-12 y quimiocinas que inducen la maduración de las células dendríticas e influyen sobre la maduración de las células T. Señalización a través de la vía dependiente de TRIF induce la activación, menor y más tarde, pero más sostenida, de NF- κ B (Hoebe y col., 743 – 48) que sí señala a través de la vía de MyD88 e induce la activación y la translocación nuclear de los factores de regulación del interferón (IRF)-3 e IRF-7 (Kawai y col., 5887 – 94). La activación de IRF-3 y IRF-7 dirige la transcripción de IFN β y su posterior liberación extracelular. La unión autocrina o paracrina de IFN β al receptor de IFN- α/β , a su vez, activa la vía de JAK / STAT, lo que lleva a una mayor expresión de IFN α e IFN β , así como a quimiocinas inducibles por IFN tales como la proteína 10 inducible por interferón (IP-10), regulados en la activación de T normales expresadas (RANTES) y la proteína-1 quimiotáctica de macrófagos (MCP-1) (Yamamoto y col. 2003, Kawai y col. 2001, Serbina y col. 2003).

50 La mayoría de los AGP señalan a través de vías dependientes tanto de MyD88 como de TRIF. Recientemente se ha determinado que el D-seril AGP único e interesante, CRX-547, señala predominantemente a través de la vía dependiente de TRIF. Esto contrasta con su estereoisómero, el L-seril AGP, CRX-527, que estimula las vías dependientes tanto de MyD88 como de TRIF. Dado que la vía de MyD88 está asociada con la inducción de citocinas inflamatorias, mientras que la vía dependiente de TRIF conduce a la producción de interferones de tipo I, el uso de la vía de TRIF y la evitación de la vía de MyD88 pueden afectar tanto a la eficacia como a la seguridad de los agonistas de TLR4 cuando, por ejemplo, se usan como adyuvantes. Un incremento relativo de la señalización de TRIF puede conducir a una mayor inmunidad mediada por células, mientras que una disminución relativa de la señalización dependiente de MyD88 podría conducir a una seguridad mejorada (menor inducción de inflamación) y, por tanto, un índice terapéutico mejor para el isómero D-seril con respecto al isómero L-seril.

TÉRMINOS

A menos que se explique de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que le dan aquellos entendidos en la técnica a los que concierne esta divulgación. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0 – 19 – 854287 – 9); Kendrew y col., (eds), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd; 1994 (ISBN 0632-021829); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1 – 56081 – 569 – 8).

Las formas del singular “un”, “uno” y “el/la” incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De un modo similar, con la palabra “o” se pretende incluir “y”, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término “pluralidad” se refiere a dos o más. Además debe entenderse que todos los tamaños de las bases o los tamaños de los aminoácidos y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, proporcionados para ácidos nucleicos o polipéptidos, son aproximados y se proporcionan para descripción. Adicionalmente, las limitaciones numéricas dadas con respecto a las concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno, se pretende que sean aproximadas. Por tanto, cuando se indica que una concentración es al menos (por ejemplo) 200 pg, se pretende entender que la concentración sea al menos aproximadamente (o “aproximadamente” o “~”) 200 pg.

Aunque se pueden usar materiales y procedimientos similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o realización de pruebas de esta divulgación, se describen más adelante materiales y procedimientos adecuados. El término “comprende” significa “incluye”. Por tanto, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entiende que la palabra “comprende” y variaciones tales como “comprenden” o “que comprende” implica la inclusión de un compuesto o composición indicado (p. ej., ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o etapa o grupo de compuestos o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro compuesto, composición, etapas o grupos de los mismos. La abreviatura, “e. g” (p. ej.) deriva del latín *exempli gratia* y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por tanto, la abreviatura, “e. g” (p. ej.) es sinónimo de la expresión “por ejemplo”.

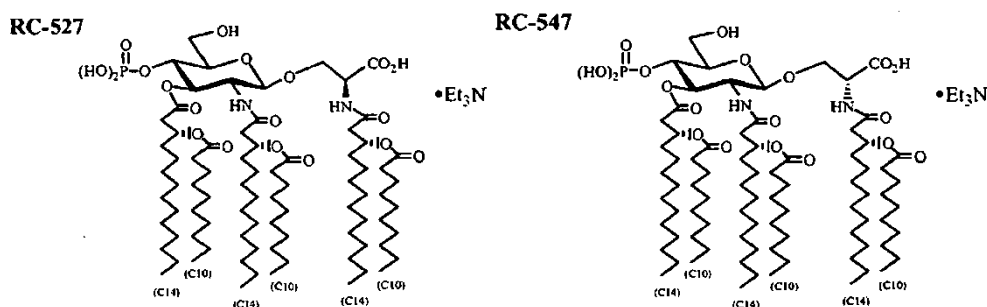
“Mimético de lípido A” es un ligando de TLR4 que induce la señalización de TRIF y o MyD88 a través del receptor TLR4 (por ejemplo MPL y AGP).

“Sesgo de TRIF” significa menores niveles de señalización dependiente de MyD88 por un compuesto en comparación con otro.

Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación se proporcionan las siguientes explicaciones de términos. Se pueden proporcionar términos y explicaciones adicionales en el contexto de esta divulgación.

Aminoalquilglucosaminida 4-fosfatos

Brevemente, los seril AGP CRX 527 y CRX 547 son una clase de compuestos miméticos del lípido A en el que el azúcar reductor de lípido A se ha reemplazado con una unidad aminoalquilo basada en – o D-serina, así como tres restos de (*R*)-3-*n* –alcanoiloxitetradecanoilo compuestos por cadenas de acilo grasos normales de 10 carbonos. Los AGP se preparan como se ha descrito anteriormente mediante un procedimiento altamente convergente, que permite la diferenciación química de los grupos hidroxilo y amino y la introducción secuencial de los restos de (*R*)-3-*n* –alcanoiloxitetradecanoilo. (Véase Bazin y col., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008 18, 5350; Johnson et al Bioorg. Med. Chem. Lett 9 1999 2273; publicación de patente WO 04/005308). Los seril AGP purifican mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (hasta una pureza > 95%) y se analizan como sus sales de trietilamonio mediante procedimientos analíticos estándar.



CRX527 y CRX547 también mostrados en la Fig. 1 y se han sintetizado y se ha descrito previamente (véase la patente de EE.UU. N° 6.113.918; Ejemplos 15 y 16, y LOS DOCUMENTOS WO 2006/012425 WO 2006/016997). La diferencia estructural en CRX547 afecta a la posición del grupo carboxilo aglicona en relación con la de CRX527. La diferencia puede afectar a la interacción del grupo carboxilo cargado con el complejo receptor TLR4. Anteriormente

se ha demostrado que los miméticos de LPS interaccionan con el complejo receptor TLR4 a través MD2 (Ohto y col. 2,007), por lo tanto, es posible que la diferencia diaestereomérica entre CRX547 y CRX 527 puede interrumpir las interacciones del grupo carboxilo, un bioisostere fosfato del lípido A, con MD-2 o TLR4. Esto, a su vez, podría afectar a la dimerización del receptor o, como alternativa, a un cambio conformacional intracelular a favor de la unión de MyD88 y la señalización aguas abajo. Presumiblemente, esta interrupción o cambio no elimina la señalización dependiente de TRIF.

Estructuras cristalinas de la TR4 / MD-2 / lipidIVa humano (Ohto y col., (2007) Science. 316:1632) y el receptor TLR4/MD-2/Eritoran humano recién publicadas sugieren que el grupo fosfato en la posición uno del azúcar reductor de estos miméticos del lípido A interacciona con los grupos cargados cerca de la abertura del bolsillo de unión hidrofóbico MD2 para el lípido A. Los modelos estructurales de la dimerización TLR4/MD-2 con un segundo complejo TLR4/MD-2 (Kim y col., 906 – 17; Walsh y col., 1245 – 54) sugiere que este lado del complejo MD-2/lípido A puede interaccionar con el TLR4 de la pareja dimérica. El grupo carboxilo bio-isostérico de CRX527 puede mantener estas interacciones, mientras que el cambio al CRX547 diastereomérico podría interrumpirlas, lo que potencialmente induce diferencias en la señalización.

Se observa que MPL, cuando se analiza, mostraba los mismos patrones de señalización dependiente de MyD88 y de TRIF como CRX547 y MPL carece de un fosfato en la misma posición afectada por el cambio estructural en CRX547. Por lo tanto, MPL y CRX547 pueden compartir un mecanismo común para la inducción de la señalización dependiente de TRIF en ausencia de señalización dependiente de MyD88 sustancial.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Los materiales y procedimientos descritos en el presente documento son útiles en la realización de los ejemplos proporcionados a continuación.

Línea celular y reactivos

La línea celular HEK293 que expresa el TLR4 humano, MD-2 y CD 14, los plásmidos indicadores NF- κ B / LacZ, los plásmidos que expresan MyD88 negativos dominantes (pDeNy-hTRIF) y que expresan TRIF negativos dominantes (pDeNy-hTRIF), el reactivo de transfección LyoVec y Re595 LPS ultrapuro de *S. minnesota* se obtienen de InvivoGen. La línea celular de monocitos / macrófagos humanos, THP-1, se puede obtener de la ATCC. El reactivo de transfección Eugene 6 se puede obtener de Roche. Las células HEK293-hTLR4/hMD2/hCD14 de InvivoGen (San Diego, CA) se cultivan en medio RPMI 1640 (ATCC) con 10% de FBS (Hyclone) con 10 μ g/ ml de blasticidina y 50 μ g/ ml de HygroGold (InvivoGen). Las células THP-1 se cultivan en medio RPMI 1640 (ATCC) con 10% de FBS (Hyclone) y 100 U/ ml de penicilina/100 μ g/ ml de estreptomycin (Sigma).

Cultivo primario de células humanas

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de la sangre de donantes sanos por medio de un gradiente de Ficoll Hypaque 1,077 y se tratan con agonistas o se utilizan para aislar los monocitos adherentes en medios de monocitos (RPMI 1640 (ATCC), 10% de suero AB humano (Lonza / BioWhittaker), 100 U / ml de penicilina / 100 μ g / ml de estreptomycin (Sigma), 2-mercaptoetanol 50 μ M (Sigma) como se ha descrito (Stover y col., 4440 – 49; Kawai y col., 5887 – 94; Gervasi y col., 7231 – 39). Los macrófagos derivados de monocitos se producen mediante la incubación de monocitos adherentes durante 5 días en medios de monocitos con 50 ng / ml de rhM-CSF (R & D Systems) con cambios de medio el día 3 y el día 5 antes del tratamiento con agonistas. Las células dendríticas derivadas de monocitos (DC) se producen mediante la incubación de monocitos adherentes durante 7 días en medio de monocitos con 10 ng / ml de rhGM-CSF y 10 ng / ml de rhIL-4 (R & D Systems) con cambios de medio el día 3 y el día 6.

Translocación nuclear de NF κ B

Las células MonoMac6 en crecimiento exponencial se estimulan con concentraciones crecientes de AGP diluidas en 2% de glicerol vehículo durante los puntos de tiempo indicados. Las células fijadas inmediatamente (en 2% de paraformalina durante la noche) se tiñen con los anticuerpos primarios, anti-NF κ B (p65) (SantaCruz Biotecnología, SantaCruz, CA) y anti-IRF3 (BD Biosciences, San José, CA), en tampón de permeabilización (PBS , 2% de SFB, 0,1% de Triton X) seguido de anticuerpos secundarios, anti-conejo FITC (Jackson Labs, Bar Harbor, ME), anti-ratón PE (BD Biosciences, San José, CA). Se usan puntuaciones de similitud de la señalización de la localización de la proteína con la tinción nuclear DRAQ5 (Alexis Biochemicals (Diego, CA) para el análisis mediante ImageStream de translocación nuclear como se ha descrito previamente {George, 2006 32669 / id}. Se recoge un mínimo de 3000 células y se analizan para cada condición analizada.

MyD88 y TRIF dominantes negativos

Las células THP-1 se siembran en placas de 12 pocillos (5 x 10⁵ células / pocillo) y se incuban en 0,5 ml de RPMI 1640 (ATCC) con 100 U / ml de penicilina / 100 μ g / ml de estreptomycin (Sigma) con 20 ng / ml de ácido forbol mistérico (PMA) (InvivoGen) para la diferenciación en macrófagos. Después de la diferenciación de las THP-1, el medio se cambia a medio para THP-1 con 5 ng / ml de PMA y las células se transfectan transitoriamente con 0,5 μ g /

pocillo de los plásmidos pDeNy-hMyD88 / LacZ, pDeNy-TRIF / LacZ, o pUNO-mcs (control) / LacZ y el reactivo de transfección Eugene 6 durante 48 horas. El medio se cambia por medio fresco y después se estimulan las células con las concentraciones indicadas de los agonistas de TLR4 durante 14 horas. Los sobrenadantes cosechados se analizan para determinar los niveles de citocinas mediante ELISA de tipo sándwich multiplexado (R & D Systems) con la plataforma Luminex. Los pocillos de control se analizan para determinar la eficacia de la transfección usando el kit de cuantificación de LacZ de Invivogen.

Eliminación de ARNip de MyD88 y TRIF (MAL/TRAM)

Las crecimiento exponencial se transfectan de forma establemente con FuGene 6 mediante procedimientos convencionales en Optimem (Roche, Indianaopolis IN) con plásmidos psiRNA-mTICAM1, psiRNA-mMyD88, o psiRNA-LUC (control irrelevante) que contienen secuencias de ARNhp de eliminación de proteínas, un gen de resistencia a ceocina y una secuencia de codificación de GFP (InvivoGen, San Diego, CA). La eficacia de transfección después de la selección está determinada por las células positivas a GFP en porcentaje utilizando el ImageStream.

Transfecciones de HEK293

Las células HEK293-hTLR4/hMD2/hCD14 se siembran en placas de 12 pocillos (4×10^5 células / pocillo) y se cultivan hasta 40-60% de confluencia (2-3 días). Las células se transfectan durante 24 horas con 100 ng de la construcción indicadora de NF- κ B que expresa fosfatasa alcalina embrionaria humana secretada bajo el control de un promotor de ELAM modificado por ingeniería con cinco sitios de NF- κ B (pNiFty2-MAR-Invivogen; San Diego, CA) y un plásmido de control de la transfección que expresa constitutivamente una luciferasa dirigida por un promotor de la timidina quinasa (Promega). Los plásmidos se preparan con el kit Endofree Maxiprep Plasmid de Qiagen. Después de la transfección, las células se estimulan durante 14 horas con agonistas de TLR4, y el sobrenadante aclarado se analiza para determinar la actividad de SEAP (SEAP kit de ensayo del indicador-InvivoGen) para cuantificar la activación de NF- κ B y la actividad de luciferasa (Promega) para normalizar la eficiencia de la transfección siguiendo los protocolos suministrados.

Dependencia de la señalización de CRX-547 sobre la endocitosis: Inhibición de Dynasore

Los macrófagos THP-1 diferenciados (5E5 / pocillo en placas de 48 pocillos con 20 ng / ml de PMA) se pre-tratan con Dynasore 10 μ M, un inhibidor de molécula pequeña de la endocitosis durante 60 minutos en medio THP-1 si suero. El medios se cambia a 0,45 ml de medio de THP-1 antes de la estimulación durante 8 horas con las concentraciones especificadas de los agonistas. Se recogen los sobrenadantes y se almacena a - 80 °C antes del análisis de citocinas / quimiocinas mediante ELISA de tipo sándwich multiplex (R & D Systems) utilizando la plataforma Luminex.

Análisis de transferencia de tipo Western

Para el análisis de proteínas mediante transferencia de tipo Western y fosfo-Western, las células se lisan con tampón de lisis celular (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) con un cóctel de inhibidores de la proteasa (Sigma, St. Louis MO). La transferencia de tipo Western sobre membranas de PVDF (Millipore) se lleva a cabo utilizando procedimientos estándar. Las bandas se detectan con el kit ECL Advance Western Blot (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El anticuerpo secundario anti-conejo HRP se puede obtener de KPL, (Gaithersburg, MD). Los anticuerpos Anti- β actina, anti-IRF-3, anti-fosfo-IRF-3 (Ser396) y anti-IRAK1 se obtienen de Cell Signaling Technology (Danvers, MA).

Inducción de citocinas / quimiocinas en suero en ratones

Los ratones BALB / c o C57B1 / 6 hembra se obtienen de Charles River Laboratories, EE. UU. y tienen de 7 a 9 semanas de edad cuando se inician los experimentos. A los ratones se inyectan por vía intraperitoneal 200 μ l de agonista en el vehículo (0,2% de glicerol) o vehículo solo. Las muestras de suero se extraen a las 2 o 6 horas de la inyección y se analizan para determinar la inducción de citocinas / quimiocinas mediante ELISA de tipo sándwich multiplex (Invitrogen) en la plataforma Luminex. Todos los animales se utilizan de acuerdo con las directrices establecidas por el Servicio de Salud Pública y el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional de GlaxoSmithKline Biologicals, Hamilton, Montana.

Toxicología en conejos

Grupos de tres conejos (NZW-Western Oregon Rabbit Company, Philomath, OR) son vacunados con 1 ml de AGP, diluido o MPL control, por vía i.m. los días 0, 7 y 14. Se evalúan dos dosis de AGP. Se vigila en todos los animales el peso corporal, la temperatura, el estado clínico y la puntuación de Draize. Se sacrifica a los animales una semana después de la administración final. La sangre se recoge antes del tratamiento, dos días después de la 2ª vacunación y tras el sacrificio para analizar la hematología y la bioquímica clínica. La histopatología de los puntos de inyección y los órganos principales se lleva a cabo de acuerdo con las prácticas estándar. Todos los animales se utilizan de acuerdo con las directrices establecidas por el Servicio de Salud Pública y el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional de GlaxoSmithKline Biologicals, Hamilton, Montana.

