

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 928**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

C07H 15/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008 E 08846406 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2231196**

54 Título: **Aumento de la respuesta inmunitaria por conjugación con antígenos peptídicos**

30 Prioridad:

07.11.2007 EP 07291336

07.11.2007 US 996226 P

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

30.09.2016

73 Titular/es:

ABIVAX (100.0%)

5 rue de la Baume

75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

SERRA, VINCENT

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 584 928 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

Aumento de la respuesta inmunitaria por conjugación con antígenos peptídicos

5 **[0001]** La presente invención se refiere a una célula NKT que activa glucolípidos unidos de forma covalente a antígenos peptídicos.

[0002] También se describen compuestos que consisten en glucolípidos unidos de forma covalente a un antígeno o un fármaco por medio de un conector. Dichos compuestos son capaces de inducir una respuesta
10 inmunitaria más intensa que una composición que comprende los glucolípidos y el antígeno separados. Dichos compuestos son capaces también de dirigir un fármaco a células CD1d restringidas.

[0003] Las células T citolíticas naturales ("células NKT") forman una población de células efectoras/de memoria de tipo innato que expresan receptores citolíticos naturales (NK) y un receptor de linfocitos T (TCR)
15 semiinvariante conservado). Las células NKT se han relacionado con la supresión de la autoinmunidad y el rechazo a injertos, la promoción de resistencia a los patógenos y la promoción de inmunidad tumoral.

[0004] Las células NKT responden con producción vigorosa de citocina en el plazo de unas horas desde la activación TCR mediante la liberación de citocinas de tipo T_{H1} , lo que incluye $IFN-\gamma$ y TNF, así como citocinas de tipo
20 T_{H2} , lo que incluye IL-4 e IL-13. La modulación de estas respuestas de linfocinas es el principal efecto pretendido de los adyuvantes usados en composiciones inmunógenas.

[0005] Las células NKT reconocen antígenos lipídicos propios y extraños presentados por el miembro CD1d de la familia de moléculas asociadas a $\beta 2$ microglobulina. Se ha mostrado que diversos lípidos con estructuras
25 diferentes se unen a moléculas CD1d de una manera singular que da cabida a una cadena de ácidos grasos en cada una de las dos bolsas de unión hidrófobas (A' y F) de la molécula CD1d. Las especies de lípidos capaces de unión a moléculas CD1d incluyen ácidos micólicos, diacilgliceroles, esfingolípidos, poliisoprenoides, lipopéptidos, fosfomicocétidos y pequeños compuestos hidrófobos.

30 **[0006]** Una serie de moléculas lipídicas naturales y sintéticas son procesadas por células presentadoras de antígeno y presentadas por moléculas CD1 a las células NKT. El compuesto prototipo usado para estudiar la activación de células NKT *in vitro* y *in vivo* es KRN7000, y α -galactosiceramida (" α GalCer") obtenida de la esponja marina *Agelas mauritianus*. Los compuestos adicionales identificados recientemente incluyen isoglobotrihexosilceramida ("iGB3") que es un glucolípido endógeno que fue descrito en la solicitud de patente PCT
35 WO-2006/029.010, y PBS-57, una 6"-amino-6"-desoxigalactosiceramida modificada, que fue descrita en la solicitud PCT PCT/US2007/066250. Estos compuestos activan las células NKT y regulan por aumento las respuestas de la citocina *in vitro* y *in vivo*. En consecuencia, se ha propuesto usar dichos compuestos como adyuvantes para mejorar la eficacia de las vacunas cuando se administran conjuntamente con un antígeno (solicitud de patente PCT WO-2006/083.671).

40 **[0007]** En el contexto de la vacunación, el antígeno debe ser presentado por una célula de presentación de antígenos (APC), en particular células dendríticas (DC), ante los linfocitos T CD8+ y CD4+ convencionales a través de moléculas de MHC de clase I o clase II respectivamente con el fin de inducir una respuesta inmunitaria específica hacia este antígeno. Para este fin se inicia una activación recíproca de células NKT y células dendríticas tras la
45 presentación de α -galactosilceramidas por conversión de células dendríticas en células NKT, lo que induce una regulación por aumento de células NKT en CD40L y citocinas y quimiocinas Th1 y Th2. A continuación la reticulación de CD40 induce la regulación por aumento de células dendríticas a CD40, B7.1 y B7.2 e IL-12, que a su vez promueve la activación de células NKT y la producción de citocinas. La propagación de esta reacción implica la activación de citólisis de células NK y la producción de $IFN-\gamma$, y, lo que es más importante, la regulación por aumento
50 de propiedades de coestimulación de las células dendríticas y presentación de antígenos mediada por MHC de clase I y MHC de clase II.

[0008] Los glucolípidos, ligados directamente a un grupo indicador tal como un fluoróforo u otra molécula pequeña (por ejemplo, biotina), han sido propuestos como sondas para observar la asociación de glucolípido con
55 células NKT y CD1d (solicitud de patente PCT WO-2004/094.444). En particular, se ha usado fluoróforo y biotina añadida a 6"-amino-6"-desoxi-galactosilceramida para entender el papel de la estructura de glucolípidos en la unión a receptores de células NKT y CD1d. La tinción permitió observar el intercambio de glucolípidos y la cuantificación de su asociación con receptores de células NKT y CD1d y Zhou y col., Org. Lett. 2000 4:1267-1270). Se encontró que las 6"-amino-6"-desoxi-galactosilceramidas con adición de biotina, derivado de Prodan y dansilo estimulan las

NKT de forma similar al glucolípido de origen, lo que sugiere que estos compuestos experimentan endocitosis, carga de CD1d, presentación en la superficie celular y unión a receptores de linfocitos T que provocan la estimulación de linfocitos T. Sin embargo, Zhou y col. añadieron moléculas pequeñas al glucolípido para marcar las células NKT y/o células CD1d restringidas. Aún se desconoce si la adición de moléculas más grandes en la cadena de lípidos interfiere con la unión a CD1d. Además, hasta ahora no se han comunicado glucolípidos unidos a con antígenos o a fármacos.

Descripción de la invención

10 **[0009]** Sorprendentemente, los autores de la invención han encontrado que un compuesto consistente en un glucolípido unido de forma covalente a un antígeno por medio de un conector es capaz de activar una respuesta inmunitaria específica contra el antígeno más intensa que la respuesta observada cuando el glucolípido y el antígeno se coadministran por separado en una composición.

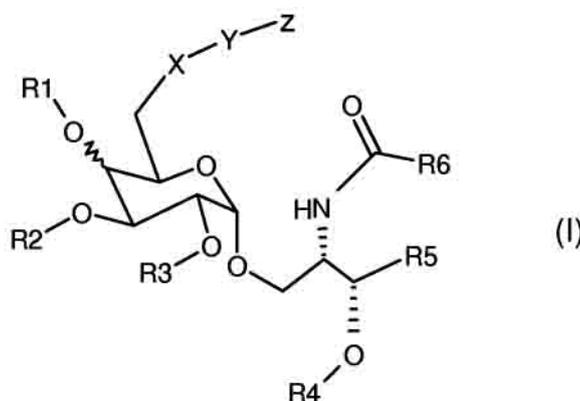
15 **[0010]** Sin querer estar limitado por ninguna teoría, se supone que, tras la coadministración del antígeno y el agonista de NKT a la misma APC, preferentemente el mismo linfocito B o la misma DC, el linfocito B y/o la DC son activados por la célula NKT y por tanto el antígeno será presentado a los linfocitos T convencionales por un linfocito B y/o una DC totalmente activados. La proximidad de una NKT activada puede ser útil cuando la APC presenta un antígeno a un linfocito T, dado que contribuirá al entorno de las citocinas.

20 **[0011]** Además, se describe el glucolípido unido de forma covalente a un fármaco, con lo que el glucolípido permite el direccionamiento específico del fármaco a las células NKT.

25 **[0012]** La presente invención se refiere así a compuestos consistentes en glucolípidos unidos de forma covalente por medio de un conector a un antígeno peptídico, y a usos de los mismos.

Compuesto consistente en glucolípido unido de forma covalente por medio de un conector a un antígeno o fármaco

30 **[0013]** Se describen compuestos que tienen la Fórmula (I)



en el que

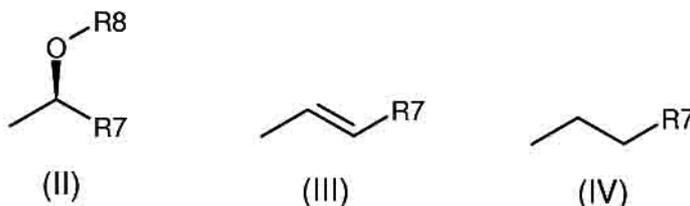
35 R₁, R₂, R₃, y R₄ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆, aralquilo C₆-C₁₂, o acilo C₁-C₆; y R₁ se sitúa por encima o por debajo del anillo del azúcar.

R₆ es

40 a) -(CH₂)_xCH₃ en el que x es un número entero seleccionado entre 1 y 100; o

b) -(CH₂)_xCH=CH(CH₂)_yCH₃ o -(CH₂)_xCH=CH(CH₂)_yCH=CH(CH₂)_zCH₃ en el que x, y y z son números enteros seleccionados independientemente entre 1 y 14.

45 R₅ es una de las fórmulas siguientes (II), (III) o (IV)



en el que R₈ es hidrógeno, alquilo C₁-C₆, aralquilo C₆-C₁₂, o acilo C₁-C₆, y

5

R₇ es un alquilo C₃-C₁₀₀ lineal o ramificado;

X es O, N o S;

10 Y es un grupo conector escindible o no escindible; y

Z es un antígeno o un fármaco una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0014] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "alquilo" se refiere a una cadena de
 15 hidrocarburos que puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada, que contiene el número indicado de
 átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁-C₁₂ indica que el grupo puede tener de 1 a 12 (inclusive) átomos de
 carbono. Los términos "arilalquilo" o "aralquilo" se refieren a una fracción alquilo en la que un átomo de hidrógeno del
 alquilo es sustituido por un grupo arilo. Los ejemplos de "arilalquilo" o "aralquilo" incluyen grupos bencilo y 9-
 fluorenilo.

