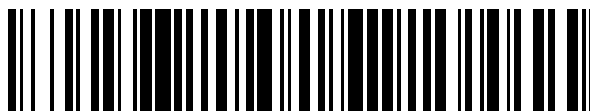


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 288**

51 Int. Cl.:

A61K 31/77 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2013 PCT/IB2013/051659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13128423**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2013 E 13719611 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2819683**

54 Título: **Uso de un copolímero de bloques anfífilo no iónico tetrafuncional modificado por glicosilación como adyuvante inmunitario**

30 Prioridad:

02.03.2012 EP 12305256

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

24.10.2018

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE NANTES (33.3%)**

72 Inventor/es:

PITARD, BRUNO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 687 288 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

Uso de un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional modificado por glicosilación como adyuvante inmunitario

5 La presente invención se refiere al campo de la vacunación y más particularmente a nuevos adyuvantes inmunitarios. En particular, la invención se refiere al uso de un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado como adyuvante inmunitario.

10 El primer adyuvante en ser desarrollado se basaba en una emulsión de agua en aceite según se describió por Le Moignic en 1916. Desde entonces, se han desarrollado numerosos adyuvantes potentes, pero las reacciones adversas debidas a efectos secundarios tóxicos han limitado su uso para una vacuna humana. En 1937, Freund desarrolló el adyuvante de Freund que contiene un aceite mineral mezclado con la bacteria inactiva *Mycobacterium tuberculosis*. Aunque este adyuvante está prohibido para el uso en seres humanos debido a los graves efectos adversos, se sigue usando para una vacuna veterinaria (Broderson, Lab Anim Sci, 1989, 39, 400-5). De otro modo, Glenn y cols. fueron los primeros en usar sales de aluminio (alumbre) que es el único adyuvante autorizado por the Food and Drugs Administration (Gupta, R.K., Adv Drug Deliv Rev, 1998, 32, 155-172). El alumbre inducía una respuesta inmunitaria humoral asociada con una inmunidad celular débil, pero no inmunidad mucosa, y puede ser responsable de reacciones alérgicas. Más recientemente, una emulsión de aceite en agua de escualeno (MF59) fue desarrollada y aprobada en Europa para vacunas contra la gripe (Ott, G., G.L. Barchfeld y G. Van Nest, Vaccine, 1995, 13, 1557-62; Cataldo, D.M. y G. Van Nest, Vaccine, 1997, 15, 1710-5). Aunque estos adyuvantes son capaces de inducir una fuerte respuesta inmunitaria humoral, solo se observaba una débil respuesta celular y generalmente se observa una toxicidad alta.

25 Se han desarrollado diferentes tipos de adyuvante basándose en su mecanismo de acción, tales como adyuvantes basados en liposomas o complejos inmunoestimulantes (ISCOMs). Sin embargo, se asocian con actividad hemolítica y respuesta inflamatoria local, y se usan solamente en vacunas veterinarias. Alternativamente, se propusieron como adyuvantes componentes inmunoestimulantes, habitualmente derivados de patógenos tales como lipopolisacárido, monofosforil A o ADN de CpG, en particular para vacunas subunitarias, en combinación con otros adyuvantes tales como alumbre para provocar una respuesta humoral fuerte. Sin embargo, tienden de forma similar a inducir la producción de citocinas proinflamatorias, impidiendo su uso en el ser humano (Gustafson, G.L. y M.J. Rhodes, Res Immunol, 1992, 143, 483-8). Además, aunque estos adyuvantes proporcionan una fuerte respuesta inmunitaria humoral, generalmente se observaba una débil respuesta celular y una falta de seguridad.

35 Las vacunas subunitarias están diseñadas para incluir solamente el antígeno necesario para estimular el sistema inmunitario. Las vacunas subunitarias están bien definidas, purificadas y se pueden producir en gran cantidad con un buen perfil de seguridad. Sin embargo, generalmente presentan una inmunogenicidad reducida en comparación con las vacunas tradicionales y por lo tanto requieren el uso de moléculas adyuvantes que estimulen el sistema inmunitario.