Ejemplos

Ejemplo 1: *Niveles similares de citocinas dependientes de TRIF, pero niveles mucho más bajos de citocinas dependientes de MyD88 mediante la administración del isómero D de un mimético sintético de lípido A (CRX547) con respecto al isómero L (CRX527).*

- 5 Cuando se comparan los efectos de Re595 LPS DE *S. minnesota*, CRX-547 y CRX-527 sobre la inducción de citocinas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas frescas, CRX-527 y LPS inducen niveles similares de la citocina TNF α y quimiocinas MIP-1 α (Figura 22A). Como alternativa, CRX-547 induce niveles significativamente más bajos de TNF α y MIP-1 α , pero niveles comparables de las quimiocinas IP-10 y RANTES (Figura 22B).
- 10 La expresión de TNF α y MIP-1 α es dependiente de la señalización a través del adaptador de TLR4, MyD88, mientras que la expresión de IP-10 y RANTES son dependientes de la señalización a través del adaptador de TLR4, TRIF/TICAM-1 (Hoebe et al, Kawai et al). Cuando los agonistas se comparan según la inducción del mismo conjunto de citocinas dependientes de MyD88 y dependientes de TRIF en sangre entera humana fresca, monocitos humanos cultivados, macrófagos derivados de monocitos humanos y células dendríticas derivadas de monocitos humanos, se observa un patrón similar de resultados (datos no mostrados).
- 15

Ejemplos 2: *CRX-547 induce niveles más bajos de IL-12p70 e IL-23 en las células dendríticas derivadas de monocitos*

- La inducción de citocinas inflamatorias y la maduración de las células dendríticas (DC) contribuyen a la estimulación de una respuesta inmunitaria sólida durante la administración de una vacuna con adyuvante. Por lo tanto, se compara la capacidad de CRX527 y CRX-547 para inducir IL-12p70 humana en las DC. La inducción de IL-12p70 estimula el desarrollo del linaje de células T colaboradoras Th1 y favorece el desarrollo de una respuesta inmunitaria mediada por células (Goriely, Neurath, y Goldman 81-86; Gutcher y Becher 1119-27). Como se ha demostrado que la expresión de IL-12p70 depende de la señalización tanto de MyD88 como de TRIF señalización (Goriely, Neurath, y Goldman 81-86), se puede verificar si la respuesta de las CD al tratamiento con CRX547 podría anularse. Aunque reducida significativamente en comparación con CRX-527 y LPS, CRX-547 puede inducir una respuesta IL-12p70 de las DC derivadas de monocitos humanos (3A).
- 20
- 25

- Como alternativa, la expresión del mediador inflamatorio, IL-23, en las DC es totalmente dependiente de MyD88 (Re y Strominger 37692-99; Goriely, Neurath, y Goldman 81 – 86). Cuando se compara la inducción de IL-23 mediante el tratamiento de las células dendríticas con CRX-527 y CRX-547, se encuentra que la expresión de IL-23 se reduce prácticamente a los niveles basales en las células tratadas con CRX-547 (3B).
- 30

Ejemplo 3: *Dependencia de MyD88 y TRIF de la inducción de citocinas*

- Cuando se utiliza la expresión de una construcción mutante negativa dominante para inhibir la señalización a través de MyD88, la inducción de la citocina dependiente de MyD88, TNF α , por CRX-527 se reduce significativamente, y la inducción de la citocina dependiente de TRIF, RANTES, solo se reduce ligeramente, mientras que la inducción por CRX -547 de citocinas dependientes de MyD88 se ve afectada por la destrucción por MyD88 ([066] 4A).
- 35

Como alterativa, cuando la expresión de TRIF se destruye utilizando procedimientos similares, la inducción de citocinas dependiente de TRIF tanto por CRX547 como CRX527 se reduce en un grado similar ([066] B

- Las especificidades de señalización por MyD88 / RIF de los AGP, CRX-527 y CRX-547 también se pueden diferenciar por la dependencia de la endocitosis. Recientemente, dos grupos separados (Kagan y col., 361 – 68; Tanimura y col., 94 – 99) han informado de que la señalización dependiente de MyD88 aguas abajo de TLR4 se inicia a partir de la membrana celular, mientras que señalización dependiente de TRIF –aguas abajo de TLR4 se inicia a partir del endosoma/lisosoma lisosoma después de la internalización del complejo receptor TLR4. Kagan y col., usaron el inhibidor de la endocitosis, Dynasore, para de mostrar que se había inhibido la inducción de citocinas dependiente de TRIF, pero no la dependiente de MyD88. Por lo tanto, Dynasore se utiliza como se muestra a continuación para comparar la dependencia de MyD88 y TRIF de la inducción de citocinas / quimiocinas por CRX-527 y CRX-547.
- 40
- 45

- La inhibición de la endocitosis con Dynasore inhibe la inducción de RANTES dependiente de TRIF tanto por CRX-527 como por CRX-547 en macrófagos humanos derivados de PBMC (05), mientras que la inducción de MIP-1 α dependiente de MyD88 aumenta ligeramente en relación con las células no tratadas. Estos resultados sugieren que la inducción de citocinas dependiente de TRIF por CRX-527 y CRX-547, aguas abajo de TLR4, se produce mediante mecanismos de señalización similares tras la endocitosis.
- 50

Ejemplo 4: *CRX-547 induce niveles significativamente más bajos de translocación nuclear de NF κ B y la actividad transcripcional, pero niveles iguales o superiores de translocación nuclear de IRF-3 en comparación con CRX527.*

- Expresión de muchas citocinas inflamatorias, incluyendo TNF α e IL-1 β , es dependiente de la activación y la translocación nuclear de NF κ B. La señalización tanto dependiente de MyD88 como dependiente de TRIF aguas
- 55

abajo del complejo receptor TLR4 induce la activación y la translocación nuclear del factor de transcripción, NFκB. Sin embargo, la activación de NFκB través de la señalización dependiente de TRIF se induce más tarde y en un grado mucho menor que la activación a través de señalización dependiente de MyD88 (Yamamoto y col. 2002).

El factor 3 de Respuesta al interferón (IRF-3) es un factor de transcripción activado aguas abajo de la vía de señalización de TLR4 dependiente de TRIF (Yamamoto y col., 640 – 43). La fosforilación de IRF-3 conduce a la dimerización de IRF-3, la translocación nuclear, y la inducción de la transcripción del interferón de tipo I (IFNβ) y los genes inducibles por interferón (Honda, Takaoka, y Taniguchi 349 – 60; Tailor, Tamura, y Ozato 134 – 40). El ImageStream es capaz de medir la translocación nuclear de NFκB y IRF-3 mediante la cuantificación de la colocalización entre los factores de transcripción marcados y el núcleo de las células teñidas con un pigmento específico de núcleo (DRAK-4) (Beum y col., 90 – 99; George y col., 117 – 29; Arechiga y col., 7800 – 04).

Con el fin de comparar la señalización iniciada por CRX-527 y CRX-547, la inducción de la translocación nuclear de NFκB e IRF-3 mediante tratamiento con CRX-527 y CRX-547 se compara en la línea celular de monocitos humanos MonoMac6 (MM6) utilizando análisis ImageStream. 6 muestra la estrategia de acotamiento para células MM6 estimuladas con CRX-527 y CRX-547.

CRX-527 induce la translocación nuclear temprana de NFκB (tan pronto como 5 minutos después de la estimulación) cuando se compara con CRX-547. La translocación nuclear de NFκB inducida por una actividad de CRX-547 nunca llega por encima de un umbral determinado (en este caso en torno al 50%), mientras que, a los treinta minutos, la estimulación de CRX-527 tiene como resultado casi el 100% de la translocación nuclear de NFκB (7). Ambos AGP parecen funcionar de una manera dependiente de la dosis. Un alto nivel de fondo de la translocación nuclear de IRF3 está presente independientemente de la estimulación de CRX-527 o CRX-547, lo que sugiere la señal a través de TRIF (datos no mostrados). Dado que la actividad precoz de NFκB es indicativa de un patrón de señalización de MyD88, estos datos sugieren que CRX-527 señala a través de MyD88 mientras que CRX-547 es menos potente en la inducción de la señalización de MyD88.

Para confirmar que las diferencias en la translocación nuclear entre CRX-527 y CRX547 se traducen en la activación transcripcional elevada, se comparan la activación de NFκB inducida por CRX-527 y CRX-547 en células HEK293 transfectadas con TLR4 humano, MD-2, CD 14 y el plásmido informador de NFκB. Como en un ensayo de translocación nuclear, se encuentra que CRX-527 y LPS inducen una activación significativamente mayor del promotor de NF-κB que CRX547 (8).

Ejemplo 5: CRX-547 inhibe la inducción de citocinas dependiente de MyD88 por CRX-527

CRX-527 señala a través del complejo receptor TLR4 / MD2 y conduce a la activación de factores de transcripción que conducen a la inducción de citocinas y quimiocinas. Cuando se añaden concentraciones crecientes de CRX-547 a los monocitos adherentes humanos primarios antes de la adición de una concentración fija de CRX-527 o LPS, la inducción de la citocina dependiente de MyD88, TNFα, se inhibe, mientras que la inducción de la quimiocina dependiente de TRIF, MCP-1, se incrementa de forma aditiva a concentraciones más altas de CRX-547. La concentración de CRX-547 requerida para inhibir la inducción de TNFα se encuentra en el mismo intervalo las concentraciones fijas de CRX-527 y LPS, lo que sugiere que CRX-547 puede competir con CRX-527 y LPS por la unión al complejo TLR4 pero induce principalmente la señalización a través de la vía TRIF cuando se unen.

Como parece que CRX-547 es un agonista parcial en relación con CRX-527 y LPS para la inducción de citocinas / quimiocinas dependiente de MyD88 aguas abajo de TLR4 en las células monocíticas, la inclusión de CRX-547 en el tratamiento de células monocíticas con CRX-527 puede inhibir la inducción de citocinas / quimiocinas y proporcionar información sobre el mecanismo de acción para la señalización selectiva de TRIF por CRX-547. A tal fin, los monocitos primarios humanos son tratados con un intervalo de dosis de CRX-527 en presencia de concentraciones crecientes de CRX-547.

Las curvas de dosis-respuesta resultantes se ajustan a una ecuación logística de 4 parámetros. La Figura 10A muestra los efectos de la inclusión de CRX-547 0 uM, 0,000016 uM, 0,004 uM, y 0,1 uM en las curvas de dosis-respuesta para el TNFα inducido por CRX-527.

Tal como se esperaba para un agonista parcial, concentraciones crecientes de CRX-547 desplazan las curvas de inducción de TNFα a lo largo del eje X (desplazamiento de la potencia), mientras que el nivel basal de las curvas (asíntota inferior) aumenta con el nivel de respuesta del CRX-547 en ausencia de CRX-527. La gráfica del desplazamiento del log de la CE₅₀ (DR-1) para cada concentración de CRX-547 frente al logaritmo de la concentración del CRX-547 (regresión de Schild) permite comparar la afinidad calculada (K_{bapp}) con la CE₅₀ para CRX-547 calculada a partir de la curva dosis-respuesta de CRX-547 y CRX-527. Los valores confirman que la afinidad de CRX-547 se aproxima a las CE₅₀ de ambos CRX-547 y CRX-527 y sugiere que CRX-547 compete eficazmente con CRX-527 por la unión y la señalización dependiente de MyD88 (que conduce a la inducción TNFα) en el complejo receptor TLR4 (Figura 10B).

Del mismo modo, la Figura 11 muestra cuando se añaden concentraciones crecientes de CRX-547 a los monocitos adherentes humanos primarios simultáneamente con la adición de una concentración fija de CRX-527 o inducción con LPS de la citocina dependiente de MyD88, se inhibe el TNFα. La concentración de CRX547 requerida para

inhibir la inducción de TNF α está en el mismo intervalo (CIC50_{CRX-527}: 48 $\pm$ 30 nM/CIC50_{LPS}: 18 $\pm$ 12) como las concentraciones fijas de CRX527 Y LPS (100 nM), lo que sugiere que CRX547 compite con CRX527 y LPS por la unión al complejo de TLR4.

Para determinar si CRX-547 es capaz de antagonizar la translocación nuclear de NFkB en las células tratadas con CRX-527 constante, las células MM6 se estimulan durante 20 minutos, 35 minutos y 2 horas con dosis crecientes de CRX-547 (Figura 12). Cuando se añaden AGP al mismo tiempo, CRX-547 antagoniza la translocación nuclear de NFkB inducida por CRX-527 a las dosis más altas. Cuando CRX-547 es constante y enriquecido con CRX-527 en el ensayo, la estimulación de CRX-527 es capaz de superar el efecto máximo de la translocación nuclear de NFkB con solo CRX-547. Estos datos sugieren que CRX-547 y CRX-527 compiten por la unión en el complejo receptor TLR4, lo que conduce a la inhibición de la señalización dependiente de MyD88.

Ejemplo 6: Análogos de CRX-547 con agonismo aparente sesgado con TRIF de TLR4 humano.

Con el fin de evaluar los análogos de la familia de AGP, los compuestos se analizan para determinar patrones similares de inducción de citocinas / quimiocinas. Los pares de isómeros L y D de los AGP serilo, CRX-527 y CRX-547, con cadenas acilo secundarias con enlaces éster se comparan con los análogos de serilo que tienen cadenas de acilo secundarias unidas por éter, compuestos de **1a** y **1b**, (compuestos mostrados en 1), una potencial modificación potenciadora de la estabilidad potencial de los principales AGP candidatos. Curiosamente, para **1b**, la modificación de la molécula para que tenga cadenas de acilo secundarias unidas por enlaces éter en lugar de éster restablece una eficacia considerable en el isómero D con respecto al isómero L para la inducción de la señalización dependiente de MyD88 (3). La base mecanicista para este rescate de la eficacia de MyD88 por los isómeros D unidos por enlaces éter no se conoce.

Ejemplo 7: Análisis de transferencia de tipo fosfo-western de monocitos primarios humanos estimulados con CRX-527 o CRX-547 y las células MM6 estimuladas con CRX-527 o CRX-547

La degradación de la serina / treonina quinasa, IRAK-1, se produce aguas abajo de la señalización de TLR4 dependiente de MyD88 (Hatao y col., 260 – 64; Neumann y col., 1089 – 94), mientras que la señalización de TLR4 dependiente de TRIF tiene como resultado la activación de IRF-3 (Yamamoto y col., 6668 – 72; Yamamoto y col., 640 – 43). Aquí, los monocitos primarios humanos son estimulados con CRX-547 o CRX-527 durante los tiempos indicados, y los lisados celulares se analizan mediante transferencia de tipo Western para los niveles de la cinasa activada por la vía de MyD88, IRAK-1, y el factor de transcripción activado por la vía TRIF, IRF-3 (fosfo-IRF-3 e IRF-3 total). Los niveles de acción β se utilizan como control de carga. Los monocitos estimulados por CRX-527 muestran una rápida disminución de IRAK-1, mientras que las células estimuladas por CRX-547 muestran una degradación retardada y reducida de esta proteína (4).

El papel de las moléculas de señalización MAPK en la señalización de MyD88 frente TRIF después de la ligación de TLR4 es complicado porque p38 está implicada en ambas vías, sin embargo un papel para la fosforilación de p38 como un indicador de la vía de TRIF se indica en la literatura. La fosforilación de p38 se reduce en los macrófagos de ratones TRIF - / - después de la estimulación con LPS mientras que los macrófagos TRIF + / + macrófagos muestran una fosforilación sostenida de p38, lo que sugiere que TRIF puede desempeñar un papel en el mantenimiento del estado de fosforilación de p38 después de la unión a TLR4 (Thomas y col., 31119 – 30). Para determinar si el estado de fosforilación de p38 es diferente después de la estimulación con CRX-527 frente CRX-547, el análisis de transferencia de tipo Western se realiza en lisados de células MM6. La estimulación con CRX-527 tiene resultado un ligero aumento en el estado de fosforilación de p38 en comparación con CRX-547, aunque muestran una cinética similar de la activación (Figura 15).

Las vías de MAPK y los factores de transcripción aguas abajo están regulados de forma diferencial por agonistas de TLR. La degradación de IRAK4 e Ikb α es indicativa de MyD88 después la señalización de TLR4 (Hatao y col., 260 – 64; Neumann y col., 1089 – 94), mientras que la señalización de TLR4 mediada por TRIF tiene como resultado la activación de IRF-3 (Yamamoto y col., 6668 – 72; Yamamoto y col., 640 – 43). Las células MM6 se estimulan con CRX-547 o CRX-527 (10 ng / ml) durante el tiempo indicado. Los lisados celulares se recogen y se realiza análisis de transferencia de tipo Western de las proteínas de la vía de señalización de MyD88, fosfo-Ikb α , IRAK4, y las proteínas de la vía TRIF, fosfo-p38, IRF3 total y fosfo-IRF3 se realiza utilizando β actina como el control de carga. Las células MM6 estimuladas con CRX-527 tienen una rápida disminución del Ikb α e IRAK-4 totales, mientras que las células estimuladas CRX-547 tienen una degradación retardada y menor de ambas proteínas de señalización inducidas por MyD88. En términos de las proteínas de señalización mediadas por TRIF, fósforo-p38, IRF3 p38 total y fósforo IRF3 se observa poca o ninguna diferencia entre estos dos AGP.

Ejemplo 8 Evaluación de la señalización dependiente de MyD88 y TRIF en ratones.