20

[0015] El término "acilo" se refiere a un alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, arilcarbonilo, heterociclicarbonilo
 o un sustituyente de heteroarilcarbonilo, cualquiera de los cuales puede estar sustituido además por sustituyentes.

[0016] El término "cicloalquilo" tal como se emplea en la presente memoria descriptiva incluye grupos de
 25 hidrocarburos saturados cíclicos, bicíclicos, tricíclicos o policíclicos que tienen de 3 a 12 carbonos, en el que
 cualquier átomo del anillo susceptible de sustitución puede ser sustituido por un sustituyente. Los ejemplos de
 fracciones de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclohexilo y adamantilo.

[0017] El término "arilo" se refiere a un sistema cíclico de hidrocarburos aromáticos monocíclicos, bicíclicos o
 30 tricíclicos, en el que cualquier átomo del anillo susceptible de sustitución puede ser sustituido por un sustituyente.
 Los ejemplos de fracciones de arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo y antraceno.

[0018] El término "heterociclilo" se refiere a un sistema cíclico no aromático monocíclico de 3 a 10 miembros,
 bicíclico de 8 a 12 miembros o tricíclico de 11 a 14 miembros que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6
 35 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, estando dichos heteroátomos seleccionados entre O,
 N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 o 1-9 heteroátomos de N, O, o S si es monocíclico, bicíclico o
 tricíclico, respectivamente), en el que cualquier átomo del anillo susceptible de sustitución puede ser sustituido por
 un sustituyente.

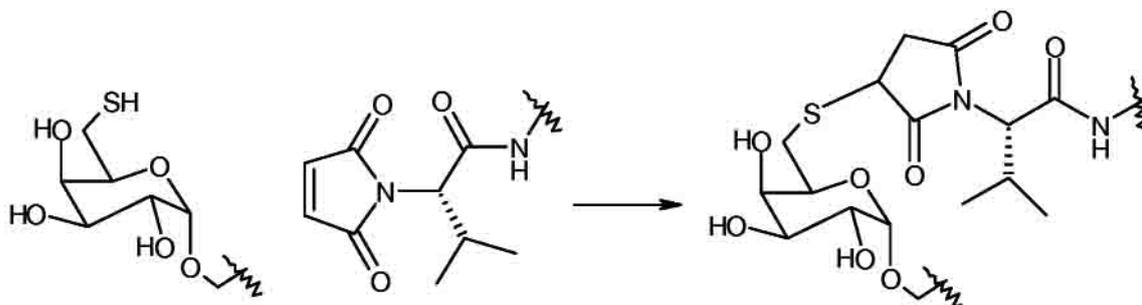
[0019] El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillos aromático monocíclico de 5-8 miembros,
 40 bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6
 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, estando dichos heteroátomos seleccionados entre O,
 N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6, o 1-9 heteroátomos de N, O, o S si es monocíclico, bicíclico o
 tricíclico, respectivamente), en el que cualquier átomo del anillo susceptible de sustitución puede ser sustituido por
 45 un sustituyente.

[0020] El término "oxo" se refiere a un átomo de oxígeno, que forma un carbonilo cuando está unido a
 carbono, un N-óxido cuando está unido a nitrógeno y un sulfóxido o sulfona cuando está unido a azufre.

50 **[0021]** El término "sustituyentes" se refiere a un grupo "sustituido" en un grupo alquilo, cicloalquilo,
 heterociclilo, arilo o heteroarilo en cualquier átomo de ese grupo. Los sustituyentes adecuados incluyen, sin
 limitación, alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, halo, hidroxilo, ciano, nitro, amino, SO₃H, sulfato, fosfato,

- perfluoroalquilo, perfluoroalcoxi, metilendioxi, etilendioxi, carboxilo, oxo, tioxo, imino (alquilo, arilo, aralquilo), S(O)_n alquilo (en el que n es 0-2), S(O)_n arilo (en el que n es 0-2), S(O)_n heteroarilo (en el que n es 0-2), S(O)_n heterociclilo (en el que n es 0-2), amina (mono-, di-, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, heteroaralquilo, y combinaciones de los mismos), éster (alquilo, aralquilo, heteroaralquilo), amida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo, y combinaciones de los mismos), sulfonamida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo, y combinaciones de los mismos), arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, heterociclilo no sustituido y cicloalquilo no sustituido.
- [0022]** R₆ puede tener de 1 a 100 grupos metileno (CH₂) (es decir, R₆ es (CH₂)_xCH₃ y x = 1-100). En particular R₆ puede tener 1-75 grupos CH₂, 1-50 grupos CH₂, 1-25 grupos CH₂, 1-20 grupos CH₂, 1-15 grupos CH₂, 1-10 grupos CH₂ o 1-5 grupos CH₂. Preferentemente, R₆ tiene grupos 15-25 CH₂. Más preferentemente, R₆ tiene grupos 20-25 CH₂.
- [0023]** En algunas realizaciones R₆ contiene 22 ó 24 grupos CH₂ (x = 22 o x = 24).
- 15 **[0024]** R₇ puede ser en particular un alquilo C₃-C₇₅, alquilo C₃-C₅₀, alquilo C₃-C₂₅, alquilo C₃-C₂₀, alquilo C₃-C₁₅, alquilo C₁₀-C₁₅ o alquilo C₃-C₁₀ lineal o ramificado.
- [0025]** En algunas realizaciones R₇ es un grupo alquilo no ramificado de 14 átomos de carbono.
- 20 **[0026]** Preferentemente R₆ es C₂₅H₅₁ y R₇ es C₁₄H₂₉. Más preferentemente, R₆ es C₂₃H₄₅ y R₇ es C₁₄H₂₉. En otra realización preferida, R₆ es C₂₃H₄₇ y R₇ es C₁₄H₂₉.
- [0027]** Cuando R₁-R₃ son distintos de hidrógeno, preferentemente cada uno son independientemente metilo, bencilo o acetilo.
- 25 **[0028]** Según una realización (referida en lo sucesivo como PBS-6), R₁, R₂, R₃, R₄ y R₈ son hidrógeno, R₅ es (II), R₆ es C₂₅H₅₁, R₇ es C₁₄H₂₉ y X es N.
- [0029]** Según otra realización (referida en lo sucesivo como PBS-57), R₁, R₂, R₃, R₄ y R₈ son hidrógeno, R₅ es (II), R₆ es C₂₃H₄₅, R₇ es C₁₄H₂₉ y X es N.
- 30 **[0030]** Según otra realización más (referida en lo sucesivo como PBS-14), R₁, R₂, R₃, R₄ y R₈ son hidrógeno, R₅ es (II), R₆ es C₂₅H₅₁, R₇ es C₁₄H₂₉ y X es N.
- 35 **[0031]** En otra realización (referida en lo sucesivo como PBS-96), R₁, R₂, R₃, R₄ y R₈ son hidrógeno, R₅ es (II), R₆ es C₂₃H₄₇, R₇ es C₁₄H₂₉ y X es N.
- [0032]** Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales ácidas adecuadas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formato, fumarato, glucoheptanoato, glucolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Otros ácidos, como el oxálico, aunque en sí mismos no son farmacéuticamente aceptables, pueden emplearse en la preparación de sales útiles como productos intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables. Las sales obtenidas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), amonio y N-(alquilo)₄⁺. La presente invención también contempla la cuaternización de cualquier grupo básico que contenga nitrógeno de los compuestos desvelados en la presente memoria descriptiva. Mediante esta cuaternización pueden obtenerse productos dispersables solubles en agua o en aceite. Las formas salinas de los compuestos de la fórmula de la presente memoria descriptiva pueden ser sales de aminoácidos de grupos carboxi (por ejemplo, sales de L-arginina, lisina e histidina).
- 45 **[0033]** La fracción de glucolípido de los compuestos según la invención descritos anteriormente puede sintetizarse tal como se desvela en la solicitud de patente internacional WO-2004/094.444.
- [0034]** El acoplamiento de la fracción de conector-antígeno o fármaco (Y-Z) en la fracción de glucolípido puede realizarse según el procedimiento descrito en Zhou y col. (Org. Lett. 2000 4:1267-1270).

[0035] En el siguiente esquema I se muestra un ejemplo de conjugación del antígeno peptídico:



5

Esquema I

[0036] Para obtener dicha conjugación de antígeno peptídico, el péptido puede disolverse a 50-100 μM en un tampón adecuado a pH 7,0-7,5 a temperatura ambiente. La reducción de los enlaces disulfuro en el péptido puede realizarse añadiendo un exceso molar de 10 veces de un agente reductor tal como DTT o TCEP. El glucolípido que contiene el grupo reactivo puede añadirse gota a gota a la solución peptídica con agitación, hasta una proporción final de 10-20 moles de glucolípido por cada mol de péptido. Puede dejarse proseguir la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. El conjugado puede separarse finalmente en una columna de filtración de gel.

15

[0037] El grupo conector Y puede ser cualquier cadena o anillo que contenga carbono. Por ejemplo, el conector puede ser $-(\text{CH}_2)_t-$, en el que la cadena contiene opcionalmente uno o más heteroátomos terminales (por ejemplo, N, O, S), y/o uno o más heteroátomos, anillos, dobles enlaces, triples enlaces que se introducen en la cadena. El valor de "t" puede ser de 1-20, preferentemente 3-10.

20

[0038] En una realización preferida de la presente invención, el conector está formado por 6 carbonos.

[0039] Preferentemente, el conector contiene un sitio de escisión proteolítica, en particular un sitio de escisión endolisosómico de proteasa. Alternativamente, el grupo conector contiene un sitio de escisión de lipasa. En particular, el grupo conector puede contener un sitio de escisión de proteasa y/o un sitio de escisión de lipasa.

25

[0040] Preferentemente, el compuesto según la presente invención es capaz de unirse a un monómero o tetrámero CD1d. Más preferentemente, este compuesto es capaz de activar una célula NKT.

[0041] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un "antígeno" se refiere a cualquier sustancia o material que es reconocido específicamente por una entidad de unión del sistema inmunitario, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que comprende el paratopo o un receptor de linfocitos T (TCR).