40 Por consiguiente, existe una necesidad de nuevos adyuvantes inmunitarios capaces de provocar una respuesta inmunitaria celular fuerte.

También existe una necesidad de nuevos adyuvantes inmunitarios capaces de mejorar la eficacia de las vacunas subunitarias.

45 También existe una necesidad de nuevos adyuvantes inmunitarios capaces de provocar una fuerte respuesta inmunitaria celular y humoral combinada.

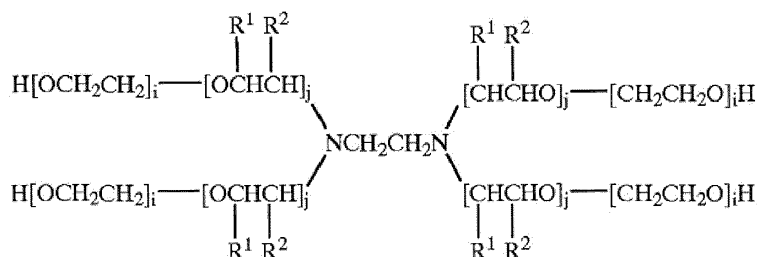
También existe una necesidad de nuevos adyuvantes inmunitarios con un buen perfil de seguridad adecuado para el uso en seres humanos.

50 También existe una necesidad de nuevos adyuvantes inmunitarios que se puedan producir fácilmente.

También existe una necesidad de nuevos adyuvantes inmunitarios que se puedan producir a bajo coste.

55 La presente invención tiene por objeto cubrir estas necesidades.

La presente invención se refiere a un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado, para el uso como adyuvante inmunitario, siendo dicho copolímero de bloques de fórmula (II):



en la que

- i tiene valores de aproximadamente 10 a aproximadamente 60,
- j tiene valores de igual a o más de 13 y hasta aproximadamente 20,
- para cada par R^1 , R^2 , uno será hidrógeno y el otro será un grupo metilo;

en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa.

La invención se refiere además a un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado, para el uso como adyuvante inmunitario, siendo dicho copolímero de bloques un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 304; en el que dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa.

Inesperadamente, los inventores han observado, como se detalla en los ejemplos posteriores, que la manosilación de los copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales 704 y 904 permite mejorar drásticamente no solo el título de anticuerpo (respuesta Th-2) sino también la respuesta celular restringida a la clase I (respuesta Th-1) contra diferentes antígenos recombinantes. 704 y 904 presentan eficacia y características industriales únicas incluyendo un excelente perfil de seguridad.

Los términos "adyuvante inmunitario" está destinado a significar, dentro de la invención, un agente adecuado para estimular el sistema inmunitario e incrementar una respuesta a una vacuna sin tener ningún efecto antigénico específico por sí mismo. Un adyuvante inmunitario de la invención es capaz de inducir una fuerte respuesta inmunitaria celular.

Según una realización, un adyuvante inmunitario según la invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I (o respuesta Th-1).

Dentro de la invención, los términos "respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I" está destinado a significar una respuesta inmunitaria que está mediada principalmente por células T citotóxicas $CD8^+$. Las células T citotóxicas (también conocidas como Tc, linfocitos T citotóxicos, CTL, células asesinas T, células T citolíticas, células T $CD8^+$ o células T asesinas) son un subgrupo de linfocitos T capaces de inducir la muerte de células somáticas infectadas o tumorales. Las células T citotóxicas expresan receptores de células T (TCRs) que pueden reconocer un péptido antigénico específico unido a moléculas del MHC Clase I y una glicoproteína llamada CD8, que es atraída a porciones no variables de la molécula del MHC Clase I. Indicado de otro modo, un adyuvante inmunitario de la invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria restringida a la clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) o respuesta Th-1.

Una respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I "protectora" es una respuesta inmunitaria mediada por células T citotóxicas $CD8^+$, cuya intensidad o nivel es capaz de prevenir o reducir la probabilidad de la presencia o tratar o aliviar o reducir los síntomas de una enfermedad desencadenada por un patógeno tal como bacterias, virus, hongos patógenos o por células cancerosas.