Contrariamente a los resultados para las células primarias humanas, CRX-547 induce niveles similares de citocinas dependientes de MyD88 en suero de ratón después de la administración i.v. en ratones BALB / c. Para asegurarse de que esta respuesta no es específica de los ratones BALB / c, se realiza una prueba similar de inducción de citocinas en suero en ratones C57BL / 6. La cinética (inducción a 2 o 6 horas después de la inyección) y la magnitud de la inducción de citocinas son similares para CRX-527 y CRX-547 para las citocinas / quimiocinas dependientes

de MyD88 (TNF α , IL-10) y dependientes de TRIF (RANTES, IP-10, MIG), aunque la inducción relativa por CRX-547 es ligeramente menor para ciertas citocinas que la observada en ratones BALB / c (no mostrado). También de interés, la inducción de las citocinas dependientes de MyD88 analizada es consistentemente superior a las 2 horas que a las 6 horas de la inyección, mientras que la inducción de citocinas dependientes de TRIF es superior a las 6 horas para cada uno de los agonistas, lo que sugiere diferentes cinéticas para la inducción de citocinas a través de las dos vías. Este fenómeno podría explicarse por un requisito para la inducción temprana DE IFN β y la actividad autocrina / paracrina observada anteriormente para la inducción de muchas citocinas dependientes de TRIF (Perry y col., 407 – 22), O por un retraso en la señalización dependiente de TRIF debido al requisito de la endocitosis (Kagan y col., 361 – 68).

Varios ejemplos de pruebas para la inducción de citocinas/quimiocinas dependientes de MyD88- y TRIF por los AGP de isómeros L y D *in vitro* (véanse los Ejemplos 12 a 14 a continuación). En cada caso, incluyendo la inducción de citocinas en PBMC murinos, la inducción de citocinas en la línea de células de macrófagos murinos, RAW264. 7 y la inducción de la actividad de NF κ B en células HEK293 transfectadas con muTLR4/muMD2, los isómeros D de los AGP serilo no muestran el mismo sesgo de señalización de TRIF como se demuestra en los sistemas humanos divulgados en el presente documento.

Ejemplo 9 Base de receptor para especificidad de especies (murinos frente a seres humanos) de la señalización de CRX-547

Se observan diferentes patrones de señalización para dos isómeros de AGP, con CRX-547, el isómero D de CRX-527, señalizando de un modo sesgado por TRIF mientras que las señales de CRX-527 a través de las vías dependientes tanto de MyD88 como de TRIF. En los estudios iniciales, la señalización sesgada con TRIF de CRX-547 parecía ser dependiente de la especie, ya que se observó en las células humanas, pero no murinas. Para abordar esta diferencia aparente, los inventores utilizaron células HEK293 transfectadas con TLR4, MD-2, y CD-14 y combinaciones de los mismos para probar los requisitos receptor / coreceptor y la especificidad de especie del receptor para la señalización de AGP.

Se muestra que las células HEK293 transfectadas con huTLR4, huMD-2, y huCD14 y estimuladas con CRX-547 inducen menos actividad indicadora de NF κ B que CRX-527 y LPS, mientras que los niveles de actividad inducida por CRX-547 en células HEK293 transfectadas con muTLR4, muMD-2, y muCD14 eran más similares a CRX-527 y LPS. Este análisis sugiere una preferencia por un complejo receptor TLR4 murino para la inducción de la señalización por CR-547. Con el fin de determinar si el propio TLR4 u otro componente del receptor accesorio son responsable de esta especificidad de especie, el análisis se amplía para incluir a las células HEK293 que expresan combinaciones de los componentes del receptor TLR4 humanos y murinos.

Como se muestra en 8, cuando las células HEK293 se transfectan con una combinación de TLR4 humano y MD-2 murino, sigue habiendo una gran diferencia relativa en la inducción de la actividad del promotor entre CRX-527 y CRX-547, lo que sugiere que esta disparidad se debe a una divergencia en la interacción de CRX-527 y CRX-547 con TLR4 humano. Cuando las células HEK293 se transfectan con una combinación de TLR4 murino y MD-2 humano, CRX-527 y CRX-547 indujeron niveles similares de actividad del promotor, lo que sugiere de nuevo que la diferencia en la actividad puede provenir de una divergencia en la interacción en la interfaz AGP / TLR4 . Estos resultados son diferentes del efecto de las modificaciones en la longitud de la cadena de acilo y la composición que causó diferencias en la interacción de la molécula con MD-2 vista por Muroi y col. (Muroi, M y Tanamoto, K. (2006). J. Biol. Chem. 281. p5484 – 5491).

Cabe señalar que los niveles de actividad son mucho más bajos en general para los complejos quiméricos (huTLR4 / muMD2, muTLR4 / huTLR4) que cuando complejos con componentes de receptor afín están presentes (huTLR4 / huMD2, muTLR4 / muMD2), lo que sugiere que estas quimeras entre especies no funcionan de manera óptima en este sistema. Se requieren más análisis bioquímicos para dilucidar residuos específicos que contribuyen a la especificidad de especie supuesta de CRX-547.

Ejemplo 10 Estudio de toxicología en conejos con los AGP candidatos principales por vía i.m.

La toxicidad de CRX-527, 524, 547 y el compuesto 1 se evalúa en conejos que reciben AGP solo por la vía intramuscular (i.m.). Grupos de tres conejos son vacunados con 1 ml de AGP, diluido o MPL control, por vía i.m. los días 0, 7 y 14. Se evalúan dos dosis de AGP: altas (25 μ g) y bajas (5 μ g). Se vigila en todos los animales el peso corporal, la temperatura, el estado clínico y la puntuación de Draize. Se sacrifica a los animales una semana después de la administración final. La sangre se recoge antes del tratamiento, dos días después de la 2ª vacunación y tras el sacrificio para analizar la hematología y la bioquímica clínica. Se realiza histopatología de los puntos de inyección y los órganos principales.

Todos los animales demuestran aumento de peso a lo largo del curso del estudio con la excepción del grupo de MPL entre las vacunas 2ª y 3ª (Figura 19). Se observan variaciones de temperatura después de la vacunación de $\pm 1^\circ$ C, incluido el grupo control de vehículo (Figura 20). Todas las temperaturas están dentro del intervalo normal para los conejos. Se observa una reacción mínima en el lugar de la inyección mediante puntuación de Draize para todos los grupos, incluidos los controles del vehículo; y la reacción disminuye con el aumento de número de vacunaciones

(Figura 21). La anatomía patológica macroscópica de decoloración blanca de los músculos a lo largo de trayecto de la aguja y en el sitio de la inyección se observa en todos los grupos de dosis de adyuvante altos con la posible excepción de CRX-524; también se ve patología en los grupos tratados con CRX-527 y el compuesto 1, pero no con -524 -547 a dosis bajas.

- 5 El análisis de hematología revela una tendencia de granulocitosis en conejos a los que se han administrados dosis bajas y altas CRX-527 y dosis bajas de CRX-524 y el compuesto 1 el día 9 (2 días después de la 2ª) que se resuelve para el día 21 (7 días después de la 3ª). Se sabe que los AGP atraen neutrófilos. No se observan tendencias en los valores de química clínica después de la vacunación.

- 10 La inflamación en el sitio de inyección, que consiste principalmente en miositis de basófilos y macrófagos, es el único hallazgo no incidental en todos los grupos de tratamiento con la excepción de CRX-547 a dosis bajas, en el que no se observa ninguna patología muscular (Figura 2225). Miositis muestra más consistente y más grande para la dosis alta de CRX-527. La miositis también es más consistente con los sitios de inyección de las dos inyecciones más recientes que indican la naturaleza transitoria de la respuesta inflamatoria (datos no mostrados).

- 15 La impresión general es que CRX-547 es mínimamente tóxico solo a dosis altas única y CRX-524, -527 y el compuesto 1 son ligeramente tóxicos con una potencia baja (n = 3 conejos / grupo). Los hallazgos patológicos son transitorios.

Ejemplo 11 *Expresión de los genes de citocinas en respuesta al tratamiento con CRX-527 y CRX-547*

- 20 Para comparar CRX-527 y CRX-547 en la inducción de la secreción de citocinas / quimiocinas en las células humanas y para aclarar aún más los mecanismos de señalización responsables de las diferencias observadas, se evalúa la expresión génica inducida por CRX-527 y CRX-547 utilizando la tecnología de micromatrices. Los experimentos iniciales incluyen el análisis de evolución temporal de la inducción de genes de citocinas dependiente de MyD88- y TRIF mediante qPCR. Este análisis sugiere que la inducción de los genes de citocinas/quimiocinas dependientes de MyD88- y TRIF son detectables mediante 1-2 horas después 2/del tratamiento para ambos agonistas, se elevan a niveles sólidos a las 3 horas del tratamiento, y disminuyen a niveles casi basales a las 6 horas del tratamiento (datos no mostrados). La inducción de los genes de citocinas / quimiocinas dependientes de MyD88- y TRIF tiende a ser más alta a las 3 horas del tratamiento, lo que sugiere que una diferencia cinética sustancial entre la inducción dependiente de MyD88- y de TRIF no funciona a nivel de la expresión génica. Una excepción del patrón cinético es la inducción de IFN β , que ya está al nivel más alto después de 1 hora de tratamiento con CRX-547 o CRX-527 y disminuye posteriormente.

- 30 CRX-527 no sólo induce una mayor expresión de genes de citocinas / quimiocinas dependiente de MyD88, pero mayor expresión de los genes de citocinas / quimiocinas dependiente de TRIF que CRX-547 en este análisis. Este fenómeno no se correlaciona con el patrón observado para la secreción proteica de citocinas / quimiocinas, en el que la secreción de citocinas / quimiocinas dependiente de TRIF es similar para los dos agonistas. Estos datos pueden sugerir que otros factores afectan a los niveles de secreción de citocinas / quimiocinas dependiente de TRIF inducida por CRX-527 y CRX-547. Una posibilidad es que el tratamiento con CRX-547 induce una mayor estabilidad del ARNm del gen dependiente de TRIF que CRX-527. Aunque los niveles de estos genes se han reducido casi al nivel basal a las 6 horas del tratamiento (datos no mostrados), los inventores todavía no han analizado los niveles de ARNm entre 3 y 6 horas.

Sistemas murinos *in vitro*

- 40 **Ejemplo 12** *Inducción de citocinas in vitro*

- Como se ha mencionado anteriormente, se sugiere menos sesgo por TRIF por CRX-547 en los experimentos de inducción de citocinas con PBMC murinos, estudios con una línea celular murina (RAW264. 7) y de transfección en HEK293 (datos no mostrados). Otras comparaciones de citocinas inducidas por CRX-547 y CRX-527 en células RAW264.7 usando un intervalo de análisis y análisis de un par de isómeros L y D adicionales, se proporcionan los compuestos **1a** y **1b**, con cadenas de ácidos grasos unidas por enlaces éter en lugar de enlaces éster (Figura 1). Además, para obtener una mayor comprensión del mecanismo del fenómeno de la especificidad de especie, se comparan la inducción de señalización por CRX-547 en células transfectadas con los complejos receptores TLR4 humano / murino quiméricos. Dicha actividad antagonista / agonista de TLR4 específica de especie también se ha notificado para el lípido IVa, un precursor del lípido A de E. coli con solo 4 cadenas de ácido primarias (Muroi, Ohnishi, y Tanamoto 3546 – 50; Muroi y Tanamoto 5484 – 91), y esta actividad se atribuyó a las diferencias en la estructura del receptor accesorio TLR4 MD-2 en ratones.

Para determinar si las PBMC de sangre de ratón tienen perfiles similares de las citocinas de MyD88 después del tratamiento con CRX-527 o CRX-547, la sangre disponible comercialmente de ratones BALB / c se analiza con CRX-527 o CRX-547. (Figura 24), los niveles parecen ser similares entre los dos grupos analizados.

- 55 Para comparar mejor y confirmar la similitud de potencia entre los isómeros L y D en las células murinas, las células RAW264. 7 (macrófagos) se estimulan durante un intervalo de dosis más amplio con CRX-527, CRX-547, los compuestos **1a** y **1b**, y los sobrenadantes se analizan para determinar la producción dependiente de MyD88 (TNF α)

y de TRIF (IP-10). CRX-527 es más potente en la inducción de la producción de TNF α y de IP-10 que CRX-547 en este intervalo (Figuras 25 y 26). Para esta línea celular murina, la inducción por CRX-547 de las citocinas dependientes de TRIF y de MyD88 es menos potente que para CRX-527. Estos datos sugieren que la actividad de CRX-547 específica de la especie puede no estar clara, aunque la diferencia en la actividad de CRX-527 y CRX-547 para la inducción de citocinas dependientes de MyD88 en una línea celular humana es generalmente mucho mayor que en las líneas celulares murinas, lo que sugiere que hay grandes diferencias en la interacción de CRX-547 con los complejos receptores TLR4 / MD2 humanos y murinos.

Los compuestos **1a** y **1b** inducen niveles similares de citocinas dependientes de TRIF y MyD88 en ambas líneas celulares murinas y humanas, lo que sugiere que un cambio de las cadenas de ácidos grasos unidas por enlaces éster –éster combinados con un cambio del isómero L al D del grupo agliconserilo rescata la aglicona la actividad del isómero D en las células humanas. Como ambas modificaciones cambiar la posición relativa de los grupos cargados en el AGP, las diferencias pueden estar asociadas con diferencias en las interacciones de las moléculas con el complejo receptor TLR4 / MD2.

Puesto que la señalización dependiente de MyD88 después de la estimulación con TLR4 debe ser anterior a la señalización dependiente de TRIF, y dado que tanto MyD88 como TRIF pueden inducir la producción de TNF α aguas abajo debido a la activación de la vía de NF κ B, se analiza un punto de tiempo anterior para determinar la producción de citocinas tras la estimulación con los isómeros L y D. Después de cuatro horas de estimulación, CRX-527 parece ser ligeramente más potente en la inducción de la producción tanto de TNF α como de IP-10 en las células RAW264.7 (Figuras 27 y 28).

Ejemplo 13 *Análisis por transferencia de tipo Western de células RAW264.7 murinas*

Para determinar si el estado de fosforilación (activación) de las moléculas de señalización de las proteínas clave en el TRIF frente MyD88 en las células RAW264.7, las células se preactivan (con PMA 10^{-7} M) después se estimulan con 10 ng / ml de los AGP. Los lisados celulares se preparan a 0, 15 m, 30 m, 45 m, 60 m, 120 m, 240 m. Similar a los resultados en las células MM6, la degradación de I κ B α es más rápida después de la estimulación con CRX-527 en comparación con CRX-547 (17). Sorprendentemente, la estimulación con CRX-547 tiene como resultado un mayor grado de fosforilación de I κ B α y de fosforilación de RF3. La mayor capacidad de respuesta de estas células podría ser debido a la preactivación con PMA, que se sabe que aumenta el estado de maduración de las células monocíticas, CRX-547 induce expresión de fosfo-I κ B α y fosfo-IRF3. IRF3 se induce a través de la señalización mediada por TRIF. La cantidad de la proteína total IRF3 también es mayor en las células tratadas con CRX-547 (Nota: El experimento se llevó a cabo una vez y el control de carga (β actina) sugiere una posible carga desigual.).

Ejemplo 14 *Análisis del ARN de interferencia*

El ARN de interferencia (ARNi) se utiliza para interrumpir la expresión de genes específicos que están implicados en las vías de señalización de TLR: TLR2, TLR4 y MyD88. Las líneas celulares de ARNi RAW264.7 se preparan usando plásmidos disponibles comercialmente (Invivogen). Estos plásmidos contienen un marcador de selección ceocina, una secuencia de codificación para GFP y la secuencia de codificación de ARNs para la eliminación. Una vez que las células se transfectan de manera eficiente, las líneas celulares estables se generan a través de la selección de antibióticos. Pureza de los cultivos se determina mediante células GFP + dentro del sistema de cultivo. También se usa un plásmido irrelevante para transfectar de forma estable células como control. La Figura 30 demuestra la eliminación de MyD88 y TRIF en transfectantes estables del ARNi afín. La Figura 30A muestra que el porcentaje de células positivas para GFP antes de los experimentos de lectura de citocinas es más de 96% en las tres líneas celulares. La Figura 30B muestra evidencias de la eliminación con éxito para MyD88 y TRIF, dado que la estimulación con LPS resultó en una disminución de los niveles de proteína en comparación con el control irrelevante.

Para determinar si TRIF o MyD88 son necesarios para la respuesta de citocinas tras la estimulación con los isómeros L y D, las líneas celulares de ARNi transfectadas de forma estable se estimulan durante 20 horas (en un ensayo similar al ensayo de potencia de MM6) o 4 horas (para capturar las respuestas de citocinas inducidas por MyD88) y los sobrenadantes celulares se analizan para TNF α (MyD88) e IP-10 (TRIF). Veinte horas después de la estimulación, el control de irrelevante, la línea celular LUC tiene un patrón de inducción de IP-10 similar al de las células RAW264.7 salvajes mostrado anteriormente. En las células con eliminación de TRIF, Los niveles de IP-10 no siguen la misma respuesta a la dosis observada con el control irrelevante, lo que sugiere que TRIF se requiere para respuestas eficientes de IP-10 después de la estimulación con AGP. Cuando TRIF está intacto (en las líneas celulares con eliminación de MyD88), los niveles de IP-10 siguen respondiendo a la dosis y las citocinas totales se incrementan por encima del control irrelevante (LUC). Otros sistemas de ensayo (incluidos los sistemas humanos y de ratón) apoyan la hipótesis de que ambos isómeros L y D son eficientes en la inducción de citocinas mediadas por TRIF.