30

[0042] De forma adecuada, los antígenos del compuesto de Fórmula (I) se obtienen de agentes infecciosos atenuados o muertos. Pueden usarse microorganismos enteros o partes de los mismos (por ejemplo, membranas fantasmas; preparaciones de membrana en crudo, lisados y otras preparaciones de microorganismos). Los agentes infecciosos adecuados a partir de los cuales puede obtenerse un antígeno incluyen, pero no se limitan a, patógenos y microorganismos tal como bacterias, parásitos y virus. En algunos contextos, los antígenos adecuados se obtienen o se derivan de un patógeno vírico que se asocia con una enfermedad humana lo que incluye, pero no se limita a, VIH/SIDA (*Retroviridae*, por ejemplo, moléculas gp120 para aislados de VIH-1 y VIH-2, HTLV-I, HTLV-11), virus de la gripe (*Orthomyxoviridae*, por ejemplo, tipos A, B y C), herpes (por ejemplo, virus del herpes simple, HSV-1 y HSV-2 glucoproteínas gB, gD y gH), infecciones por rotavirus (*Reoviridae*), infecciones respiratorias (virus de la parainfluenza y virus sincitial respiratorio), poliomielitis (*Picornaviridae*, por ejemplo, poliovirus, rinovirus), sarampión y paroditidis (*Paramyxoviridae*), rubeola (*Togaviridae*, por ejemplo, virus de la rubeola), hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis tipos A, B, C, D, E y/o G), citomegalovirus (por ejemplo, gB y gH), gastroenteritis (*Caliciviridae*), fiebre amarilla y fiebre del Nilo occidental (*Flaviviridae*), rabia (*Rhabdoviridae*), fiebre hemorrágica coreana (*Bunyaviridae*), fiebre venezolana (*Arenaviridae*), verrugas (Papillomavirus), virus de inmunodeficiencia de los simios, virus de la encefalitis, virus de la varicela-zóster, virus de Epstein-Barr y otras familias de virus, que incluyen *Coronaviridae*,

35

40

45

Birnaviridae y *Filoviridae*.

[0043] Los antígenos bacterianos y de parásitos adecuados pueden obtenerse o derivarse también de agentes conocidos responsables de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, difteria, tos ferina, tétano, tuberculosis, neumonía bacteriana o fúngica, otitis media, gonorrea, cólera, fiebres tifoideas, meningitis, mononucleosis, plaga, shigelosis o salmonelosis, enfermedad del legionario, enfermedad de Lyme, lepra, malaria, anquilostoma, oncocercosis, esquistosomiasis, tripanosomiasis, leishmaniasis, giardiasis, amebiasis, filariasis, Borrelia y triquinosis. Otros antígenos pueden obtenerse o derivarse de patógenos no convencionales tales como los agentes causantes de kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), scrapie, encefalopatía de visión transmisible, y enfermedades debilitantes crónicas, o de partículas infecciosas proteináceas tales como los priones que se asocian con la enfermedad de las vacas locas.

[0044] Otros patógenos específicos de los que pueden obtenerse los antígenos incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A y B), *pneumococcus*, *meningococcus*, *Haemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, *Moraxella catarrhalis*, *donovanosis* y *actinomycosis*; los patógenos fúngicos incluyen candidiasis y aspergilosis; los patógenos parasitarios incluyen *Taenia*, duelas, ascárides, amebiasis, giardiasis, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, *trichomoniasis* y *trichinosis*. La presente invención puede usarse también para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada contra numerosas enfermedades veterinarias, tales como glosopeda, coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter*, *Strongylus vulgaris*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Bordetella pertussis*, *parapertussis* y *brochiseptica*.

[0045] En otras realizaciones, los antígenos para unión a glucolípidos que pueden usarse son antígenos derivados de tumores o células tumorales enteras autólogas o alógenas. De forma adecuada, el antígeno tumoral es un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). En la técnica se conocen varios antígenos tumorales y sus patrones de expresión y pueden seleccionarse basándose en el tipo de tumor que se trata. Los ejemplos no limitativos de antígenos tumorales incluyen cdk4 (melanoma), β -catenina (melanoma), caspasa-8 (carcinoma de células escamosas), MAGE-1 y MAGE-3 (melanoma, mama, glioma), tirosinasa (melanoma), idiotipo Ig de superficie (por ejemplo, BCR) (linfoma), Her-2/neu (mama, ovario), MUC-1 (mama, páncreas) y HPV E6 y E7 (carcinoma de cuello de útero). Los antígenos tumorales adecuados adicionales incluyen antígeno prostático específico (PSA), sialilo Tn (STn), proteínas de choque térmico y péptidos tumorales asociados (por ejemplo, gp96), moléculas de gangliósidos (por ejemplo, GM2, GD2 y GD3), antígeno carcinoembrionario (CEA) y MART-1.

[0046] Se describe también un fármaco que se añade al glucolípido. Los ejemplos de fármacos adecuados incluyen ciclosporina, FK 506 y rapamicina.

40 *Vacuna y composiciones farmacéuticas*

[0047] Se describe una composición de vacuna que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en el que Z es un antígeno.

45 **[0048]** "Vacuna" se refiere a una composición que, cuando se administra a un sujeto, induce respuestas inmunitarias celular y/o humoral tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

[0049] En el contexto de la invención, "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero no humano o humano. Los ejemplos de mamíferos no humanos incluyen roedores y primates. Con la máxima preferencia, el sujeto es un ser humano.

[0050] La invención también proporciona un procedimiento para inducir, en particular estimular, una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende la administración al sujeto de dicho compuesto o composición de vacuna según la invención.

55 **[0051]** En el contexto de la invención, "estimular una respuesta inmunitaria" se refiere a reforzar una respuesta inmunitaria que ha sido inducida por la presencia de un antígeno.

[0052] En una realización preferida, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral. Tal como

se usa en la presente memoria descriptiva, una "respuesta inmunitaria humoral" es la producción de anticuerpos por linfocitos B, y el proceso accesorio que la acompaña, lo que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, activación de Th2 y producción de citocinas, formación de centros germinales y cambio de isotipo, producción de maduración de afinidad y generación de células de memoria. Con el fin de determinar si se estimula una respuesta inmunitaria humoral, puede realizarse una comparación cuantitativa de la señal en una muestra de un sujeto vacunado con el compuesto o composición de vacuna definida anteriormente con una muestra de un sujeto vacunado con antígeno en solitario. La respuesta inmunitaria humoral puede evaluarse midiendo las funciones de efector de los anticuerpos, lo que incluye neutralización de patógenos o toxinas, activación de complemento clásico y promoción por opsonina de eliminación de fagocitosina y patógeno. Los anticuerpos producidos en respuesta a la administración del compuesto o composición de vacuna definidos anteriormente y un antígeno puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, IgM, IgA o IgG. La respuesta inmunitaria humoral puede someterse a ensayo mediante cualquier procedimiento cuantitativo conocido en la técnica, por ejemplo, ELISA, ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID), inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI).

15 **[0053]** En otra realización preferida, la estimulación de una respuesta inmunitaria corresponde a la activación de linfocitos T CD4+. Tal como se entiende en la técnica, linfocitos T CD4+, o "linfocitos T cooperadores", son células que reconocen los antígenos presentados por el marcador de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase II en la superficie de las células presentadoras de antígeno, y secretan linfocinas para estimular las ramas mediadas por células y mediadas por anticuerpos del sistema inmunitario. La activación de linfocitos T CD4+ promueve la secreción de linfocinas, el cambio de isotipos de inmunoglobulinas, la maduración de afinidad de la respuesta de anticuerpos, la activación de macrófagos y el fomento de la actividad de células citolíticas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos (CTL). Las linfocinas son proteínas secretadas por linfocitos que afectan a su propia actividad y/o a la actividad de otras células. Las linfocinas incluyen, pero no se limitan a, interleucinas y citocinas, por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 o INF γ . Con el fin de determinar si se activan linfocitos T CD4+, puede realizarse una comparación cuantitativa de la señal en una muestra de un sujeto vacunado con el compuesto o composición de vacuna tal como se define anteriormente con una muestra de un sujeto vacunado con antígeno en solitario. Los procedimientos para someter a ensayo la activación de linfocitos T CD4+ son conocidos en la técnica.

20 **[0054]** En otra realización preferida, la estimulación de una respuesta inmunitaria corresponde a la activación de linfocitos T CD8+. Los linfocitos T CD8+ reconocen los antígenos presentados por moléculas MHC de clase I (presentes en todas las células con núcleo). La participación del complejo peptídico de MHC de clase I produce el suministro de gránulos líticos a la célula diana lo que provoca la lisis de la célula diana. Los procedimientos usados para someter a ensayo la activación de linfocitos T CD8+ son conocidos en la técnica, e incluyen pero no se limitan a ELISPOT, ELISA y ensayos citotóxicos. Alternativamente, puede usarse un modelo de ratón usarse para supervisar la activación de linfocitos T CD8+ usando un ensayo de fluorescencia para medir la citotoxicidad mediada por células, tal como se describe en Hermans y col. (2004) J. Immunol. Meth. 285:25-40.

25 **[0055]** Las cantidades posológicas eficaces del compuesto de Fórmula (I) en las composiciones de vacunas pueden ser determinadas por los expertos en la materia, aunque normalmente están comprendidas entre aproximadamente 1 microgramo y aproximadamente 10.000 microgramos por kilogramo de peso corporal, aunque normalmente son de aproximadamente 1.000 microgramos o menos por kilogramo de peso corporal. En algunas realizaciones, la cantidad posológica eficaz está comprendida entre aproximadamente 10 y aproximadamente 5.000 microgramos por kilogramo de peso corporal. En otra realización, la cantidad posológica eficaz está comprendida entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1.000 microgramos por kilogramo de peso corporal. En otra realización, la cantidad posológica eficaz está comprendida entre aproximadamente 75 y aproximadamente 500 microgramos por kilogramo de peso corporal. La composición puede administrarse en una sola dosis, o dividirse en dosis múltiples durante un periodo de semanas o meses. Se observará que la dosificación de antígeno dependerá del antígeno específico, y de la edad y el estado de inmunidad del sujeto, así como otros factores relevantes que pueden ser determinados por los expertos en la materia.