Un adyuvante inmunitario de la invención no se limita a estimular una respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I, sino que también es capaz de inducir concomitantemente una respuesta humoral fuerte o inmunitaria restringida a la clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (o respuesta Th-2). Una respuesta Th2 es una respuesta inmunitaria caracterizada por la activación de células B para formar anticuerpos neutralizadores, conduciendo a "inmunidad humoral".

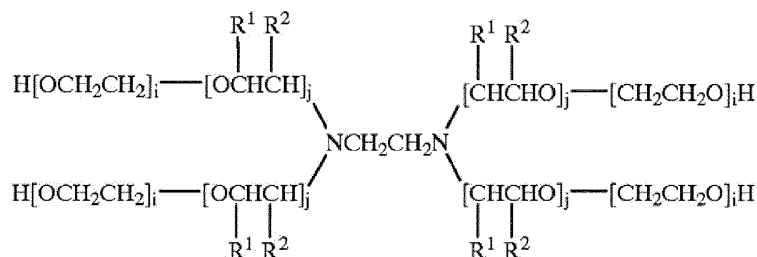
Según una realización, un adyuvante inmunitario según la invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral.

Según otra realización, un adyuvante inmunitario según la invención es capaz de estimular una inmunidad mucosa.

Dentro de la invención, los términos "inmunidad mucosa" está destinado a referirse a una parte del sistema inmunitario que proporciona protección a diversas membranas mucosas de un organismo.

5 La presente memoria descriptiva describe además un uso de un adyuvante inmunitario según la invención en una composición de vacuna subunitaria.

Según otro de sus objetivos, la presente invención se refiere a un adyuvante inmunitario para conferir una respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I protectora contra un antígeno que comprende al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado que es de fórmula (II):



en la que

- i tiene valores de aproximadamente 10 a aproximadamente 60,

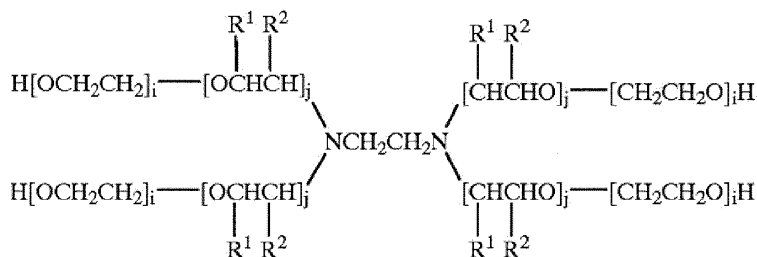
15 - j tiene valores de igual a o más de 13 y hasta aproximadamente 20,

- para cada par R^1 , R^2 , uno será hidrógeno y el otro será un grupo metilo;

en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa.

20 La invención se refiere además a un adyuvante inmunitario para conferir una respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I protectora contra un antígeno, que comprende al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado, siendo dicho copolímero de bloques un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 304; en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa

25 Según otro de sus objetivos, la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende al menos un antígeno y, como adyuvante inmunitario, al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado que es de fórmula (II):



30 en la que

- i tiene valores de aproximadamente 10 a aproximadamente 60,

- j tiene valores de igual a o más de 13 y hasta aproximadamente 20,

35 - para cada par R^1 , R^2 , uno será hidrógeno y el otro será un grupo metilo;

en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa.

5 Según otro de sus objetivos, la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende al menos un antígeno y, como adyuvante inmunitario, al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado que es un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 304; en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa

Según una ventaja, la invención proporciona un nuevo adyuvante inmunitario capaz de inducir una respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I fuerte y protectora.

10 Según otra ventaja, la invención proporciona un nuevo adyuvante inmunitario con un buen perfil de seguridad adecuado para el uso en seres humanos.

Según otra ventaja, la invención proporciona un nuevo adyuvante inmunitario simple de producir y obtenible a bajo coste.