En términos de TNF α , que está controlado por MyD88 (liberación temprana de TNF α) y TRIF (liberación retardada de TNF α), debido al retraso en la activación de NF κ B), CRX-527 es más potente en el control irrelevante en comparación con CRX-547 (Figura 31). Cuando cualquiera MyD88 o TRIF son eliminados, se observa esta misma potencia aumentada de CRX-527 sobre CRX-547. Puesto que TNF α es inducido tanto por MyD88 como por TRIF, el

punto de tiempo de 20 horas no permite la discriminación adecuada entre las vías de señalización después de la estimulación con CRX-527 o CRX-547. Juntos, estos datos sugieren dos posibilidades; que en el marco de tiempo analizado, la inducción de TNF α no exige MyD88, o que la eliminación por el ARNip de MyD88 no es suficiente para suprimir TNF α . La hipótesis de que la señalización de TRIF sola puede inducir TNF α , tiene algún tipo de apoyo; esta inducción se puede deber a la señalización mediada por TRIF. Por lo tanto, esta inducción de TNF α puede deberse a la señalización tanto por MyD88 como por TRIF. El compuesto 1a y CRX-679 tienen respuestas equivalentes a las 20 horas en ambos sistemas de ensayo.

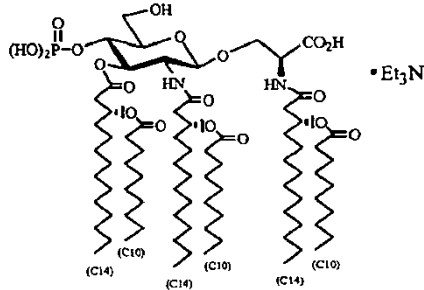
Con el fin de discriminar mejor el requisito de MyD88 para la producción de TNF α , las líneas celulares con eliminación de ARNip se examinan para determinar la producción de TNF α después de cuatro horas de estimulación con AGP (Figura 35). Cuatro horas después de la estimulación, CRX-527 y CRX-547 muestran una inducción similar de TNF α en la línea celular de control irrelevante (LUC). Las diferencias de potencia y el pico de la producción de TNF α se han mejorado en las células con eliminación de TRIF en las que la producción de TNF α debe limitarse a la inducción con MyD88. La eliminación de MyD88 tiene como resultado niveles similares de producción de TNF α entre los dos AGP. Tomados en conjunto, estos datos indican un requisito para MyD88 temprano para inducir la producción de TNF α después de la estimulación con AGP. Además, CRX-527 es más potente en la inducción de TNF α que la dosis equivalente de CRX-547. Los compuestos 1a y 1b dan como resultado patrones de citocinas similares. Los niveles de IP-10 después de cuatro horas de estimulación con células RAW264. 7 son muy bajos, por lo que las líneas celulares de ARNip no se analizaron para determinar los niveles de IP-10.

Lista de referencias

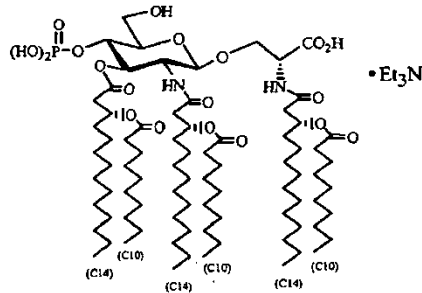
- Bishop, R. E., y col., "Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria." *EMBO Journal* 19.19 (2000): 5071 – 80.
- Gervassi, A., y col., "Differential regulation of inflammatory cytokine secretion by human dendritic cells upon *Chlamydia trachomatis* infection." *Infect.Immun.* 72.12 (2004): 7231 – 39.
- Goriely, S., M. F. Neurath, y m. Goldman. "How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members." *Nat.Rev.Immunol.* 8.1 (2008): 81 – 86.
- Guo, L., y col., "lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides." *Cell* 95.2 (1998): 189 – 98.
- Gutcher, I. y B. Becher. "APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation." *J.Clin.Invest* 117.5 (2007): 1119 – 27.
- Hoebe, K., y col., "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." *Nature* 424.6950 (2003): 743 – 48.
- Honda, K., A. Takaoka, y T. Taniguchi. "Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors." *Immunity* 25.3 (2006): 349 – 60.
- Johnson, D. A., y col., "Synthesis and biological evaluation of a new class of vaccine adjuvants: Aminoalkyl glucosaminide 4-phosphates (AGPs)." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9.15 (1999): 2273 – 78.
- Kawai, T., y col., "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." *Journal of Immunology* 167.10 (2001): 5887 – 94.
- Kim, H. M., y col., "Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran." *Cell* 130.5 (2007): 906 – 17.
- Persing, D. H., y col., "Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators." *Trends in Microbiology* 10.10 (2002): S32–S37.
- Re, F. y J. L. Strominger. "Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells." *Journal of Biological Chemistry* 276.40 (2001): 37692 – 99.
- Rowe, D. C., y col., "The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103.16 (2006): 6299 – 304.
- Stover, A. G., y col., "Structure-activity relationship of synthetic toll-like receptor 4 agonists." *Journal of Biological Chemistry* 279.6 (2004): 4440 – 49.
- . "Structure-activity relationship of synthetic toll-like receptor 4 agonists." *Journal of Biological Chemistry* 279.6 (2004): 4440 – 49.
- Taylor, P., T. Tamura, y K. Ozato. "IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells." *Cell Res.* 16.2 (2006): 134 – 40.
- Walsh, C., y col., "Elucidation of the MD-2/TLR4 interface required for signaling by lipid IVa." *Journal of Immunology* 181.2 (2008): 1245 – 54.
- Yamamoto, M., y col., "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." *Science* 301.5633 (2003): 640 – 43.
- Yamamoto, M., y col., "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." *Nat.Immunol.* 4.11 (2003): 1144 – 50.

REIVINDICACIONES

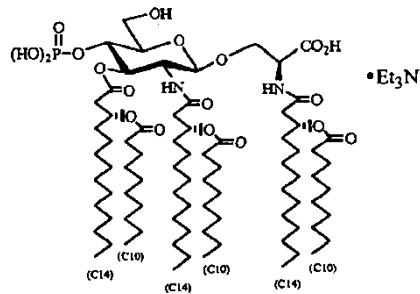
1. Una composición de mimético del lípido A que comprende CRX547 y CRX527 para su uso en la producción de una respuesta inmunitaria en un ser humano, en la que las citocinas dependientes de TRIF se incrementan y las citocinas dependientes de MyD88 disminuyen en comparación con una composición de mimético del lípido A que comprenda CRX527 en ausencia de CRX547, en la que CRX527 tiene la fórmula:



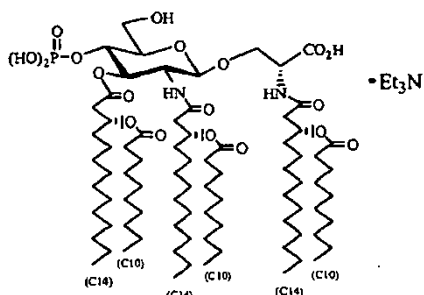
y CRX547 tiene la fórmula:



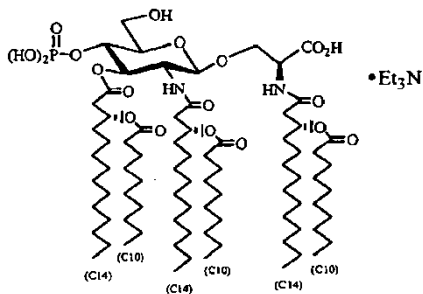
2. Una composición de mimético del lípido A que comprende CRX547 y CRX527 para su uso en el desarrollo de una respuesta inmunitaria en un ser humano, en la que la actividad de NF- κ B está disminuida pero se observan niveles iguales o más altos de IRF3 en comparación con una composición de mimético del lípido A que comprenda CRX527 en ausencia de CRX547, en la que CRX527 tiene la fórmula:



y CRX547 tiene la fórmula:

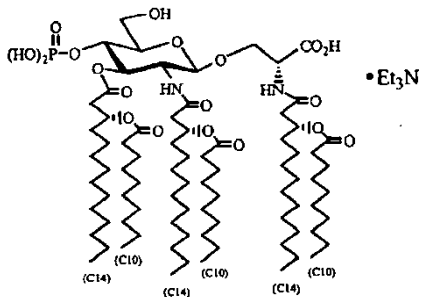


3. Una composición de mimético del lípido A que comprende CRX547 y CRX527 para su uso en el desarrollo de una respuesta inmunitaria en un ser humano, en la que los niveles de IL-12p70 e IL-23 están disminuidos en comparación con una composición de mimético del lípido A que comprenda CRX527 en ausencia de CRX547, en la que CRX527 tiene la fórmula:



5

y CRX547 tiene la fórmula:



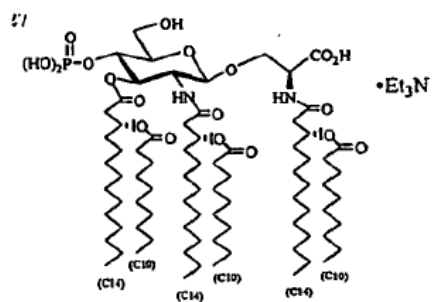
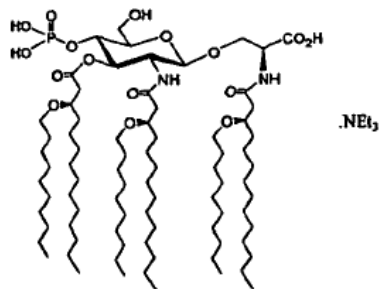
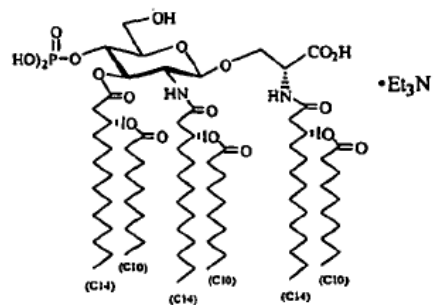
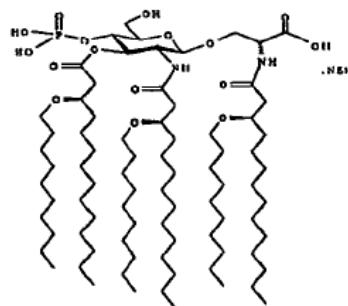
Isómero L-serilo**CRX-527****1a****Isómero D-serilo****CRX-547****1b**

Figura 1. Aminoalquilglucosaminida 4-fosfatos con cadenas de acilos grasos unidos a éster, CRX-527 y CRX-547 1a/1b; aminoalquilglucosaminida 4-fosfatos con cadenas de acilos grasos unidos a éster, compuestos (isómeros L/D) 1a/b.

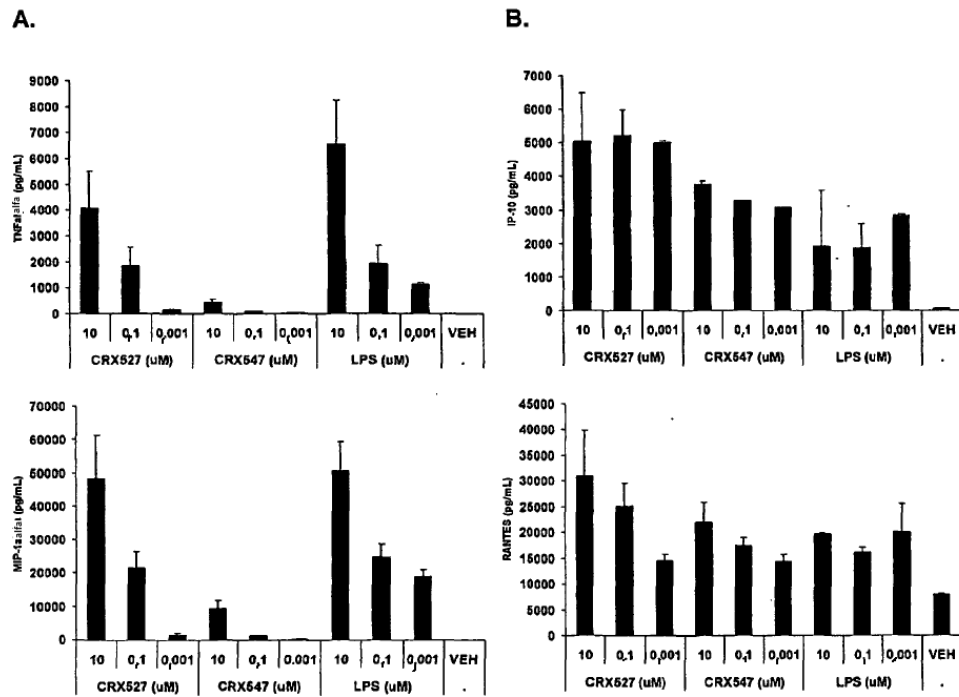
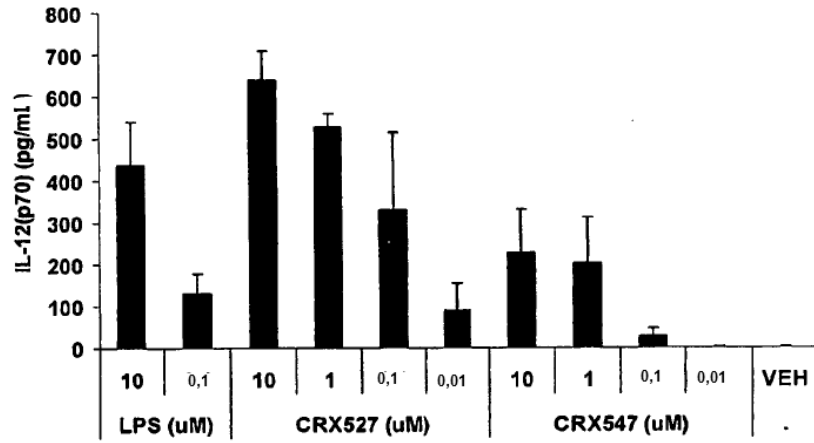


Figura 2. Comparación de los miméticos del lípido A, CRX-527 y CRX-547 con *S. minn. Re595* LPS para inducción de citocinas y quimiocinas (A) dependientes de MyD88 y (B) dependientes de TRIF en PBMC humanos.

A.



B.

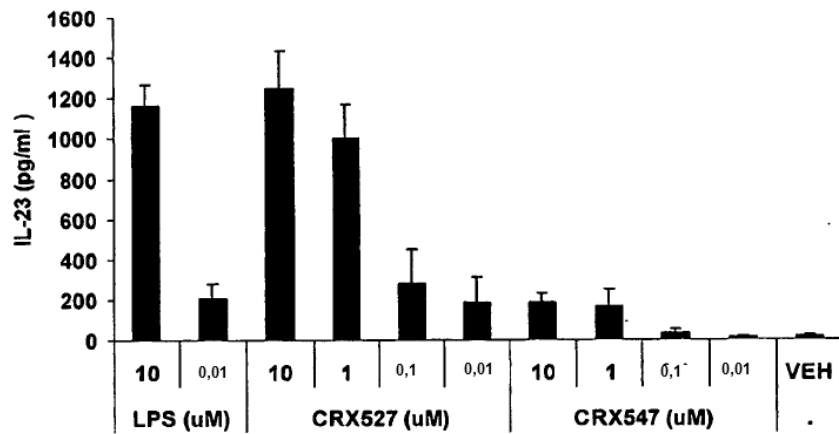


Figura 3. Inducción de (A) IL-12p70 y (B) IL-23, mediante tratamiento de células dendríticas derivadas de monocitos humanos con *S. minn*. LPS de Re595, CRX-527 y CRX-547.

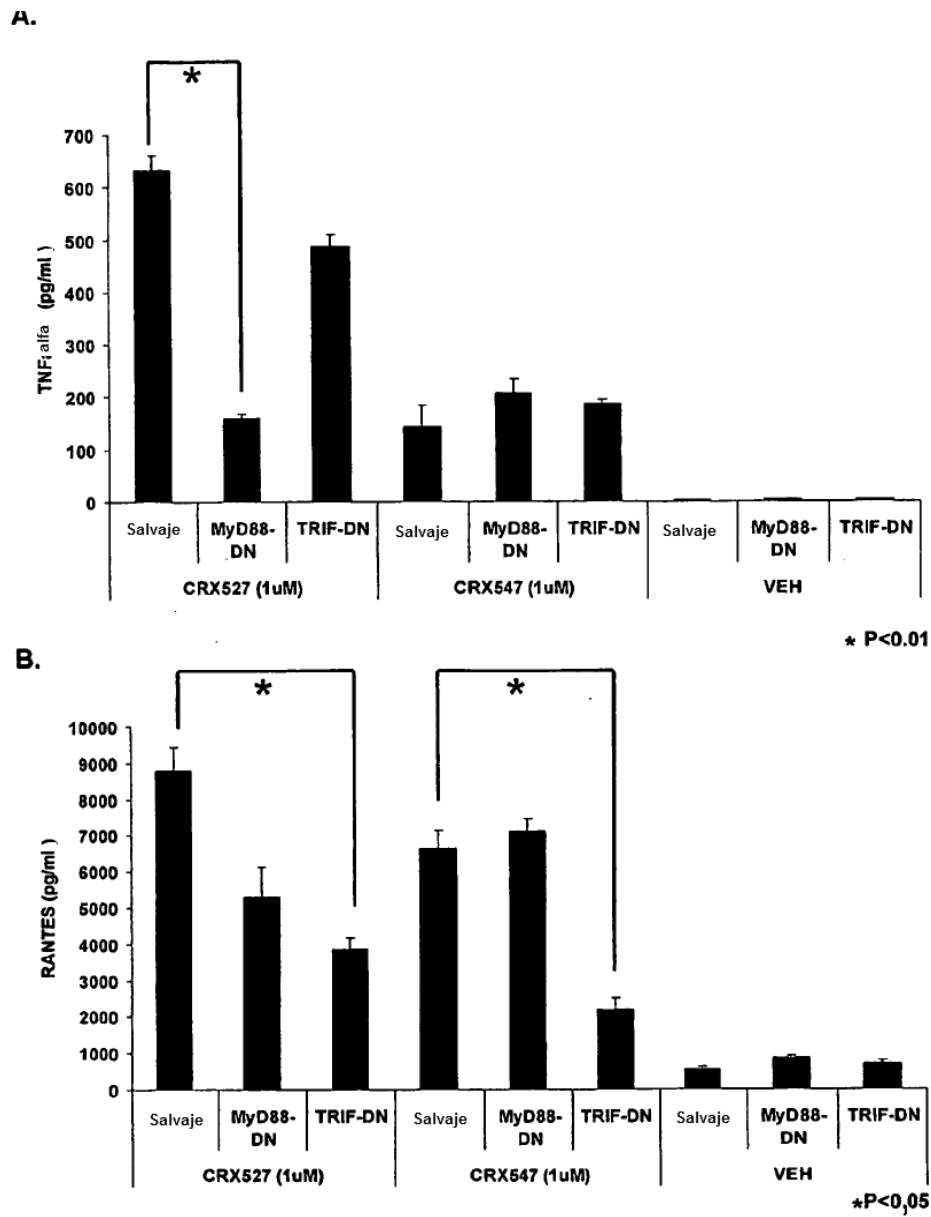


Figura 4. Inhibición de la inducción de citocinas/quimiocinas (A) dependientes de MyD88- y (B) dependientes de TRIF en una línea celular de macrófagos humanos mediante la transfección de plásmidos que expresan construcciones negativas dominantes de MyD88 (MyD88-DN) y TRIF (TRIF-DN).