30 **[0056]** La administración de una vacuna de la invención puede producir de forma adecuada un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad infecciosa o una enfermedad relacionada con un agente infeccioso. "Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad infecciosa incluye uno o más de lo siguiente: (1) inhibición de la infección, es decir, prevención de que el agente infeccioso establezca una infección, (2) prevención de la difusión del agente infeccioso, es decir, a otras áreas del sujeto, o de un sujeto a otro, (3) limitación de la gravedad de la enfermedad, (4) prevención de infecciones recurrentes, es decir, limitación de la reactivación de infecciones latentes o persistentes, y (5) paliación de los síntomas de la enfermedad infecciosa.

35 **[0057]** Se describe una composición farmacéutica que contiene un compuesto de Fórmula (I) en el que Z es

un fármaco.

[0058] Se describe también un procedimiento de tratamiento de un sujeto necesitado del mismo que comprende la administración a dicho sujeto de dicho compuesto o composición farmacéutica.

5

[0059] "Una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto que confiere un efecto terapéutico en el sujeto tratado. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, mensurable por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto ofrece una indicación o siente un efecto). Una cantidad eficaz del compuesto descrito anteriormente puede estar comprendida entre aproximadamente 0,01 µg/kg y aproximadamente 500 µg/kg, 10 alternativamente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 µg/kg, alternativamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 µg/kg. Las dosis eficaces también variarán dependiendo de la ruta de administración, así como de la posibilidad de uso conjunto con otros agentes.

[0060] Como observarán los expertos en la materia, vacunas son formuladas de forma adecuada para ser 15 compatible con la vía de administración pretendida. Los ejemplos de vías de administración adecuadas incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal.

[0061] Preferentemente, las vacunas según la invención pueden administrarse por vía intramuscular, 20 intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intranasal, enteral o por inhalación. Con la máxima preferencia, las vacunas según la invención se administran por vía intramuscular o subcutánea.

[0062] La vacuna puede incluir también un vehículo fisiológicamente aceptable. Un vehículo "fisiológicamente 25 aceptable" es cualquier vehículo que sea adecuado para la administración *in vivo* (por ejemplo, administración oral, transdérmica o parenteral) o uso *in vitro*, es decir, cultivo celular. Los vehículos fisiológicamente adecuados para administración *in vivo* incluyen agua, soluciones tamponadas y soluciones de glucosa, entre otros. Los componentes adicionales de las composiciones pueden incluir de forma adecuada excipientes tales como estabilizantes, conservantes, diluyentes, emulsionantes o lubricantes, además del vehículo fisiológicamente 30 aceptable. En particular, los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, Tween 20, DMSO, sacarosa, L-histadina, polisorbato 20 y suero.

[0063] Los compuestos de la fórmula descrita en la presente memoria descriptiva pueden administrarse, por 35 ejemplo, por inyección, por vía intravenosa, intraarterial, subdérmica, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea; o por vía oral, bucal, nasal, transmucosa, tópica, en preparación oftálmica, o por inhalación, con una dosis comprendida entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, alternativamente dosificaciones entre 1 mg y 1.000 mg/dosis, cada 4 a 120 horas, o según los requisitos del fármaco en particular. Los procedimientos de la presente memoria descriptiva contemplan la administración de una cantidad eficaz de 40 compuesto o composición de compuesto para alcanzar el efecto deseado o indicado. Normalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces al día o alternativamente, como una infusión continua. Dicha administración puede usarse como una terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales de soporte para producir una única forma de dosificación variarán según el hospedador tratado y el modo de administración en particular. Una preparación típica contendrá de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 95% de compuesto 45 activo (p/p). Alternativamente, dichas preparaciones contienen de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 80% de compuesto activo.

[0064] Pueden requerirse dosis menores o mayores que las indicadas anteriormente. La dosificación y los 50 regímenes de tratamiento concretos para un paciente en particular dependerán de diversos factores, entre ellos la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el curso de la enfermedad, la dolencia o los síntomas, la disposición del paciente ante la enfermedad, la dolencia o los síntomas y el criterio del médico responsable.

[0065] Tras la mejoría del estado del paciente, puede administrarse una dosis de mantenimiento de un 55 compuesto, composición o combinación de la presente invención, si fuera necesario. Posteriormente, la dosis o la frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse en función de los síntomas, hasta un nivel para el que se mantiene la dolencia mejorada cuando los síntomas se han aliviado hasta el nivel deseado. Sin embargo, los pacientes pueden requerir un tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier recidiva de los síntomas de la enfermedad.

[0066] Las composiciones expuestas en la presente memoria descriptiva incluyen los compuestos de la fórmula expuestos en la presente memoria descriptiva, así como agentes terapéuticos adicionales si estuvieran presentes, en cantidades eficaces para conseguir una modulación de la enfermedad o de sus síntomas, que incluyen lo descrito en la presente memoria descriptiva.

[0067] El término "soporte farmacéuticamente aceptable" se refiere a un soporte que puede administrarse a un paciente, junto con un compuesto de la presente invención, y que no destruye la actividad farmacológica de los mismos y es no tóxico cuando se administra en dosis suficientes para suministrar una cantidad terapéutica del compuesto.

[0068] Los soportes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de suministro de fármacos en autoemulsión (SEDDS) tales como d- α -tocopherol polietilenglicol 1000 succinato, tensioactivos usados en formas de dosificación farmacéuticas tales como Tweens u otras matrices de suministro poliméricas similares, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias de tampón tal como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietilenpolioxipropileno, polietilenglicol y grasa de oveja. Las ciclodextrinas tales como α -, β - y γ -ciclodextrina, o derivados modificados químicamente tales como hidroxialquilciclodextrinas, que incluyen 2-y 3-hidroxipropil- β -ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados también pueden usarse ventajosamente para potenciar el suministro de compuestos de la fórmula descrita en la presente memoria descriptiva.

[0069] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse oralmente, parenteralmente, por inhalación con nebulizador, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o por medio de un reservorio implantado, preferentemente por administración oral o administración por inyección. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener cualquier soporte o vehículo convencional no tóxico farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el pH de la formulación puede ajustarse con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para potenciar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de suministro. El término parenteral tal como se usa en la presente memoria descriptiva incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

[0070] Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión inyectable estéril acuosa u oleaginosa.

[0071] Esta suspensión puede formularse según técnicas conocidas en la técnica usando agentes de dispersión o humectación adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están manitol, agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como medio disolvente o de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo blando que incluye monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas pueden contener también un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables tales como emulsiones y/o suspensiones. Para los fines de la formulación pueden usarse también otros tensioactivos usados comúnmente tales como Tweens o Spans y/u otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad similares que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables.

[0072] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable oral lo que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los soportes usados comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz.

[0073] Además normalmente se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco.

5 **[0074]** Cuando las suspensiones y/o emulsiones acuosas se administran oralmente, el ingrediente activo suspendido o disuelto en una fase oleosa se combina con agentes de emulsión y/o suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos edulcorantes y/o saborizantes y/o agentes colorantes.

10 **[0075]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse también en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones pueden prepararse mezclando un compuesto de la presente invención con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y por tanto se fundirá en el recto para liberar los componentes activos. Dichos materiales incluyen, pero no se limitan a, mantequilla de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

15 **[0076]** La administración tópica de las composiciones farmacéuticas de la presente invención es útil cuando el tratamiento deseado implica áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica. Para la aplicación tópica en la piel, la composición farmacéutica debe formularse con una pomada adecuada que contiene los componentes activos en suspensión o disueltos en un soporte. Los soportes para administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, petróleo líquido, petróleo blanco, propilenglicol, 20 compuesto de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica puede formularse con una loción o crema adecuada que contiene el compuesto activo en suspensión o disuelto en un soporte con agentes emulsionantes adecuados.

25 **[0077]** Los soportes adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitano, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden aplicarse también de forma tópica en el tracto intestinal inferior por formulación de supositorios rectales o en una formulación de enema adecuada. En la presente invención se incluyen también parches tópicos-transdérmicos.

30 **[0078]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse mediante aerosol o inhalación nasal. Dichas composiciones se preparan según técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en suero salino, que emplea alcohol bencílico u otros conservantes, promotores de absorción adecuados para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

35 **[0079]** Una composición que tiene el compuesto de la fórmula en la presente memoria descriptiva puede administrarse usando un dispositivo implantable.

40 **[0080]** Los dispositivos implantables y la tecnología relacionada son conocidos en la técnica y son útiles como sistemas de suministro en los que se desea un suministro continuo o de liberación programada de compuestos o composiciones contemplados en la presente memoria descriptiva. Además, el sistema de suministro del dispositivo implantable es útil para dirigirse a puntos específicos de suministro del compuesto o la composición (por ejemplo, sitios localizados, órganos) (véase Negrin y col., (2001) Biomaterials, 22 (6): 563).

45 **[0081]** En la presente invención puede usarse también tecnología de liberación programada que implica procedimientos de suministro alterno. Por ejemplo, también pueden usarse formulaciones de liberación programada basadas en tecnologías poliméricas, técnicas de liberación sostenida y técnicas de encapsulación (por ejemplo, poliméricas, liposómicas) para el suministro de los compuestos y composiciones contemplados en la presente memoria descriptiva.