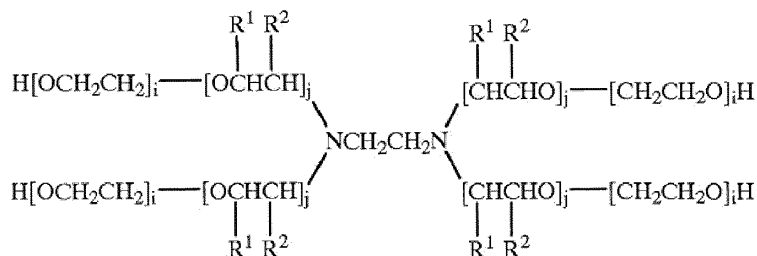
15 Copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional

Dentro de la invención, la característica "copolímero de bloques" pretende referirse a un polímero que comprende al menos dos grupos, o bloques, de unidades monómeras polymerizadas. Un "bloque" se refiere a un motivo, obtenido mediante la polimerización de un monómero, y que se puede repetir dentro del polímero. Un copolímero de bloques comprende necesariamente al menos dos tipos distintos de bloques de monómeros polymerizados.

20 Dentro de la invención, la característica "copolímero de bloques anfifílico no iónico" pretende referirse a un copolímero de bloques que comprende al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo, siendo los bloques no iónicos, a saber, no contienen un resto formador de ion.

25 Dentro de la invención, la característica "tetrafuncional" en relación con un "copolímero de bloques" se refiere a un compuesto que comprende cuatro copolímeros de bloques unidos a cuatro funciones reactivas soportadas por un resto conector tetrafuncional. Dicho de otro modo, un "copolímero de bloques tetrafuncional" comprende cuatro ramificaciones de copolímeros de bloques unidas a un resto conector tetrafuncional central.

30 Un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado, en el sentido de la invención, es un copolímero de bloques de fórmula (II):



35 en la que

- i tiene valores de aproximadamente 10 a aproximadamente 60,
- j tiene valores de igual a o más de 13 y hasta aproximadamente 20,
- para cada par R^1 , R^2 , uno será hidrógeno y el otro será un grupo metilo;

40 en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa.

Otro copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado, en el sentido de la invención, es un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado 304, en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa.

45 Los cuatro copolímeros de bloques pueden ser, independientemente unos de otros, idénticos o diferentes, y preferiblemente son idénticos.

Un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional de la invención comprende cuatro ramificaciones de copolímero de bloques que comprenden, cada una, al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo.

5 Un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional de la invención no es un lípido A monofosforilado, o un análogo del mismo, según se describe en Jiang y cols., Carbohydrate Res, 2007, 342:784.

Un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional de la invención no son conjugados lipófilos de triterpeno-saponina como los descritos en el documento US 5.977.081.

10 En una realización preferida, a copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional de la invención comprende al menos un bloque hidrófilo terminal. Un "bloque hidrófilo terminal" es un bloque situado en un extremo de un copolímero, y en particular en un extremo distal de una ramificación de un polímero tetrafuncional de la invención. Preferiblemente, un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional comprende al menos dos, preferiblemente tres y más preferiblemente cuatro bloque hidrófilos terminales.

15 Según una realización preferida, un copolímero de bloques de la invención comprende al menos uno, preferiblemente dos, más preferiblemente tres y más preferiblemente cuatro unidades de oxietileno terminales, cada una en un extremo de cada ramificación del polímero.

20 Preferiblemente, un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional de la invención comprende bloques hidrófilo e hidrófobo en una relación bloque hidrófilo/bloque hidrófobo que varía de 0,7 a 1,5, preferiblemente de 0,8 a 1,3 y más preferiblemente de 0,8 a 1,2.

25 Un copolímero de bloques de la invención puede tener un peso molecular que varía de 4000 a 35000 y en particular que varía de 4500 a 30000 y más particularmente que varía de 5000 a 25000.

30 Un copolímero de bloques de la invención puede comprender, y preferiblemente consiste en, un contenido de unidades de óxido de etileno de aproximadamente 40%, en particular de aproximadamente 45%, en particular que varía de aproximadamente 45 a aproximadamente 80%, en particular que varía de aproximadamente 45 a 70%, y más particularmente de aproximadamente 45 a aproximadamente 60%, y más preferiblemente de aproximadamente 50%.