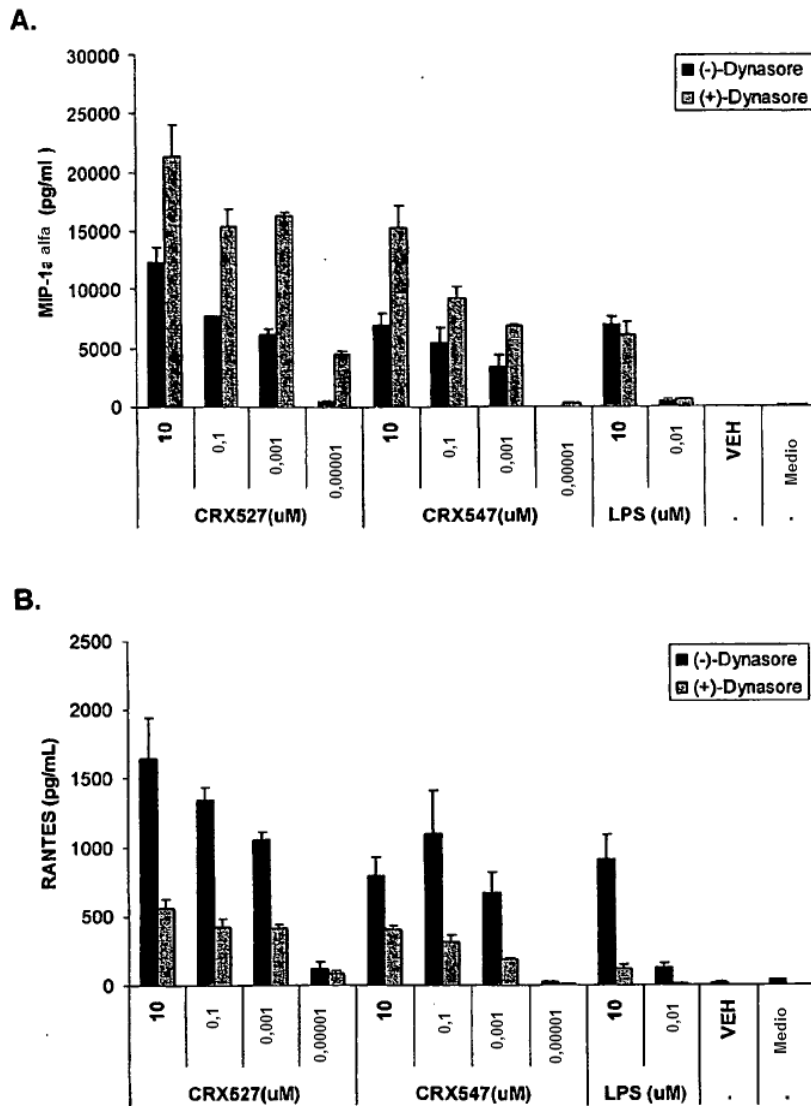


Figura 5. Citocinas/quimiocinas (A) dependientes de MyD88 (MIP-1 α) y (B) dependientes de TRIF (RANTES) inducidas por CRX-527, CRX-547 y LPS en presencia del inhibidor de la endocitosis, Dynasore.

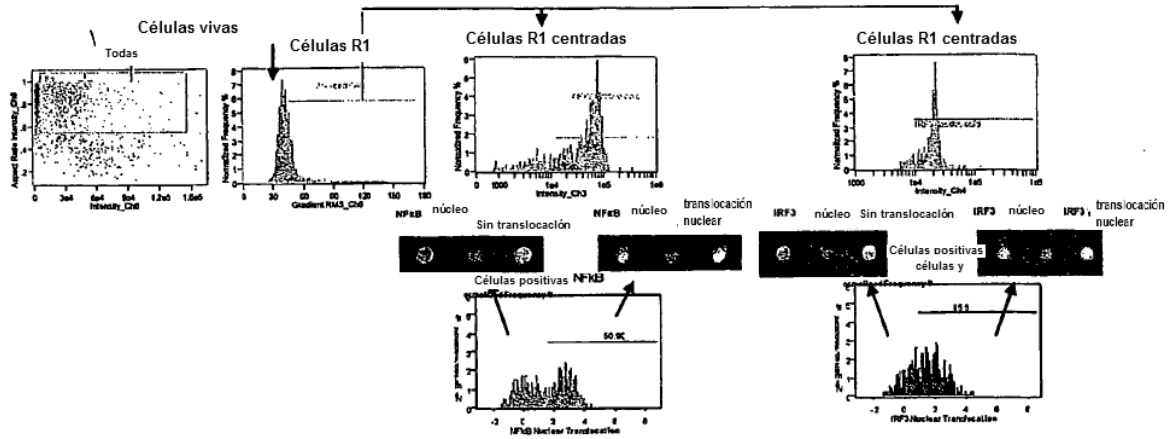


Figura 6. Estrategia de acotamiento ImageStream.

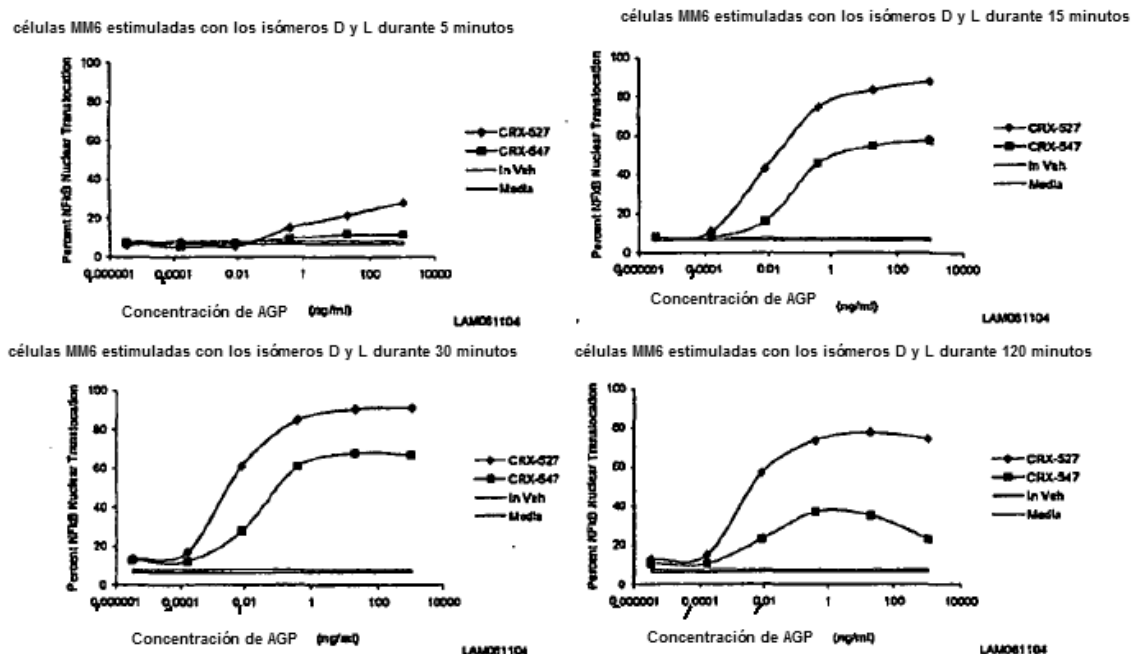


Figura 7. Las células monocíticas humanas (MM6) se trataron durante 5, 15, 30, o 120 minutos con CRX-527 o CRX-547 y la translocación nuclear de NFκB se cuantificó como colocalización del factor de transcripción con el pigmento nuclear (DRAK-5).

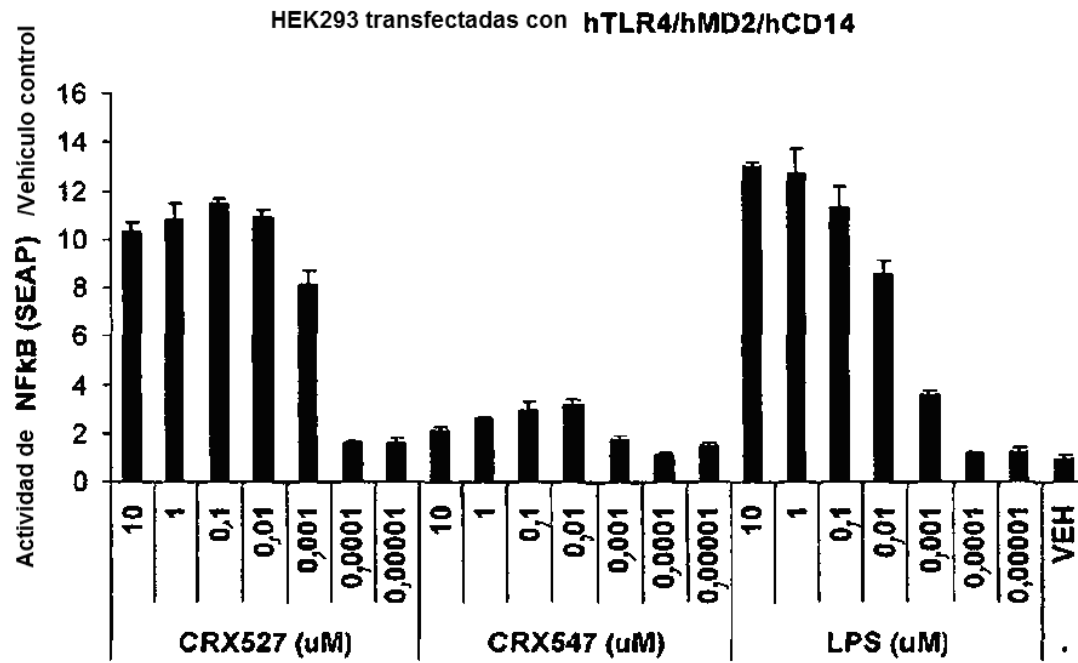


Figura 8. Comparación de la actividad del promotor inducible NF-κB cuando las células HEK293 transfectadas con huTLR4/huMd-2/huCD14 se tratan con *S. minn*. LPS de Re595, CRX-527, y CRX-547.

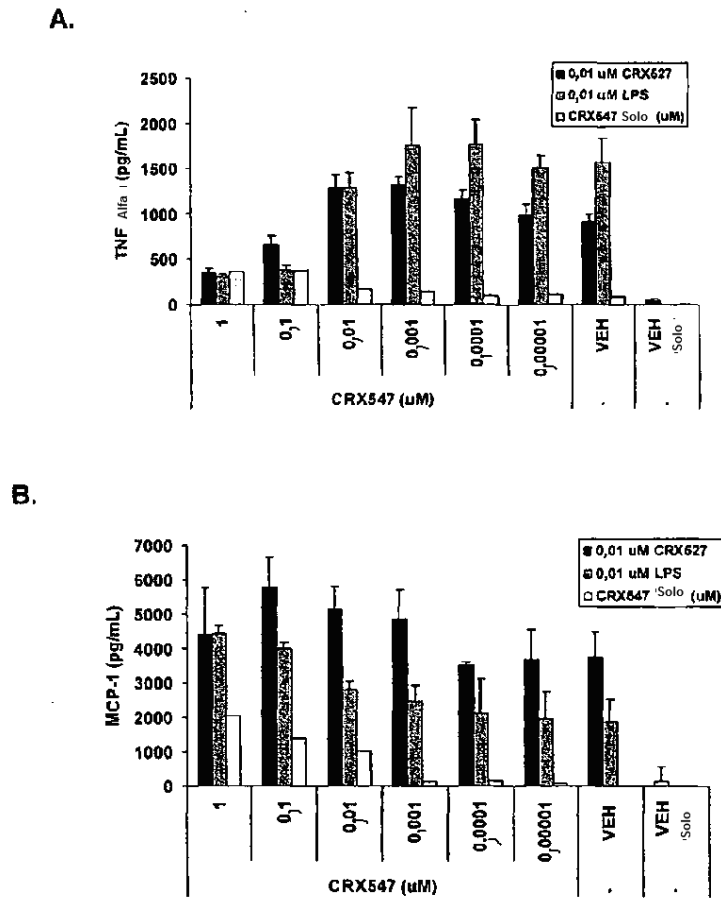


Figura 9. Inhibición de CRX-527 y LPS (A) dependiente de MyD88 e (B) inducción de citocinas/quimiocinas dependientes de TRIF en presencia de concentraciones crecientes de CRX-547.

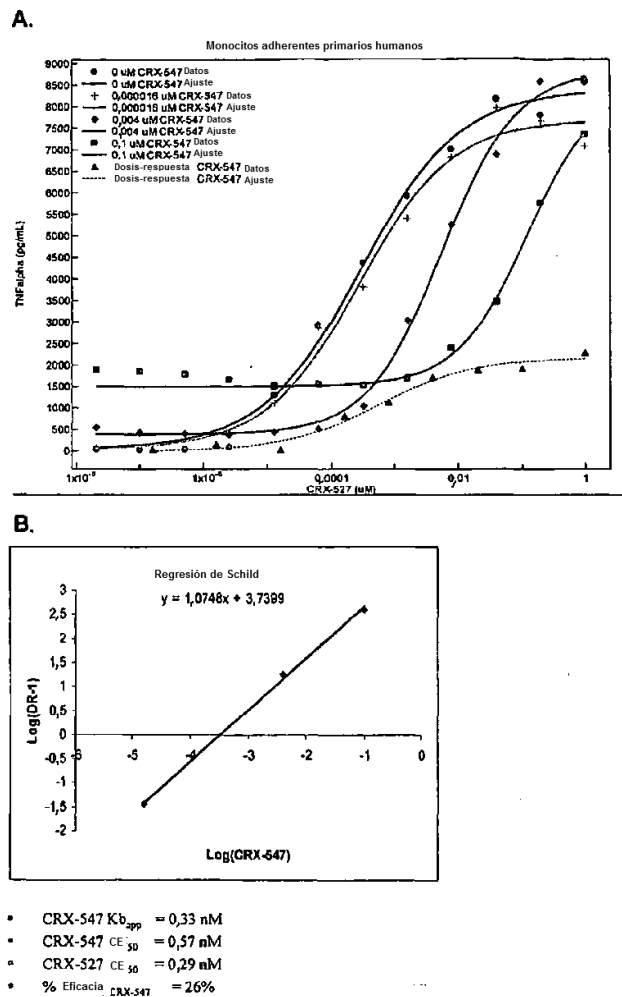


Figura 10.

(A) Inhibición de $TNF\alpha$ inducida por CRX-527 mediante la adición de concentraciones crecientes de CRX-547. (B) El análisis de regresión de Schild da una estimación de la afinidad de CRX-547 (0,33 nM) similar a las CE_{50} de CRX-527 y CRX-547.

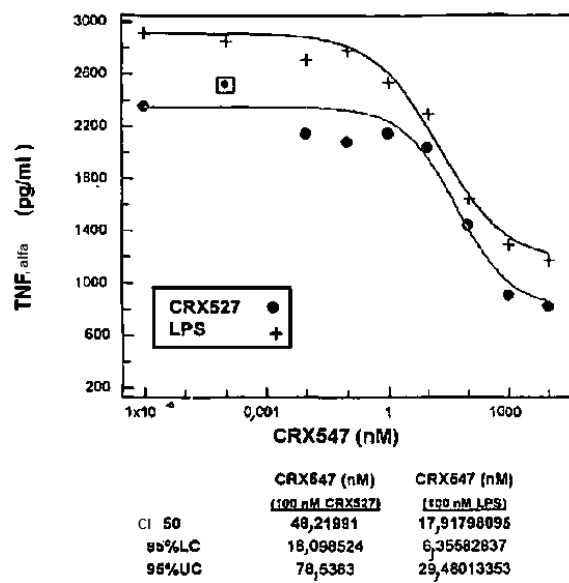


Figura 11. Inhibición de la inducción de citocinas dependientes de MyD88 (TNF α) por CRX527 y LPS en presencia de concentraciones crecientes de CRX547.