50 **[0082]** También se encuentra dentro de la invención un parche para suministrar compuestos quimioterapéuticos activos en la presente memoria descriptiva. Un parche incluye una capa de material (por ejemplo, polimérico, tela, gasa, apósito) y el compuesto de la fórmula en la presente memoria descriptiva tal como se contempla en la presente memoria descriptiva. Un lado de la capa de material puede tener una capa protectora adherida al mismo para resistir el paso de los compuestos o composiciones. El parche puede incluir además un adhesivo para sostener el parche en su lugar en un sujeto. Un adhesivo es una composición, incluidas las de origen natural o sintético, que cuando se pone en contacto con la piel de un sujeto, se adhiere temporalmente a la piel. Puede ser resistente al agua. El adhesivo puede colocarse en el parche para mantenerlo en contacto con la piel del sujeto durante un periodo de tiempo extenso. El adhesivo puede estar hecho de una pegajosidad, o fuerza de

adhesivo, tal que sostiene el dispositivo en su lugar sujeto contacto circunstancial, sin embargo, tras una acción afirmativa (por ejemplo, desgarrar, pelado u otra retirada intencionada) el adhesivo deja actuar a la presión externa aplicada en el dispositivo o el adhesivo en sí, y permite romper el contacto de adhesión. El adhesivo puede ser sensible a la presión, es decir, puede permitir la colocación del adhesivo (y el dispositivo adherirse a la piel) contra la piel mediante la aplicación de presión (por ejemplo, empuje, frotamiento) en el adhesivo o dispositivo.

Breve descripción de los dibujos

[0083]

10

La **Figura 1** muestra la detección de actividad citolítica específica de SIINFEKL en sangre de ratones inmunizados. Todas las muestras se han recogido el día posterior a la inyección de células diana. Los ratones fueron inmunizados por vía intravenosa con 100 µg de péptido Ova en solitario (grupo 1), 1 µg de péptido Ova en solitario (grupo 2), una combinación de 100 µg de péptido Ova y 1 µg de glucolípidos (grupo 3), una combinación de 1 µg de péptido Ova y 1

15

µg de glucolípidos (grupo 4), 1 µg de péptido Ova unido de forma covalente a glucolípidos (grupo 5), 100 ng de péptido Ova unido de forma covalente a glucolípidos (grupo 6) o 10 ng de péptido Ova unido de forma covalente a glucolípidos (grupo 7).

La **Figura 2** muestra histogramas que representan el porcentaje de CD8+ específico de SIINFEKL-H2K^b (CD8+ SIINFEKL Pentámero + (%), abscisa) en la sangre de ratones inmunizados con PBS (PBS), péptido de ovoalbúmina (OVA), péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-6 (PBS6-OVA), péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-14 (PBS14-OVA) o péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-57 (PBS57-OVA).

20

25

La **Figura 3** muestra histogramas que representan el porcentaje de actividad citolítica específica de SIINFEKL (% lisis específica, abscisa) en la sangre de ratones inmunizados con PBS (PBS), péptido de ovoalbúmina corto (50 µg de OVA corto), péptido de ovoalbúmina largo (50 µg de OVA largo), péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-6 (1 µg de PBS6-OVA), péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-14 (1 µg de PBS14-OVA) o péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-57 (1 µg de PBS57-OVA).

30

La **Figura 4** muestra histogramas que representan la valoración de anticuerpos IgG1 específicos de OVA en la sangre de ratones inmunizados con ovoalbúmina con CFA/IFA (control positivo, CTRL+), péptido de ovoalbúmina corto (50 µg de OVA corto), péptido de ovoalbúmina largo (50 µg de OVA largo), péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-6 (1 µg de PBS6-OVA), péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-14 (1 µg de PBS14-OVA) o péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-57 (1 µg de PBS57-OVA).

35

La **Figura 5** muestra histogramas que representan la valoración de anticuerpos IgG2a específicos de OVA en la sangre de ratones inmunizados con ovoalbúmina con CFA/IFA (control positivo, CTRL+), péptido de ovoalbúmina corto (50 µg de OVA corto), péptido de ovoalbúmina largo (50 µg de OVA largo), péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-6 (1 µg de PBS6-OVA), péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-14 (1 µg de PBS14-OVA) o péptido de ovoalbúmina unido de forma covalente a PBS-57 (1 µg de PBS57-OVA).

40

La **Figura 6** muestra histogramas que representan el porcentaje de actividad citolítica específica de Trp2 (% lisis específica, abscisa) en la sangre de ratones inmunizados con PBS (PBS), péptido Trp2 corto (50 µg de Trp2 corto), péptido Trp2 largo (50 µg de Trp2 largo), péptido Trp2 unido de forma covalente a PBS-6 (1 µg de PBS6-Trp2), péptido Trp2 unido de forma covalente a PBS-14 (1 µg de PBS14-Trp2) o péptido Trp2 unido de forma covalente a PBS-57 (1 µg de PBS57-Trp2).

45

Ejemplos

50

Ejemplo 1: Inmunización de prueba inducida con antígeno ligado con PBS6 administrado por vía intravenosa en ensayo VITAL.

-Material

55

[0084] Se usaron 33 ratones hembra C57Bl/6J CD45.2 de 8 semanas de vida para inmunización. Se dividieron en 8 grupos: los grupos 1, 2, 4, 6 y 8 incluyeron 3 animales y los grupos 3, 5 y 7 incluyeron 6 animales.

[0085] Para las células diana se usaron 20 ratones hembra C57Bl/6J CD45.2 de 8 semanas.

-Células diana para ensayo de citotoxicidad *in vivo*

5 **[0086]** Se evaluó la citotoxicidad *in vivo* de la respuesta a linfocitos T CD8+ inducida del péptido de ovoalbúmina de secuencia SIINFEKL (SEQ ID NO: 1) (o péptido Ova) mediante ensayo VITAL tal como se describe en Hermans y col. (2004, J. Immunol. Methods, 285:25-40). Brevemente, se marcaron poblaciones de esplenocitos congénicas con el colorante fluorescente CFSE con baja concentración (0,6 μ M durante 10 min a 37°C) o alta concentración (6 μ M durante 10 min a 37°C). Se precargó la población marcada con alta concentración de CFSE
10 con péptido SIINFEKL (5 μ M durante 60 min a 37°C) mientras que la población marcada con baja concentración de CFSE se precargó con péptido gp33-41 LCMV irrelevante (5 μ M durante 60 min a 37°C).

[0087] Se mezclaron números iguales de las dos poblaciones y se inyectaron por vía intravenosa en ratones inmunizados. Se inyectaron $10 \cdot 10^6$ células de cada condición (total de $20 \cdot 10^6$ células) en un volumen de 100 μ l en el
15 seno orbitario o en la vena lateral de la cola de cada ratón inmunizado, 10 días después de la vacunación.

-Tratamiento de vacunación

[0088] El péptido de ovoalbúmina consiste en la secuencia SIINFEKL (SEQ ID NO: 1) (es decir, aminoácidos
20 257-264 de ovoalbúmina) y el glucolípido usado es PBS-6.

[0089] Se vacunó a los ratones por vía intravenosa en el día 0 con 50 μ l de las siguientes soluciones según los diferentes grupos:

- 25 1- 100 μ g de péptido Ova en 50 μ l de PBS
2- 1 μ g de péptido Ova en 50 μ l de PBS
3- 100 μ g de péptido Ova combinado con 1 μ g de PBS-6 en 50 μ l de PBS
30 4- 1 μ g de péptido Ova combinado con 1 μ g de PBS-6 en 50 μ l de PBS
5- 1 μ g de péptido Ova unido de forma covalente a PBS-6 en 50 μ l de PBS
35 6- 100 ng de péptido Ova unido de forma covalente a PBS-6 en 50 μ l de PBS
7- 10 ng de péptido Ova unido de forma covalente a PBS-6 en 50 μ l de PBS

-Lectura

40 **[0090]** Se vigiló la lisis específica de las dianas cargadas con SIINFEKL mediante análisis FACS en células de sangre periférica o esplenocitos. Las muestras de sangre se han recogido en el seno orbitario y en el bazo se han recogido después del sacrificio de los ratones inmunizados en el día 11. Se calculó la supervivencia porcentual media de las dianas pulsadas con péptidos con respecto a la de la población de control, y se expresó la actividad
45 citotóxica como porcentaje de lisis específica (100 menos la supervivencia media en porcentaje de dianas pulsadas con péptidos).

-Resultados

50 **[0091]** El objetivo de este estudio era evaluar una unión covalente de péptido con glucolípido NKT agonista para inducir respuesta de lisis específica cuando se administró por vía intravenosa, en comparación con el mismo péptido mezclado con el mismo glucolípido. Los ratones tratados con 1 μ g a 100 μ g de péptido Ova en solitario no presentaron lisis específica de antígeno. Se evaluó la referencia de lisis natural en control con placebo entre -6% y +3% (**Figura 1**). Los resultados en ratones tratados con 100 μ g de péptido Ova en combinación con 1 μ g de PBS6
55 por vía intravenosa presentaron una lisis específica acusada en todos los ratones tal como se esperaba. Los ratones tratados con 1 μ g de péptido Ova en combinación con 1 μ g de PBS-6 no presentaron lisis específica después de la inmunización por vía intravenosa. Sin embargo, los resultados en ratones tratados con 1 μ g de péptido Ova unido de forma covalente a PBS-6 presentaron una lisis específica elevada en todos los ratones. Esta actividad seguía

presente en 100 y 10 ng. Este resultado sugería que la inmunización por vía intravenosa con péptido antigénico unido de forma covalente proporcionaba mejor resultado que la inyección de la mezcla.

5 [0092] En conclusión este experimento sugería que esta unión entre antígeno y adyuvante de CD1d restringido aumenta la potencia de la respuesta.

Ejemplo 2: Evaluación de la estimulación de la respuesta inmunitaria inducida por adyuvante de glucolípido usando el antígeno OVA modelo.

10 -Material

[0093] Se usaron 48 ratones hembra C57Bl/6J CD45.2 de 9 semanas para inmunización. Se dividieron en 9 grupos: los grupos 1 y 2 incluyeron 3 animales y los grupos 3 a 9 incluyeron seis animales.

15 -Tratamiento de vacunación:

[0094] El péptido de ovoalbúmina consiste en la secuencia VSGLEQLESIIINFEKLTEWTS (SEQ ID NO: 2) y los glucolípidos usados son PBS-6, PBS-14 y PBS-57.