35 Un número de copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales de la invención, en particular de copolímeros de bloques tetrafuncionales anfifílicos no iónicos, están disponibles comercialmente bajo nombres comerciales genéricos como "poloxaminas".

En particular, copolímeros de bloques tetrafuncionales anfifílicos no iónicos de la invención están disponibles de BASF (Wyandotte, Mich.) bajo el nombre comercial TetronicTM.

40 Detalles adicionales de poloxaminas adecuadas para la invención se pueden encontrar en Surfactant Systems, Eds. Attwood and Florence, Chapman and Hall, Londres 1983, p 356-361; en The Condensed Encyclopaedia of Surfactants, Ed. Ash and Ash, Edward Arnold, Londres, 1989, en Non-ionic Surfactants, pp. 300-371, Ed. Nace, Dekker, Nueva York, 1996, en Santon, Am. Perfumer Cosmet. 72(4):54-58 (1958); (Dekker, N.Y., 1967) o en el documento US 6.353.055.

45 Según una realización, un copolímero de bloques anfifílico no iónico adecuado para la invención se puede seleccionar de un grupo que consiste en copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 304, copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 704, copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 904 y mezclas de los mismos.

50 Preferiblemente, un copolímero de bloques no iónico de la invención se puede seleccionar de un grupo que consiste en 304, 704, 904 y una mezcla de los mismos, y más preferiblemente de un grupo que consiste en 704, 904 y una mezcla de los mismos.

55 Un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado de la invención comprende al menos un bloque terminal, y preferiblemente un bloque hidrófilo terminal, conjugado con al menos un resto glicosilo.

60 Más preferiblemente, al menos 25%, en particular al menos 50%, en particular al menos 75% y más particularmente al menos 100% de los bloques terminales de un copolímero de bloques de la invención están conjugados con un resto glicosilo.

65 La cantidad de copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado que se puede usar como adyuvante inmunitario de la invención se debe adaptar según diversos parámetros, tales como la cantidad y la naturaleza del antígeno, la especie, el género, el peso, la edad, la dieta, las condiciones, el tratamiento adicional de un individuo que se va a vacunar. Los parámetros a tener en cuenta son muy conocidos para el experto, y la adaptación de la cantidad apropiada de adyuvante inmunitario a ellos pertenece a su trabajo habitual.

5 Un copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado se puede usar en una cantidad que varía de 0,01 a 10% en peso del peso total de una composición que lo contiene, en particular que varía de 0,02 a 5%, más particularmente de 0,05 a 2%, más preferiblemente de 0,1 a 1%, más preferiblemente de 0,1 a 0,5% y más preferiblemente de aproximadamente 0,25%, en peso del peso total de una composición que lo contiene.

Resto glicosilo y métodos de injerto

Un resto glicosilo es un resto de manosa.

10 Un resto de manosa puede comprender de 1 a 5 unidades de manosa, lo que incluye 1, 2, 3, 4 y 5 unidades de manosa, y preferiblemente puede comprender una o dos unidades de manosa, y preferiblemente puede contener una unidad de manosa.

15 Un resto glicosilo puede estar conjugado a un copolímero de bloques de la invención por medio de un enlace covalente establecido entre un grupo funcional del resto glicosilo y un grupo funcional del copolímero de bloques. El enlace covalente puede resultar de una reacción entre los dos grupos funcionales como tales o modificados para ser reactivos. Un resto glicosilo puede estar conjugado directamente a un copolímero de bloques. Alternativamente, un resto glicosilo puede estar conjugado a un copolímero de bloques por medio de un espaciador.

20 Según una realización, un resto glicosilo puede estar conjugado a un copolímero de bloques por medio de una función éter.

25 Según otra realización, un resto glicosilo puede estar conjugado a un copolímero de bloques de la invención por medio de un espaciador que conecta covalentemente un grupo funcional del resto glicosilo y un grupo funcional del copolímero de bloques.