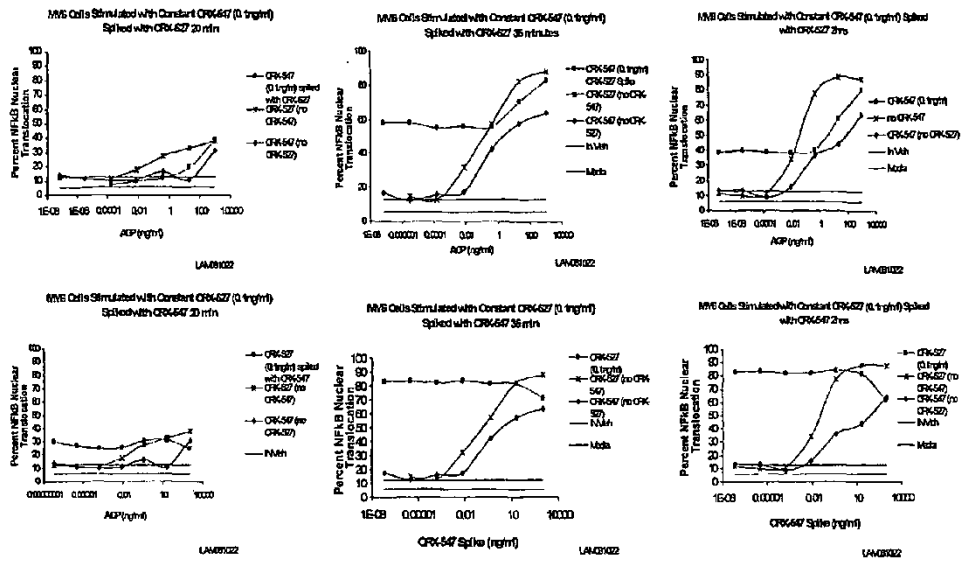


Figura 12. Inhibición de la translocación nuclear de NFkB inducida por CRX527 en presencia de concentraciones crecientes de CRX547.

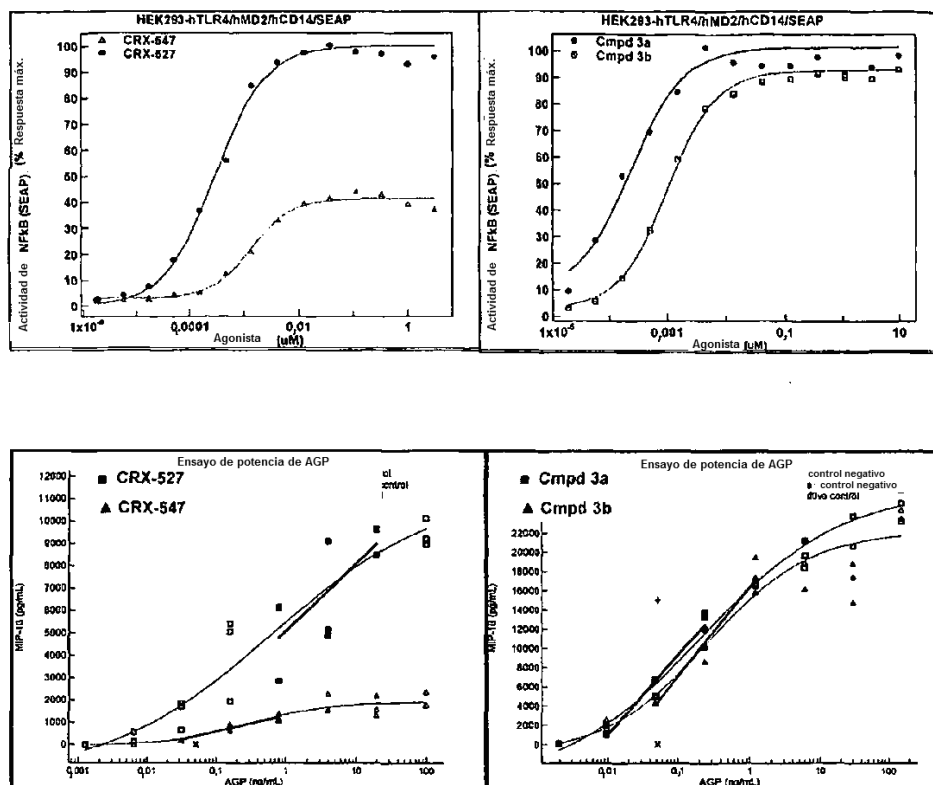


Figura 13.

Efectos de la modificación potenciadora de la estabilidad de CRX-527/CRX-547 sobre la actividad de señalización y la inducción de quimiocinas. Comparación de (A) señalización de NFκB en células HEK293 transfectadas con huTLR4/huMD-2/huCD14 y (B) inducción de MIP-1β dependiente de MyD88 en células monolíticas humanas (MM6) por los pares de isómeros L y D CRX-527/CRX-547 y 1a/1b.

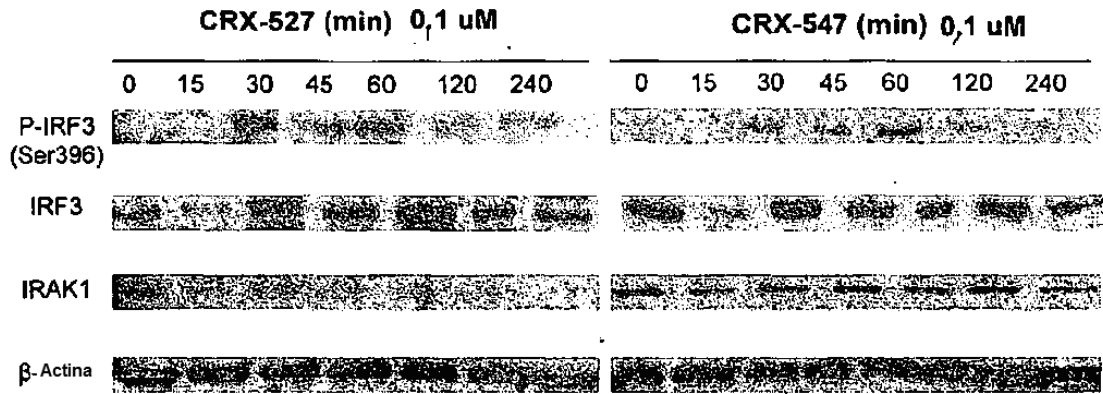
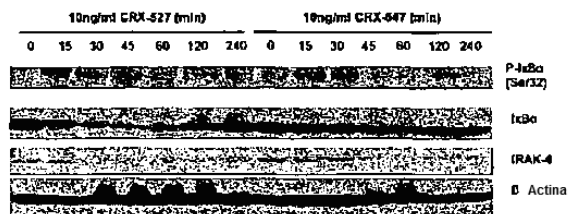


Figura 14. Análisis de transferencia Western de monocitos primarios humanos derivados de PBMC tratados con CRX-527 que muestran una cinética y niveles de activación similares de fosfo-IRF3 aguas abajo de TRIF y mayor degradación de IRAK1 aguas abajo de MyD88 que las células estimuladas con CRX-547

A. Proteínas de señalización de MyD88



B. Proteínas de señalización de TRIF

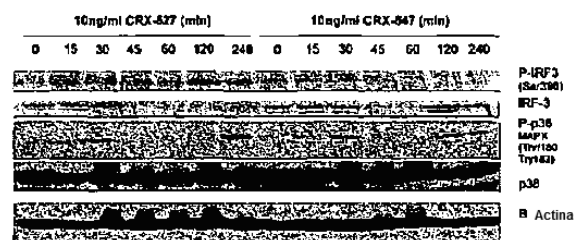


Figura 15. Análisis de transferencia Western de MM6 tratadas con CRX-527 que muestran mayor degradación de IRAK4 aguas abajo de MyD88 que las células estimuladas con CRX-547

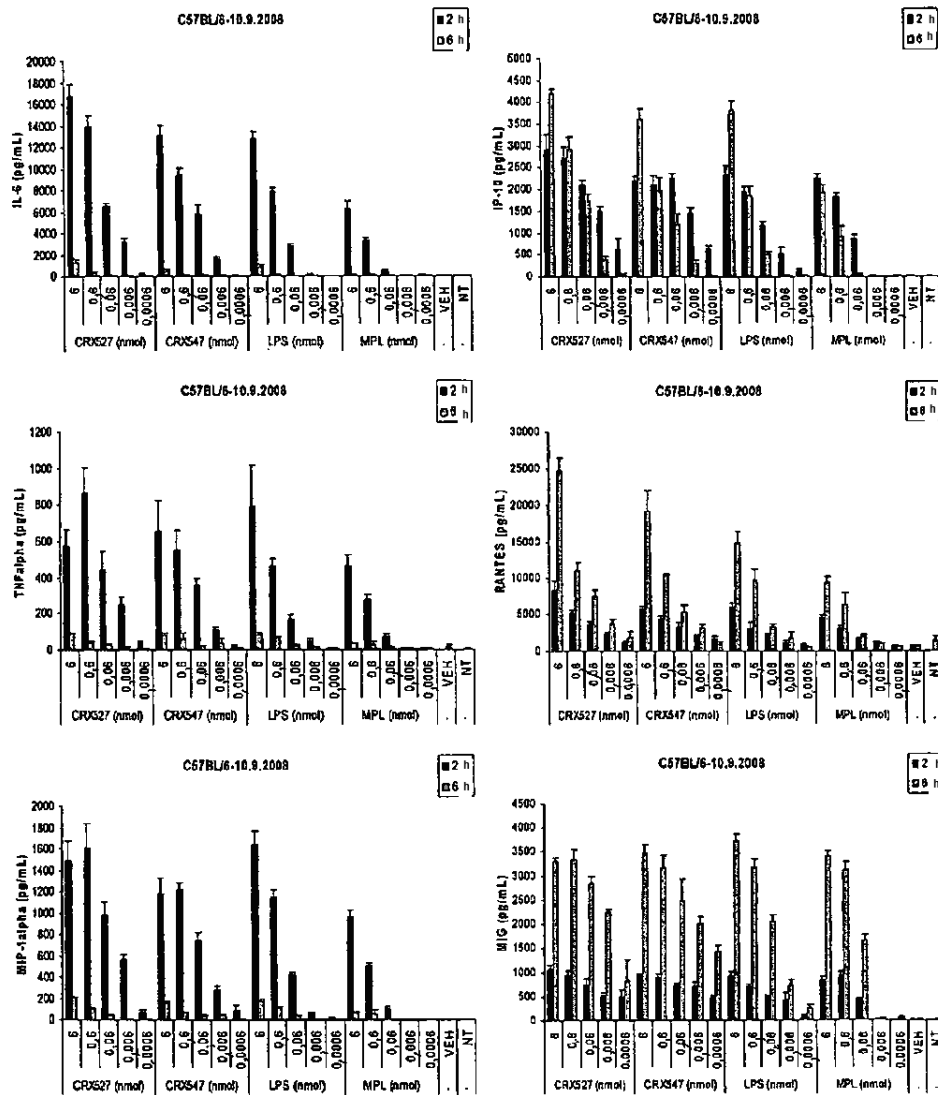


Figura 16. Inducción de citocinas/quimiocinas en suero dependientes de MyD88 (MIP-1 α , TNF α , IL-6) y dependientes de TRIF (IP-10, RANTES; MIG) en ratones C57BL/6, 2 y 6 horas después de inyección (IV) con CRX527, CRX547, LPS y MPL.

A.

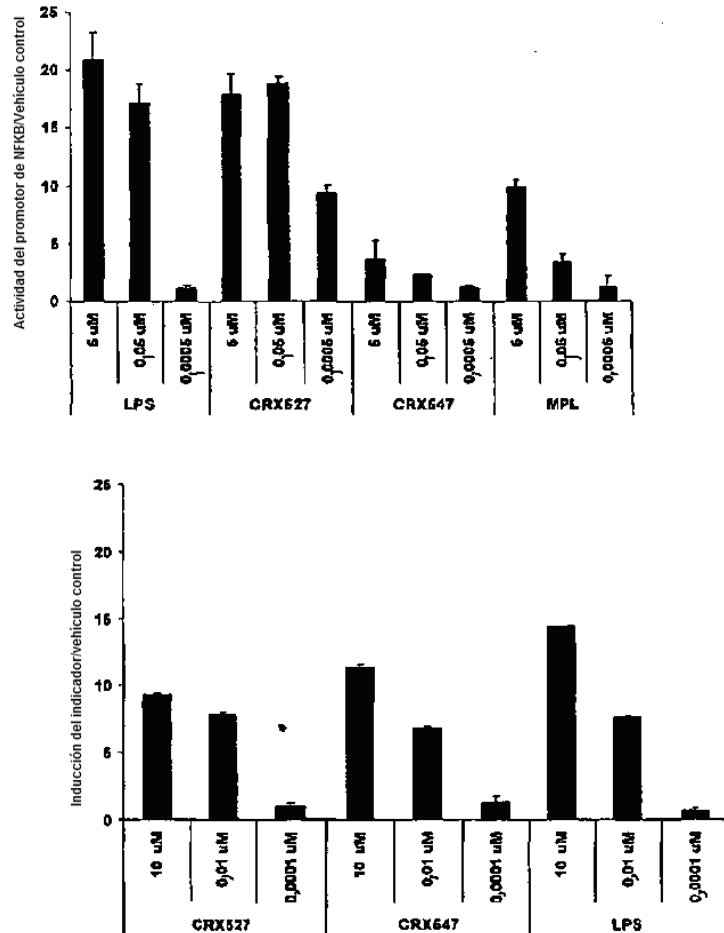


Figura 17. Inducción de la actividad promotora dependiente de NFκB por CRX-527, CRX-547, y LPS en las células HEK293 transfectadas con TLR4/MD-2/CD14 humano (arriba) y de ratón (abajo)

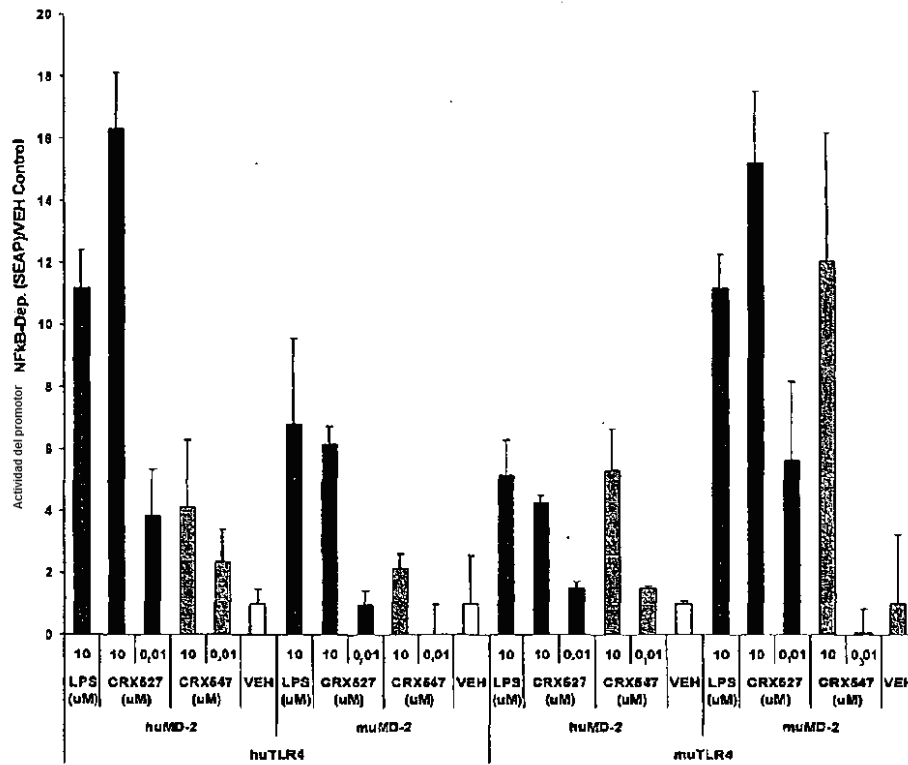


Figura 18.

Inducción de la actividad promotora dependiente de NFκB en las células HEK293 transfectadas con TLR4/MD-2 de ser humano/ratón afín o combinaciones quiméricas (huTLR4/muMD2 o muTLR4/huMD-2).

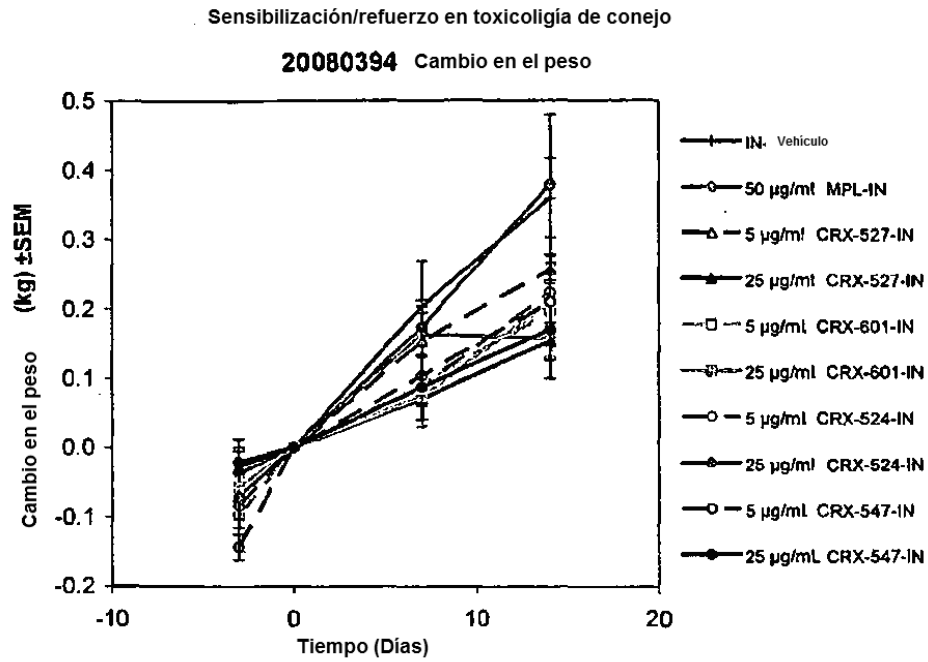


Figura 19. Cambio en el peso en conejos tratados con los agonistas indicados.