20 [0095] Se vacunó a los ratones por vía intramuscular en los días 0 y 14 con las siguientes soluciones según los diferentes grupos:

- Grupo 1: 100 µl de PBS;

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

- Grupo 3: 1 µg de Ova-PBS-6 en 100 µl de PBS;

- Grupo 4: 1 µg de Ova-PBS-14 en 100 µl de PBS;

30

- Grupo 5: 1 µg de Ova-PBS-57 en 100 µl de PBS.

-Lectura:

35 [0096] Se vigiló la detección de células CD8+ específicas SIINFEKL mediante FACS seguido de cotinción de H-2Kb SIINFEKL pentámero y CD8.

[0097] Se vigiló la respuesta de citocinas en el bazo mediante análisis CBA. Se vigiló la secreción de citocinas con CBA de citocina Th1/TH₂ de ratón en un flujómetro, y se determinó la concentración de citocinas usando el software FCAP Array, BD.

40

-Resultados

45 [0098] El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia de la unión entre un antígeno y un glucolípido para inducir respuestas inmunitarias específicas cuando se administró por vía intramuscular.

[0099] Los ratones tratados con 1 µg de OVA unido de forma covalente a PBS-6, PBS-14 o PBS-57 presentaron un porcentaje superior de CD8+ específico de SIINFEKL-H2K^b en la sangre que los ratones tratados con 50 µg de OVA en solitario (**Figura 2**).

50

[0100] En consecuencia, este experimento demuestra que la unión entre antígeno y adyuvante de glucolípidos aumenta la potencia de la respuesta.

55 **Ejemplo 3: Inmunización de prueba inducida con antígeno ligado con diferentes adyuvantes de glucolípidos administrados por vía intramuscular.**

-Material

[0101] Se usaron 69 ratones hembra C57Bl/6J CD45.2 de 9 semanas para inmunización. Se dividieron en 14

grupos: grupos 1 a 5 incluyeron 3 animales, y los grupos 6 a 14 incluyeron 6 animales.

-Células diana para ensayo de citotoxicidad *in vivo*

5 [0102] La citotoxicidad *in vivo* de respuesta a los linfocitos T inducidos por SIINFEKL (SEQ ID NO: 1) se evaluó mediante ensayo VITAL tal como se describe en el Ejemplo 1.

-Tratamiento de vacunación

10 [0103] El péptido de ovoalbúmina corto consiste en la secuencia SIINFEKL (SEQ ID NO: 1; aminoácidos 257 a 264 de ovoalbúmina), el péptido de ovoalbúmina largo consiste en la secuencia VSGLEQLESIIINFEKLTWTS (SEQ ID NO: 2; aminoácidos 250 a 269 de ovoalbúmina) y los glucolípidos usados son PBS-6, PBS-14 y PBS-57.

15 [0104] Se vacunó a los ratones por vía intramuscular en el día 0 con las siguientes soluciones según los diferentes grupos:

- Grupo 1: 50 µl de PBS;

20 - Grupo 2: 50 µg de OVA corto en 50 µl de PBS/DMSO;

- Grupo 3: 50 µl de OVA largo en 50 µl de PBS/DMSO

- Grupo 4: 1 µg de PBS-6-OVA en 50 µl de PBS;

25 - Grupo 5: 1 µg de PBS-57-OVA en 50 µl de PBS;

- Grupo 6: 1 µg de PBS-14-OVA en 50 µl de PBS.

-Lectura:

30 [0105] La lectura fue tal como se describe en el Ejemplo 1.

-Resultados

35 [0106] El objetivo de este estudio era evaluar una unión covalente de péptido con glucolípido NKT agonista para inducir respuesta de lisis específica cuando se administró por vía intramuscular, en comparación con el mismo péptido en solitario.

40 [0107] Los ratones tratados con 1 µg de OVA unido de forma covalente a PBS-6, PBS-14 o PBS-57 presentaron un mayor porcentaje de actividad citolítica específica de SIINFEKL en la sangre que los ratones tratados con 50 µg de OVA en solitario (**Figura 3**).

45 [0108] En consecuencia, este experimento demuestra que la unión entre antígeno y adyuvante de glucolípidos aumenta la potencia de la respuesta.

Ejemplo 4: Evaluación de respuesta de anticuerpos específica frente a péptido de ovoalbúmina.

50 [0109] El objetivo de este estudio era evaluar la respuesta de anticuerpos IgG1 y IgG2a después de inmunización con ovoalbúmina en combinación con diferentes adyuvantes unidos de forma covalente.

-Material y procedimientos

[0110] Los sueros sometidos a ensayo fueron los siguientes:

55 - Grupo 1; 6 ratones inmunizados con 500 µg de proteína OVA con CFA/IFA (Control positivo)

- Grupo 2: 6 ratones inmunizados con 50 µg de péptido de OVA largo de secuencia ISSAESLKISQAVHAAHAEINEA (SEQ ID NO: 3; aminoácidos 316 a 338 de ovoalbúmina)

- Grupo 3: 6 ratones inmunizados con 50 µg de péptido OVA corto de secuencia KISQAVHAAHA (SEQ ID NO: 4; aminoácidos 323 a 333 de ovoalbúmina)

5 - Grupo 4: 6 ratones inmunizados con 1 µg de PBS-6-OVA

- Grupo 5: 6 ratones inmunizados con 1 µg de PBS-14-OVA

- Grupo 6: 6 ratones inmunizados con 1 µg de PBS-57-OVA

10

[0111] Todos los ratones fueron inmunizados por vía intramuscular en el día 0 y el día 14. Todas las muestras se recogieron 14 días después de la segunda inmunización y se evaluaron las valoraciones IgG1 e IgG2a específicas de la ovoalbúmina.

15 -Resultados

[0112] Los ratones tratados con 1 µg de OVA unido de forma covalente a PBS-6, PBS-14 o PBS-57 presentaron mayores valoraciones de IgG1 (**Figura 4**) e IgG2a (**Figura 5**) específicas de ovoalbúmina que los ratones tratados con 50 µg de OVA en solitario.

20

[0113] En consecuencia, este experimento demuestra que la unión entre antígeno y adyuvante de glucolípidos aumenta la potencia de la respuesta.

Ejemplo 5: Inmunización de prueba inducida con antígeno de proteína relacionada con la tirosinasa 2 (Trp2) unido a diferentes adyuvantes de glucolípidos administrados por vía intramuscular

25

-Material

[0114] Se usaron 69 ratones C57Bl/6J CD45.2 de 9 semanas para inmunización. Se dividieron en 14 grupos: los grupos 1 a 5 incluyeron 3 animales, y los grupos 6 a 14 incluyeron 6 animales.

30

-Células diana para ensayo de citotoxicidad *in vivo*

[0115] La citotoxicidad *in vivo* de la respuesta a linfocitos T CD8+ inducida por Trp2 181_188 se evaluó mediante ensayo VITAL tal como se describe en el Ejemplo 1.

35

-Tratamiento de vacunación

[0116] El péptido corto Trp2 consiste en la secuencia de aminoácidos 181 a 188 de Trp2, el péptido largo Trp2 consiste en la secuencia de aminoácidos 174 a 193 de Trp2 y los glucolípidos usados son PBS-6, PBS-14 y PBS-57.

40

[0117] Se vacunó a los ratones por vía intramuscular en el día 0 con las siguientes soluciones según los diferentes grupos:

45

- Grupo 1: 50 µl de PBS;

- Grupo 2: 50 µg de péptido corto Trp2 en 50 µl de PBS/DMSO;

50 - Grupo 3: 50 µg de péptido largo Trp2 en 50 µl de PBS/DMSO

- Grupo 4: 1 µg de PBS-6-Trp2 en 50 µl de PBS;

- Grupo 5: 1 µg de PBS-57-Trp2 en 50 µl de PBS;

55

- Grupo 6: 1 µg de PBS-14-Trp2 en 50 µl de PBS.

-Lectura:

[0118] La lectura fue tal como se describe en el Ejemplo 1.

-Resultados

5

[0119] El objetivo de este estudio era evaluar una unión covalente de un antígeno diferente con agonistas NKT de glucolípidos para inducir respuesta de lisis específica cuando se administró por vía intramuscular, en comparación con el mismo antígeno en solitario.

10 [0120] Los ratones tratados con 1 µg de Trp2 unido de forma covalente a PBS-6, PBS-14 o PBS-57 presentaron un mayor porcentaje de actividad citolítica específica de Trp2 en la sangre que los ratones tratados con 50 µg de Trp2 en solitario (**Figura 6**).

[0121] En consecuencia, este experimento demuestra que los resultados obtenidos con el péptido de
15 ovoalbúmina unido de forma covalente a adyuvantes de glucolípidos se observan también con otros antígenos peptídicos.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 [0122]

<110> Wittycell
Serra, Vincent

25 <120> Aumento de la respuesta inmunitaria por conjugación con antígenos peptídicos

<130> BET 08P1282

<150> EP 07291336,1

30 <151> 2007-11-07

<150> US 60/996226

<151> 2007-11-07

35 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

40 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> péptido OVA

<400> 1

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

50

1

5

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

55 <213> Artificial

<220>

ES 2 584 928 T3

<223> péptido largo OVA

<400> 2

Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5 10 15

Thr Glu Trp Thr Ser
20

5

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> péptido largo OVA 2

15 <400> 3

Ile Ser Ser Ala Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala
1 5 10 15

His Ala Glu Ile Asn Glu Ala
20

20

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> péptido corto OVA 2

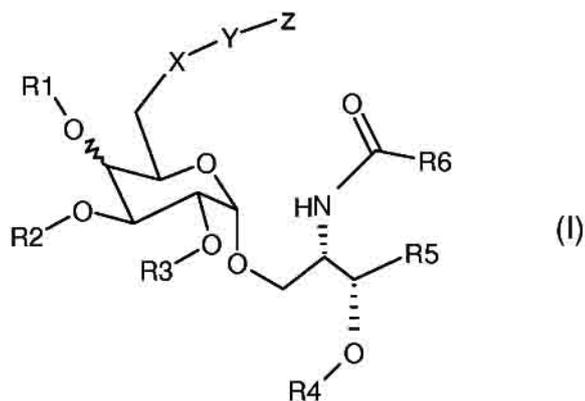
<400> 4

30

Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la Fórmula (I):



5

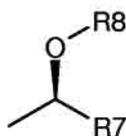
en la que,

10 R_1 , R_2 , R_3 , y R_4 son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , aralquilo C_6-C_{12} , o acilo C_1-C_6 ; y R_1 se sitúa por encima o por debajo del anillo del azúcar;

R_6 es

- 15 a) $-(CH_2)_xCH_3$ en el que x es un número entero seleccionado entre 1 y 100; o
 b) $-(CH_2)_xCH=CH(CH_2)_yCH_3$ o $-(CH_2)_xCH=CH(CH_2)_yCH=CH(CH_2)_zCH_3$ en el que x, y y z son números enteros seleccionados independientemente entre 1 y 14;

20 R_5 es una de las fórmulas siguientes (II), (III) o (IV)



(II)



(III)



(IV)

en las que R_8 es hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , aralquilo C_6-C_{12} , o acilo C_1-C_6 , y

25 R_7 es un alquilo C_3-C_{100} lineal o ramificado;

X es -O, N o S;

Y es un grupo conector escindible o no escindible; y

30

Z es un antígeno peptídico.