Un espaciador es un grupo basado en hidrocarburo, que comprende opcionalmente heteroátomos, preferiblemente seleccionados de N u O, y que conecta entre sí al menos dos moléculas, tales como un resto glicosilo y un copolímero de bloques.

30 Un espaciador útil para la invención puede conectar un copolímero de bloques con al menos uno o con dos, tres, cuatro o cinc, y preferiblemente con tres, restos glicosilo.

35 Cuando una pluralidad de restos glicosilos está unida a un espaciador, el resto o los restos glicosilo pueden ser idénticos o distintos entre sí, y preferiblemente pueden ser idénticos.

Un espaciador puede estar conectado covalentemente a un copolímero de bloques por medio de una función amino.

Un espaciador puede estar conectado covalentemente a un resto glicosilo por medio de una función éter.

40 Un espaciador puede ser lineal o ramificado.

Un espaciador que conecta un copolímero de bloques con una sola unidad de glicosilo es un espaciador lineal.

45 Un espaciador lineal puede estar conectado covalentemente a un copolímero de bloques por medio de una función amino y puede estar conectado covalentemente a un resto glicosilo por medio de una función éter.

Un espaciador lineal puede ser un (hidroximetil)-4-triazol.

50 Un espaciador que conecta un copolímero de bloques con al menos dos, tres, cuatro o cinco restos glicosilo es un espaciador ramificado.

55 Las ramificaciones pueden estar soportadas por un solo átomo o pueden estar distribuidas a lo largo del esqueleto principal del espaciador. Ni que decir tiene que el número de ramificaciones en un solo átomo depende de la valencia de este átomos. Por ejemplo, un átomo de nitrógeno dentro del esqueleto principal del espaciador será capaz de soportar una ramificación, mientras que un átomo de carbono será capaz de soportar una o dos ramificaciones. Alternativamente, un átomo de nitrógeno en un extremo del esqueleto principal del espaciador será capaz de soportar una o dos ramificaciones, mientras que un átomo de carbono en un extremo del esqueleto principal del espaciador será capaz de soportar una, dos o tres ramificaciones.

60 Preferiblemente, un espaciador ramificado puede comprender al menos un átomo de carbono en un extremo del esqueleto principal que soporta al menos dos, preferiblemente tres ramificaciones.

Un espaciador útil para la invención puede estar conectado covalentemente a un grupo funcional del copolímero de bloques y puede comprender al menos una, preferiblemente dos, tres, cuatro o cinco, y más preferiblemente tres ramificaciones, estando cada una conectada covalentemente a un grupo funcional de un resto glicosilo.

- 5 Un espaciador ramificado puede estar conectado covalentemente a un copolímero de bloques por medio de una función amino y puede estar conectado covalentemente a un resto glicosilo por medio de una función éter.

10 Un resto glicosilo se puede conjugar a un copolímero de bloques anfifílico no iónico de la invención según cualquier técnica conocida en la especialidad que se vaya a adaptar según la naturaleza y según las propiedades químicas tanto del resto glicosilo como del bloque de copolímero.

Un resto glicosilo se puede conjugar a un bloque hidrófilo, en particular un bloque hidrófilo terminar, mediante una reacción química.

- 15 Una reacción química adecuada para la invención se puede realizar mediante acoplamiento directo o química "clic", en particular según se detalla en los ejemplos posteriormente.

20 Como un ejemplo de copolímeros de bloques adecuados para acoplamiento directo o química "clic", se puede mencionar un copolímero de bloques que soporta al menos un grupo hidroxilo, en particular procedente de una unidad de óxido de etileno terminal.

25 Como un ejemplo de conjugación de al menos un resto glicosilo a un copolímero de bloques que soporta al menos un grupo hidroxilo mediante acoplamiento directo, se puede hacer mención al acoplamiento directo entre dicho grupo hidroxilo y el resto glicosilo, que es un resto de manosa, a través de una conexión de O mediante la reacción de un resto tetra-O-acetil-glicósido con el polímero en presencia de trifluoruro de boro-eterato de etilo y la desprotección del azúcar mediante metanoato sódico.