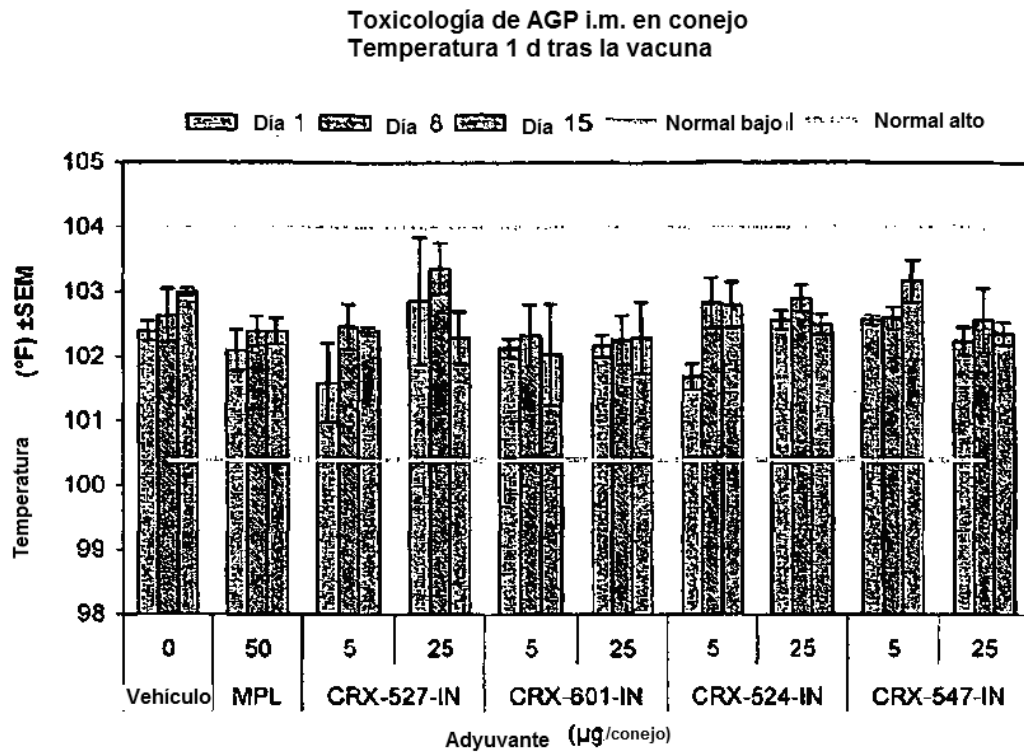


Figura 20. Temperatura posvacunación en conejos tratados con el agonista indicado.

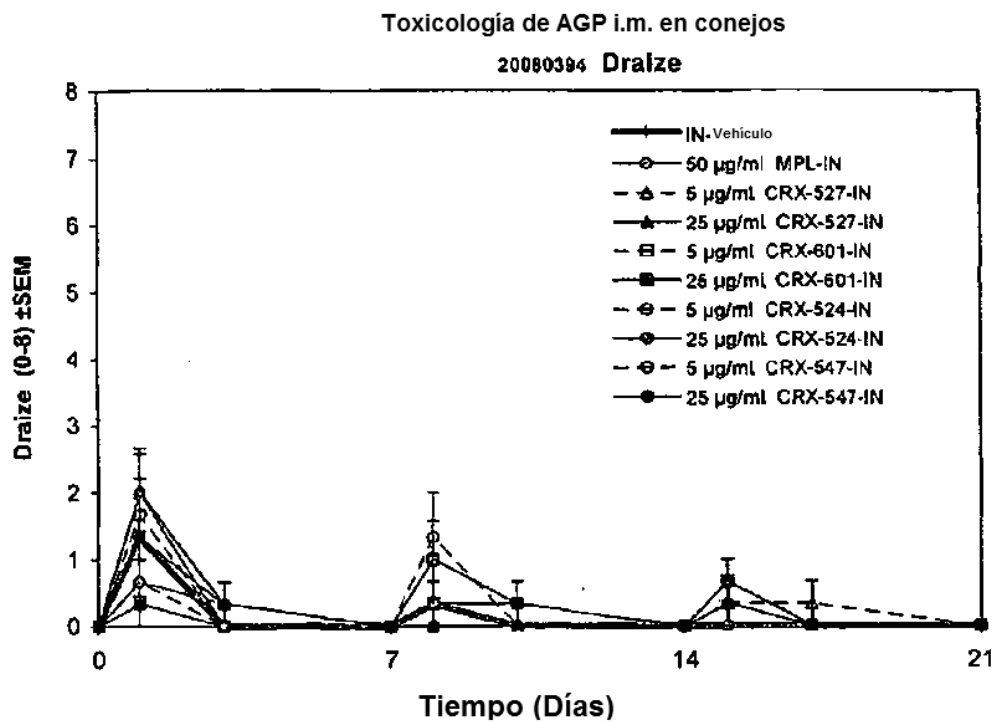


Figura 21. Reactividad en el lugar de la inyección por Draize en conejos tratados con los agonistas indicados.

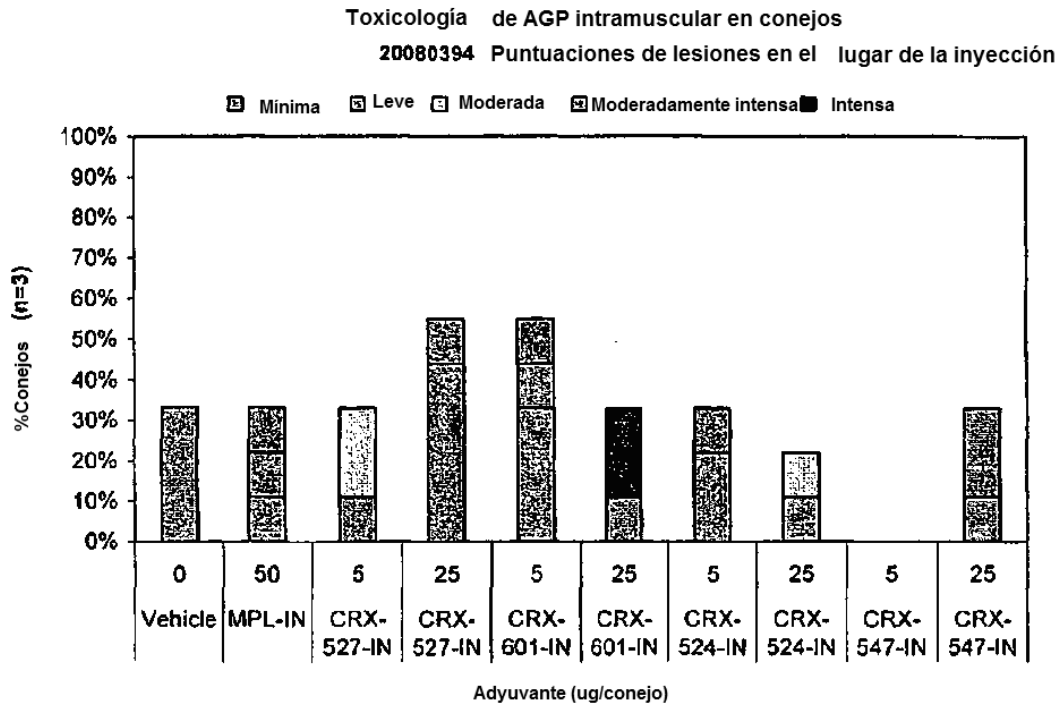


Figura 22. Histopatología en el sitio de inyección en conejos tratados con los agonistas indicados.

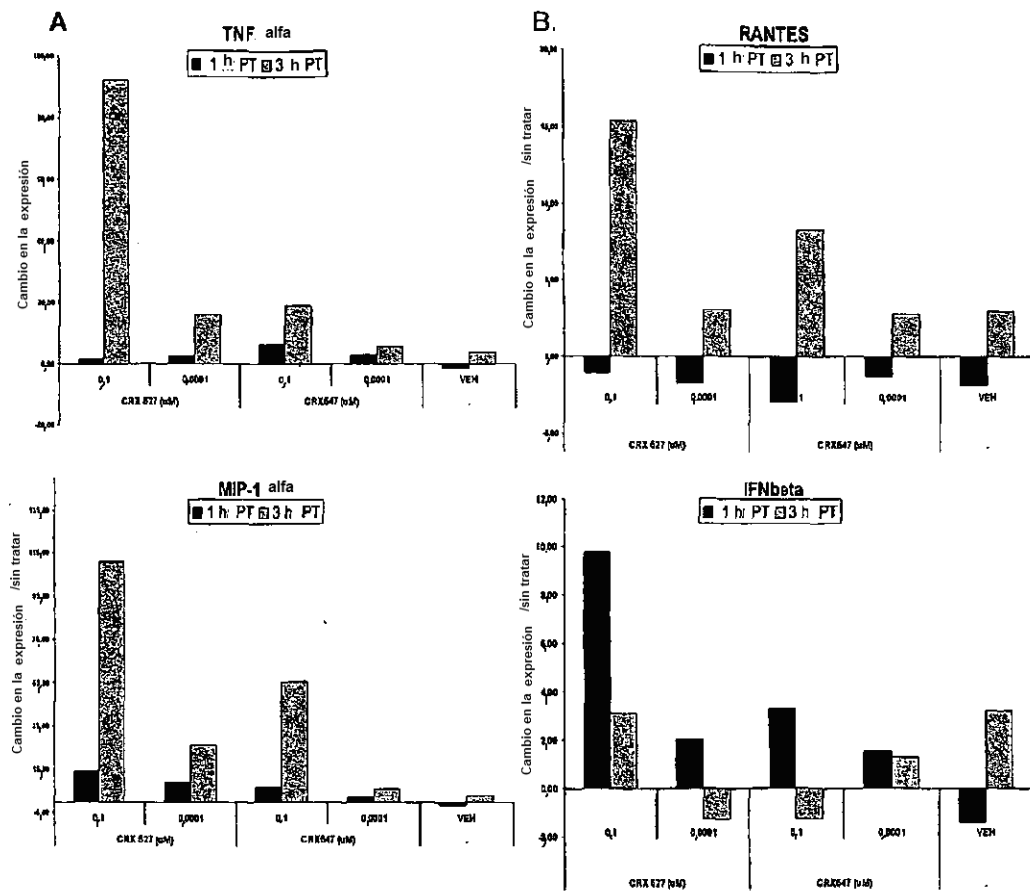
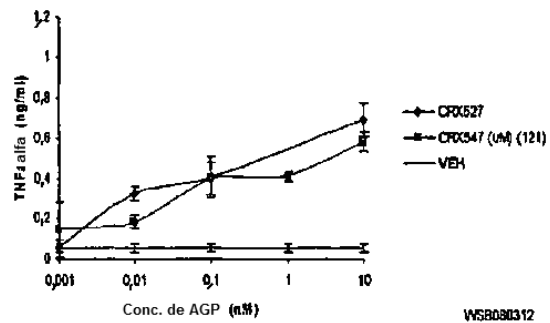


Figura 23. Inducción de la expresión de genes de citocinas/quimiocinas (A) dependientes de MyD88 y (B) dependientes de TRIF en monocitos derivados de PBMC humanos tras el tratamiento con CRX-527 o CRX-547 0,01 uM.

PBMC de Balb/c estimuladas con CRX-527 y CRX-547 durante 14 h



PBMC de Balb/c estimuladas con CRX-527 y CRX-547 durante 14 h

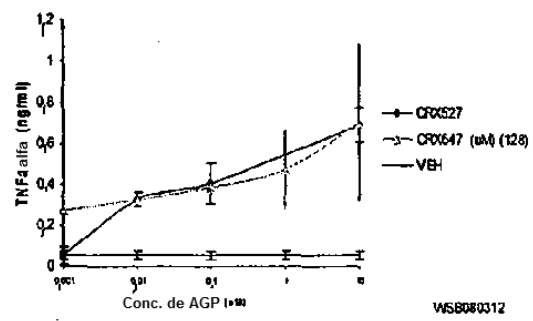


Figura 24. PBMC de ratones BALB/c analizados con CRX-547 (dos lotes) y CRX-527 (experimento realizado una vez).

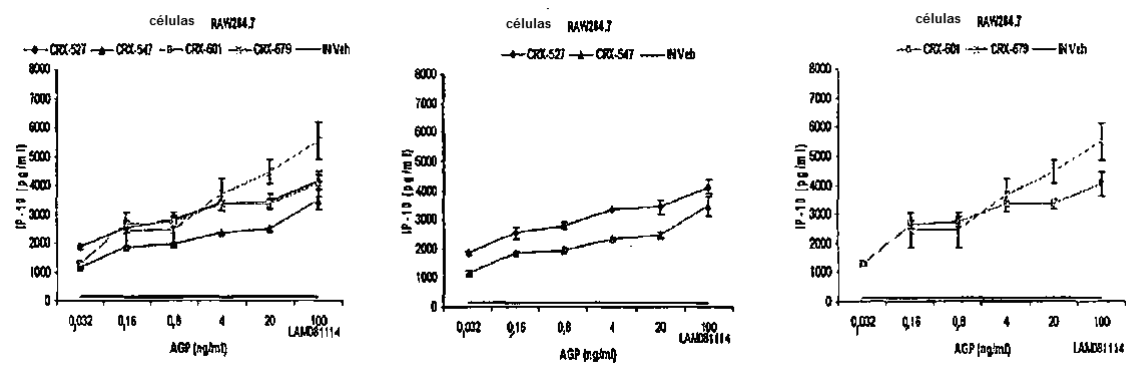


Figura 25. Inducción de dependientes de TRIF (IP-10) por CRX-527, CRX-547, Compuesto 1a y 1b

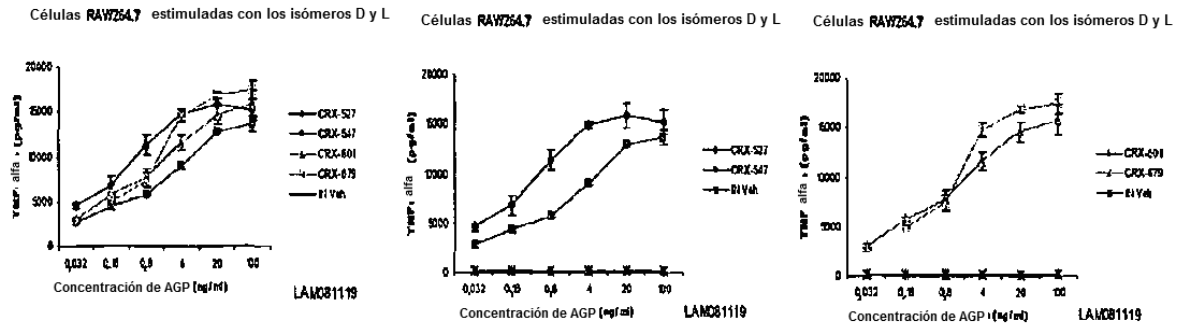


Figura 26. Inducción de citocinas/quimiocinas dependientes de MyD88 (TNFα) por CRX-527, CRX-547, Compuesto 1a y 1b.

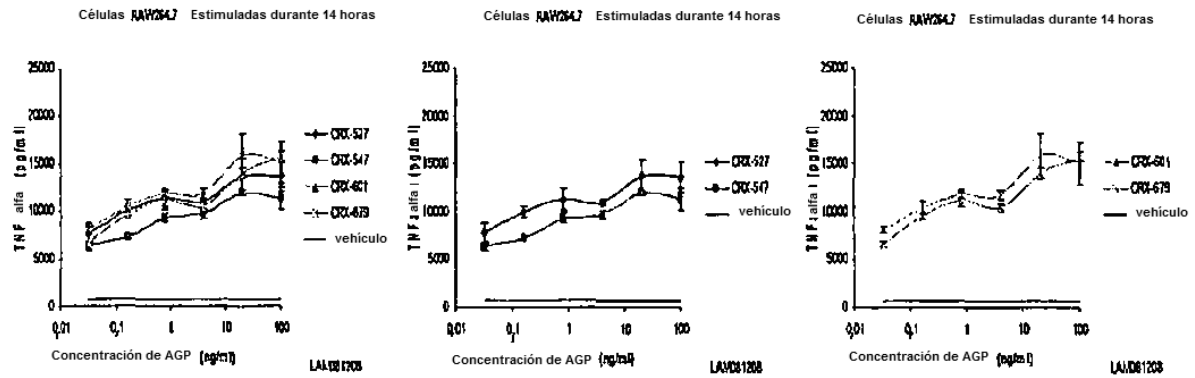


Figura 27. Niveles de TNF α después de cuatro horas de estimulación con AGP y sus isómeros D.