2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_8 son hidrógeno, R_5 es (II), R_6 es $C_{25}H_{51}$, R_7 es $C_{14}H_{29}$ y X es N.

35

3. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_8 son hidrógeno, R_5 es (II), R_6 es $C_{23}H_{45}$, R_7 es $C_{14}H_{29}$ y X es N.

4. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁, R₂, R₃, R₄ y R₈ son hidrógeno, R₅ es (II), R₆ es C₂₃H₄₇, R₇ es C₁₄H₂₉ y X es N.
5. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el conector contiene un sitio de escisión de proteasa.
6. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el conector contiene un sitio de escisión de lipasa.
- 10 7. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el conector contiene un sitio de escisión de proteasa y/o un sitio de escisión de lipasa.
8. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que compuesto es capaz de activar una célula NKT.
- 15 9. Una composición de vacuna que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
10. La composición de vacuna según la reivindicación 9 para su uso para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto.
- 20 11. La composición de vacuna para su uso según la reivindicación 10, en el que la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral.
- 25 12. La composición de vacuna para su uso según la reivindicación 10, para activar linfocitos T CD4+.
13. La composición de vacuna para su uso según la reivindicación 10, para activar linfocitos T CD8+.

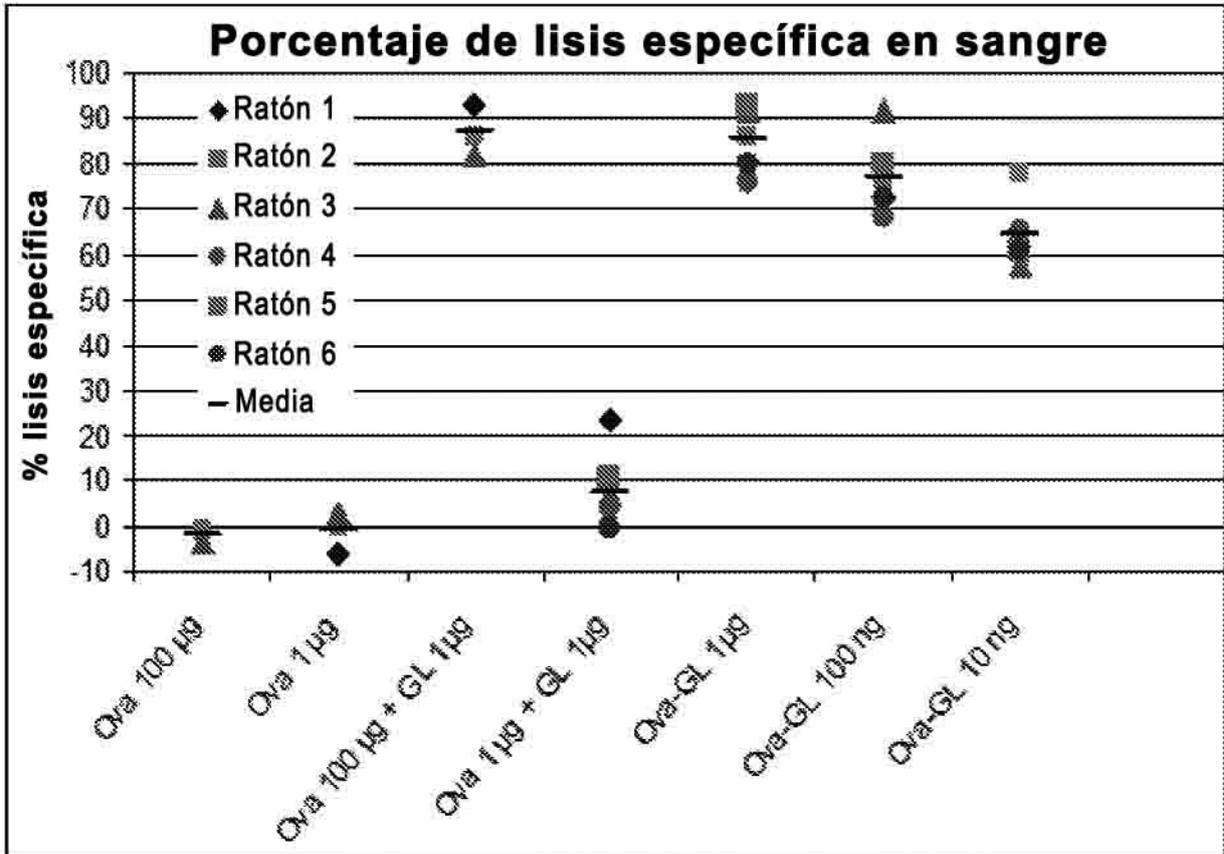


FIG.1

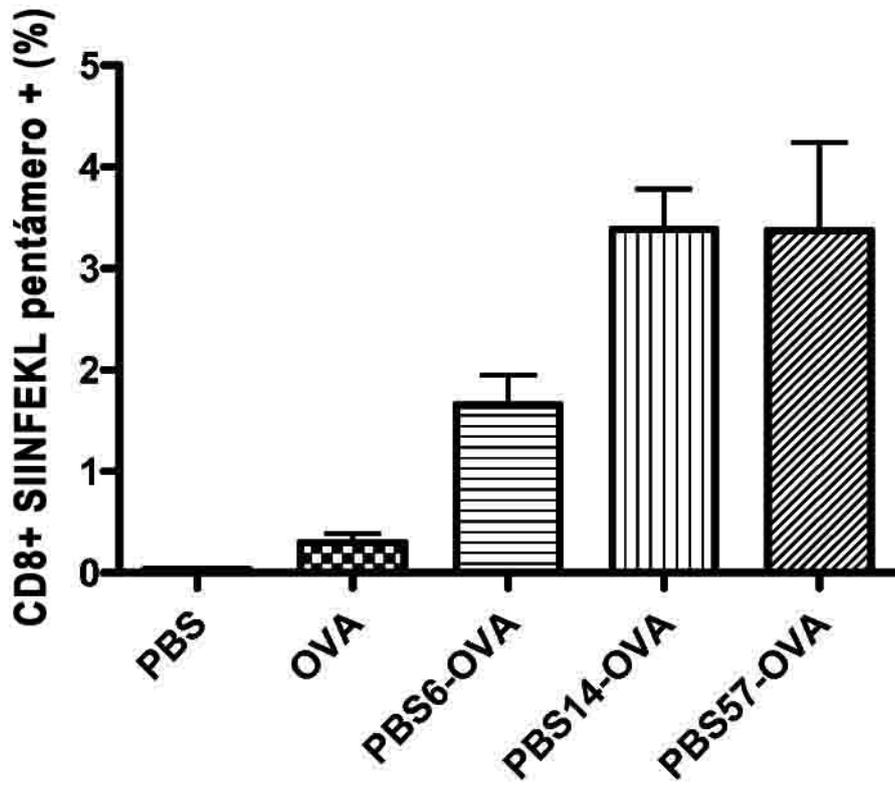


FIG.2

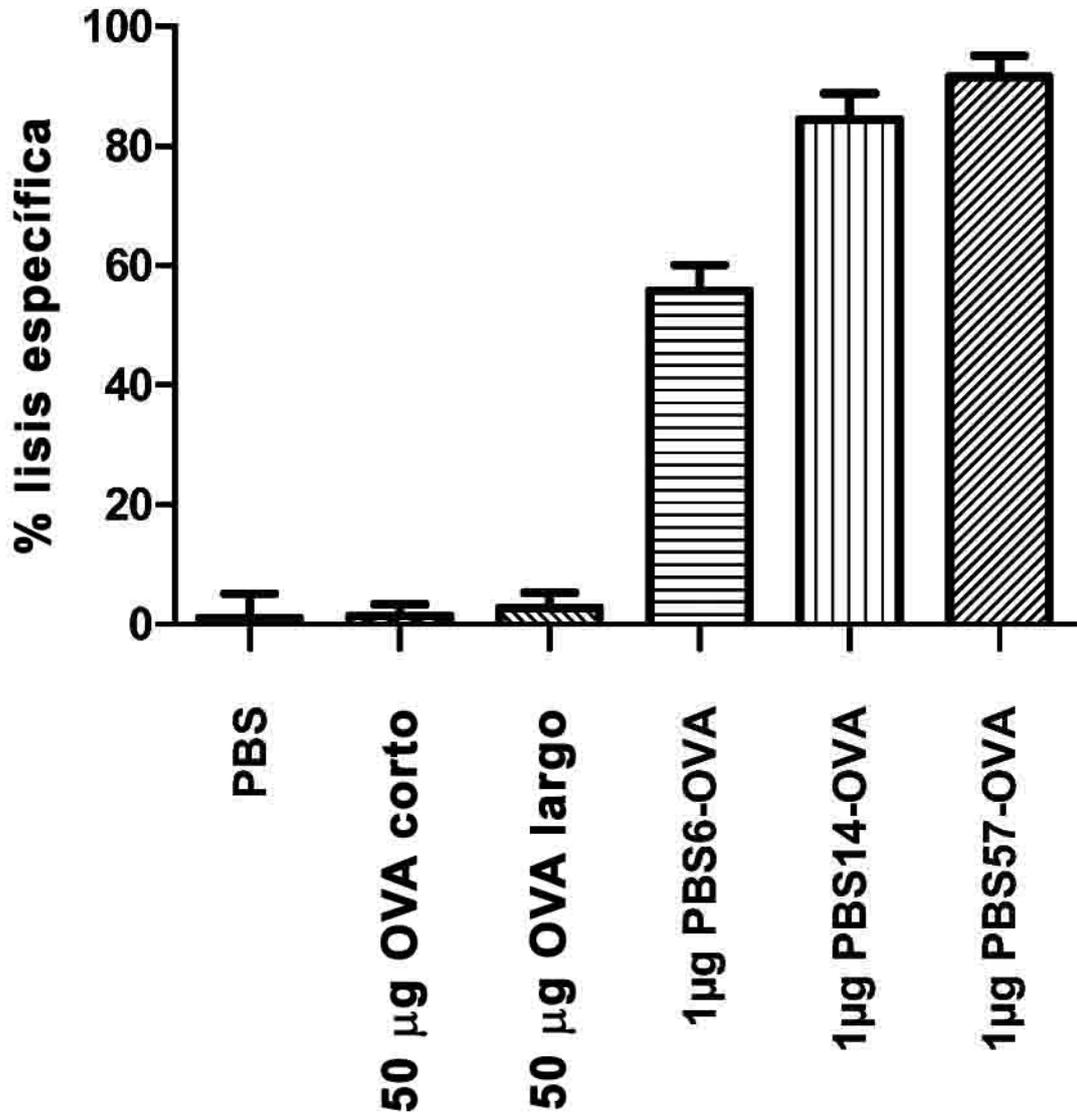


FIG.3

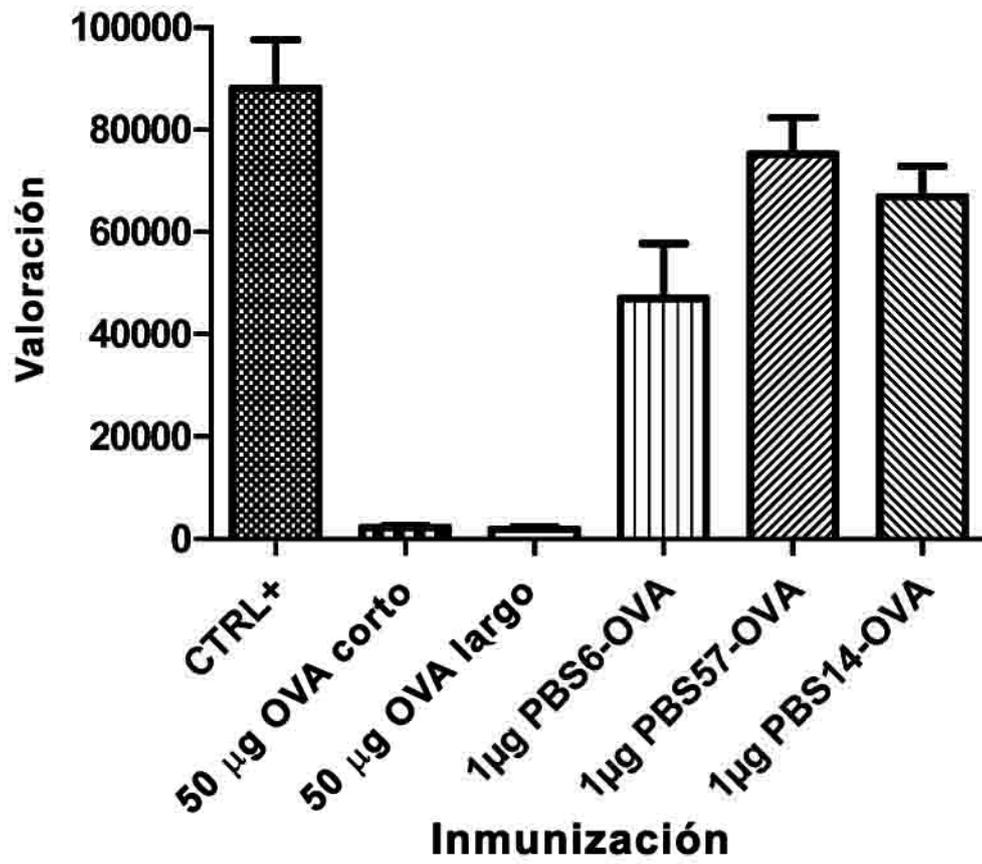


FIG.4

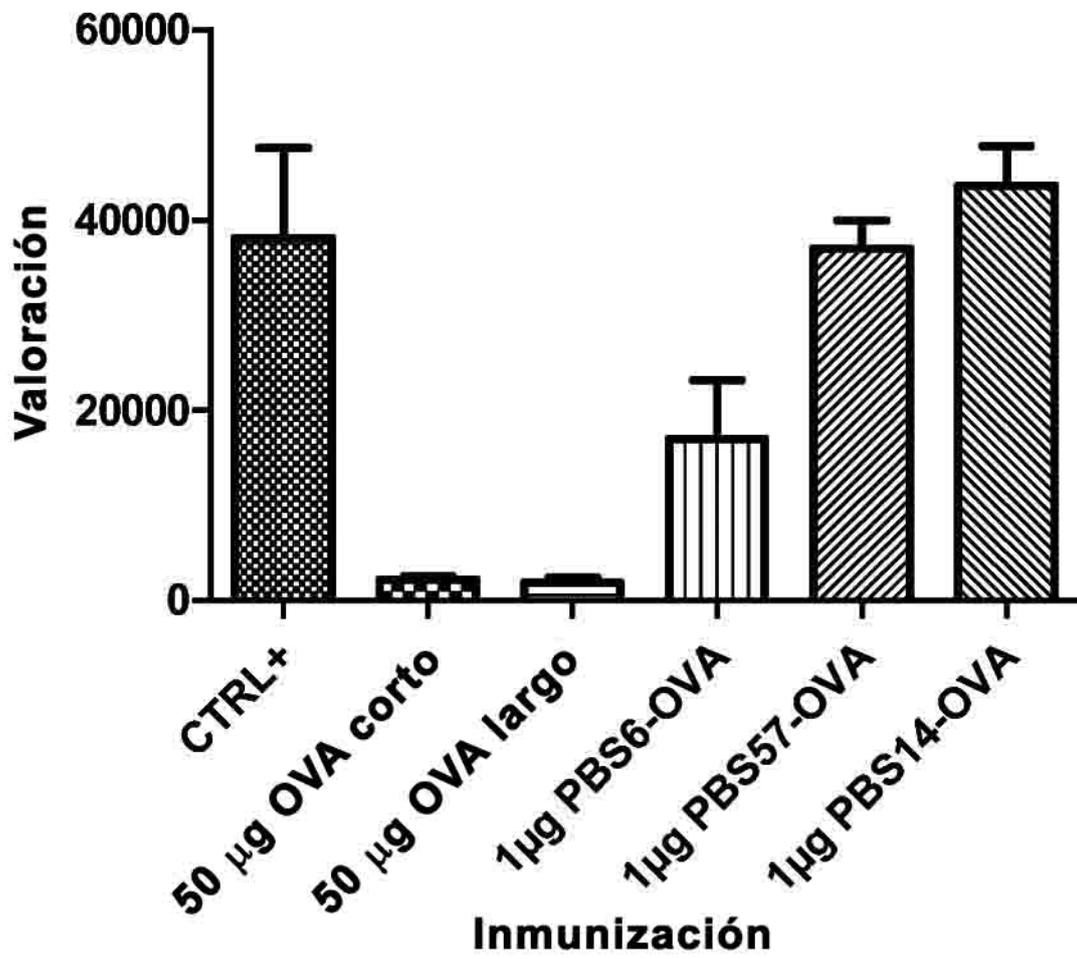


FIG.5

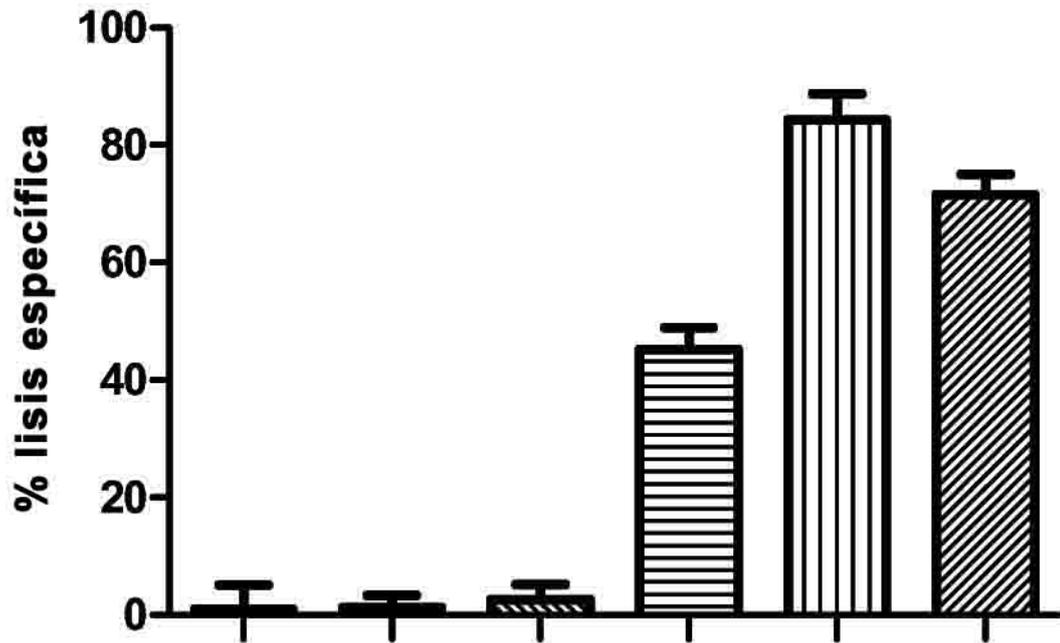


FIG.6