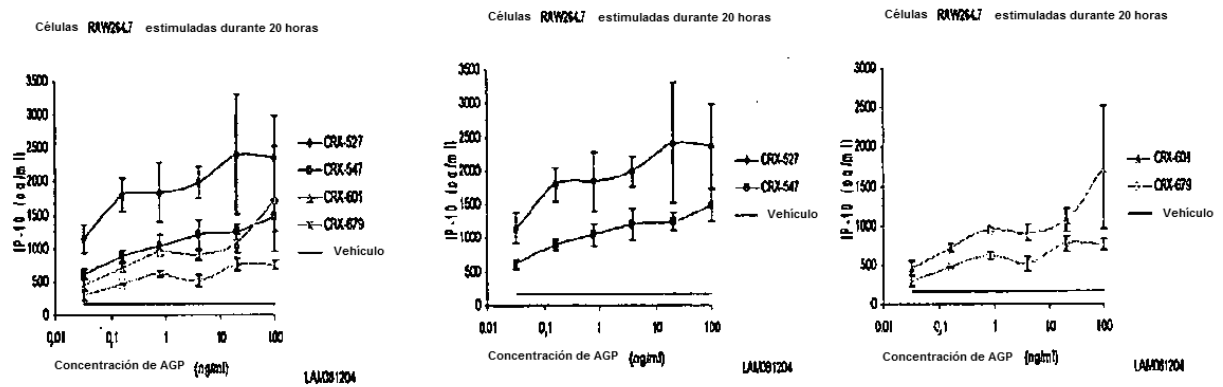


Figura 28. Niveles de IP-10 después de cuatro horas de estimulación con AGP y sus isómeros D.

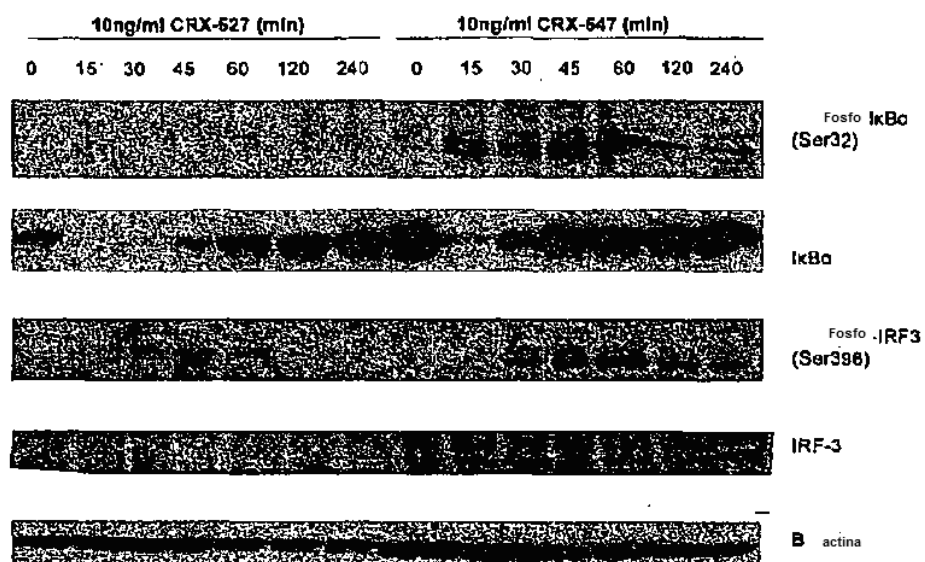


Figura 29. Análisis de transferencia tipo Western de las proteínas de señalización tras estimulación con CRX-547 y CRX-527 en células RAW264.7

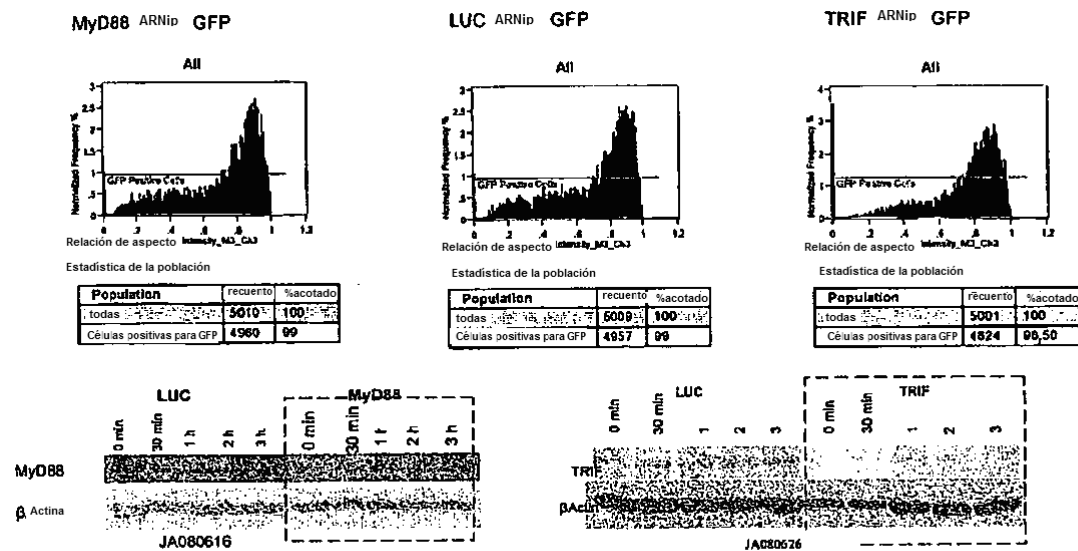


Figura 30. Células RAW264.7 transfectadas de forma estable

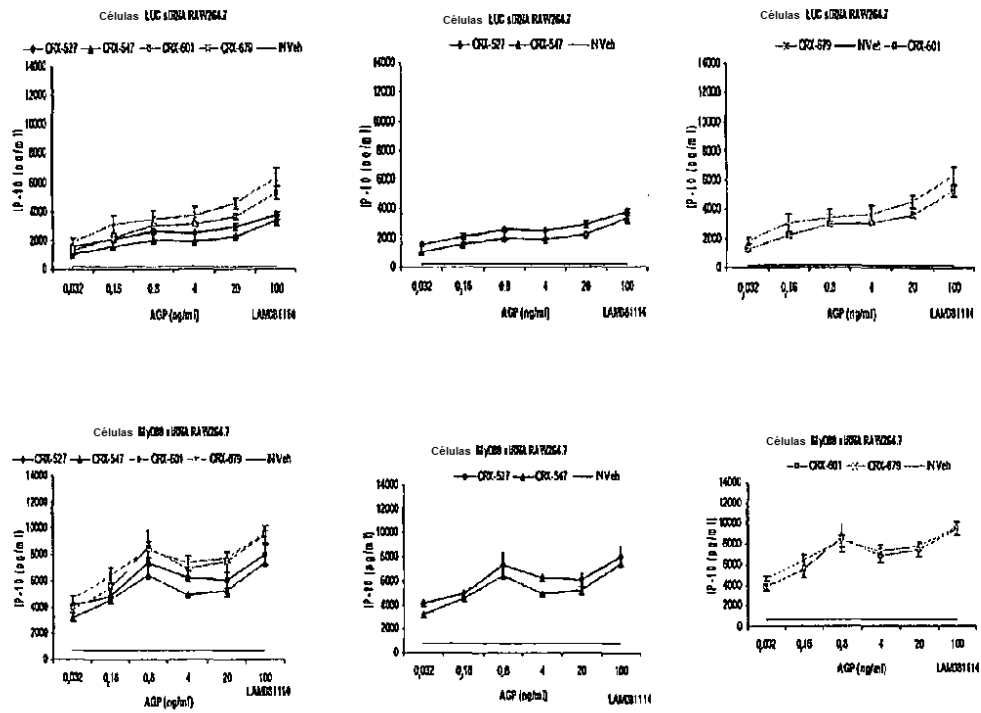


Figura 31. Producción de IP-10 tras 20 horas de estimulación con los isómeros L y D (líneas celulares de ARNip en comparación con el control irrelevante en cada experimento).

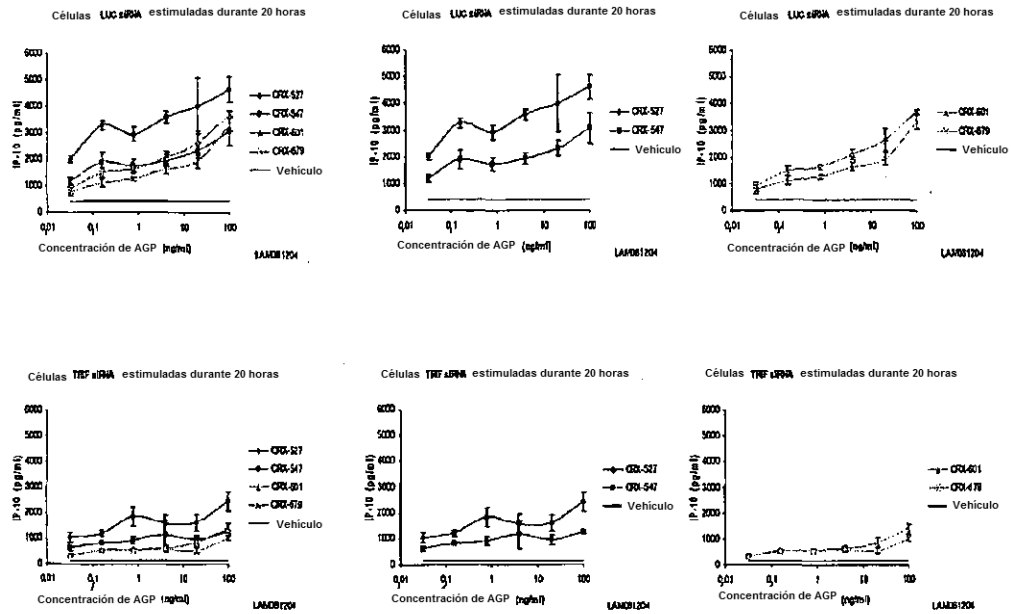


Figura 32. Producción de IP-10 tras 20 horas de estimulación con los isómeros L y D (líneas celulares de ARNip en comparación con el control irrelevante en cada experimento).

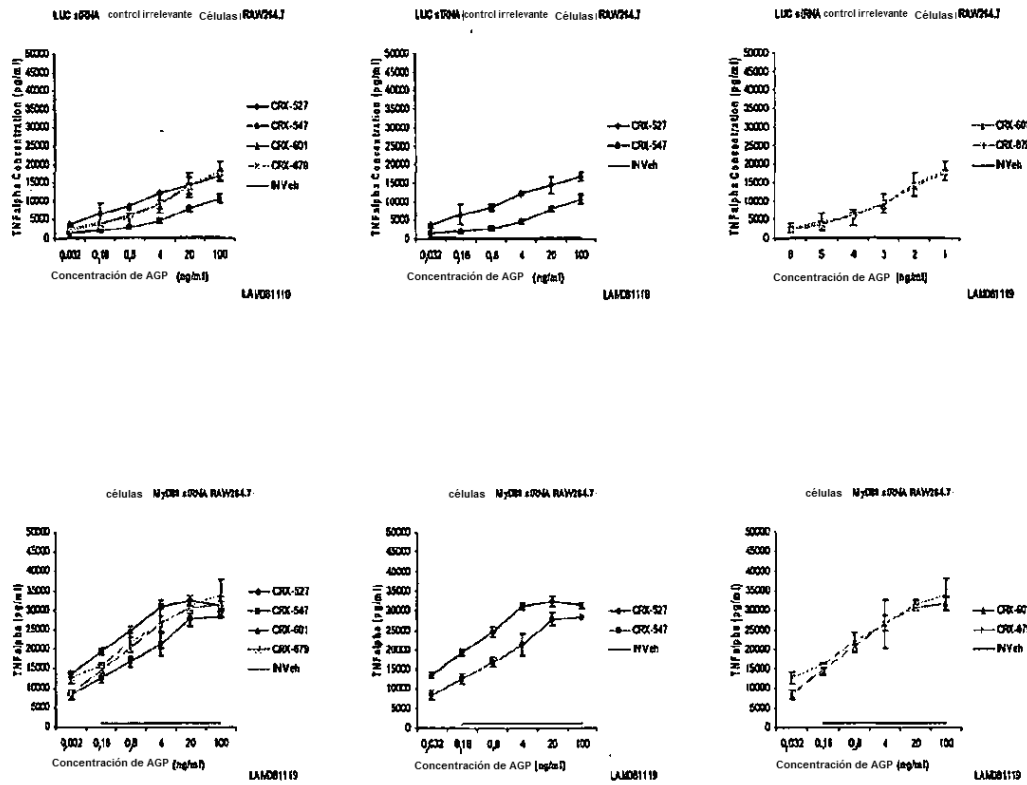


Figura 33. Producción de TNF α después de 20 horas de estimulación con los isómeros L y D.

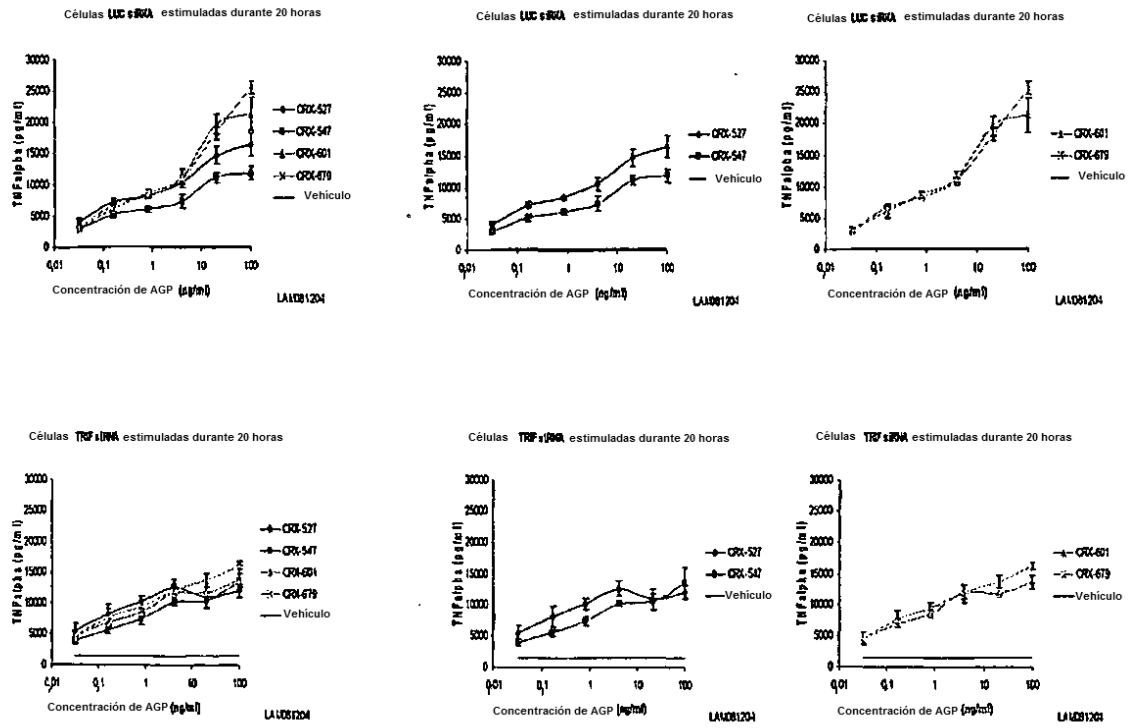


Figura 34. Producción de TNF α después de 20 horas de estimulación con los isómeros L y D.

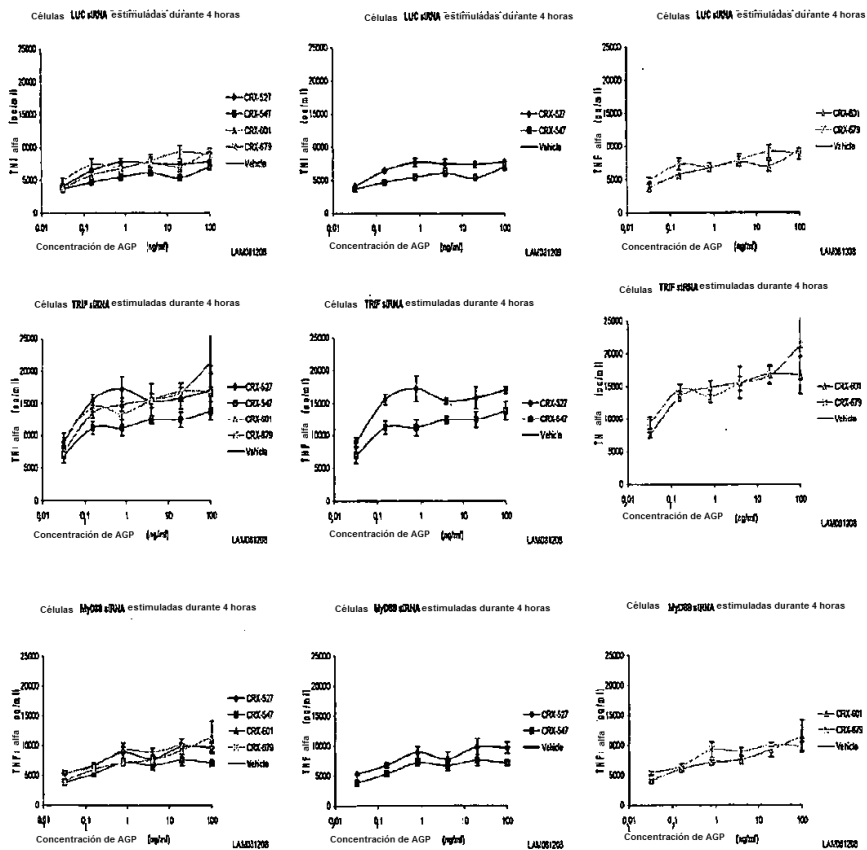


Figura 35. ARNip de líneas celulares RAW264.7 Siria estimuladas durante 4 horas con CRX-527, CRX-547, Compuestos 1a y 1b para la producción de TNFα