30 El tetra-O-acetil-glicósido se puede obtener según cualquiera de los métodos conocidos en la especialidad. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar acetato de hidrazina con penta-O-acetil-glicósido en un disolvente anhidro, tal como THF. Posteriormente, el tetra-O-acetil-glicósido se puede convertir en tetra-O-acetil-1-O-tricloroacetimidooil-glicósido reactivo en presencia de carbonato potásico y tricloroacetnitrilo, y en presencia de un disolvente anhidro, tal como diclorometano. Este compuesto se puede hacer reaccionar a continuación con un copolímero de bloques que soporta al menos un grupo hidroxilo, por ejemplo en presencia de trifluoruro de boro-eterato de etilo en un disolvente anhidro, tal como diclorometano, para dar 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-O-copolímero de bloques-glicósido. El producto se puede añadir a una solución de metanoato sódico para conducir al copolímero de bloques-glicósido.

35 En una realización preferida, la conjugación de un resto glicosilo a un copolímero de bloques de la invención se puede realizar mediante química "clic".

- 40 Una reacción de química "clic" es una reacción entre dos restos funcionales que conduce a la formación de al menos un enlace covalente entre un átomo de carbono y un heteroátomo.

45 Reacciones de química "clic" que se pueden usar en la invención son definidas, por ejemplo, por Sharpless y cols. (Angew Chem Int, 2001, 40, 2004-2021).

Según una realización preferida, un par de restos funcionales que se puede usar para la invención puede ser el par nitrilo o alcina/azoturo.

- 50 Una reacción de química "clic" se puede realizar en presencia de un catalizador. Como un catalizador útil, se puede hacer mención a un metal de transición tal como Cu.

55 Como un ejemplo de reacción química preferida para la química "clic" según la invención, se puede hacer mención a la reacción química entre un compuesto funcionalizado con azida y un compuesto funcionalizado con alcina, en presencia de cobre (Cu).

60 A modo de ejemplo, el copolímero de bloques de la invención puede estar funcionalizado con un resto azida, en particular en un grupo hidroxilo terminal, por ejemplo procedente de una unidad de óxido de etileno, mientras que el resto glicosilo que se va a conjugar a este copolímero de bloques modificado puede estar funcionalizado con un resto alcina.

65 Como ejemplo de conjugación de al menos un resto glicosilo a un copolímero de bloques que soporta al menos un grupo hidroxilo mediante química "clic", se puede hacer mención a la cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen catalizada por cobre entre un polímero terminado en azido y un resto de manosa modificado para contener un grupo alquino.

Un O-alquinilcarbohidrato, tal como propargil- β -D-glicósido, se puede preparar mediante una reacción entre pentaacetato de β -D-carbohidrato, tal como pentaacetato de β -D-manosa, y alcohol alquinílico, tal como alcohol

propargílico, en diclorometano seco en presencia de trifluoruro de boro-eterato de etilo, seguido por la retirada mediada por metóxido sódico de grupos protectores acetilo.

5 Un copolímero de bloques que soporta al menos un grupo hidroxilo, por ejemplo como una unidad de óxido de etileno terminal, se puede modificar mediante la introducción de al menos un grupo azida según un procedimiento derivado de Mereyala y cols., Carbohydrate Research, 1998, 307, 351; Muthana y cols., J Am Chem Soc, 2007, 129, 11918; Bonger y cols., Bioorg Med Chem, 2007, 15, 4841; Gonçalves y cols., Pharm Res, 2005, 22, 1411-1421; Li y cols., Biomacromol, 2003, 4, 1055; Iyer y cols., Tetrahedron Lett, 2004, 45, 4285. El grupo hidroxilo terminal se puede convertir en primer lugar en un copolímero de bloques derivado bis-tosilado-OTs usando un exceso de cloruro de *p*-toluenosulfonilo e hidróxido potásico en diclorometano anhidro. A continuación, los ésteres de sulfonato se pueden retirar del copolímero de bloques derivado-OTs con azida en etanol absoluto para dar bis-azido-copolímero de bloques.

15 Una cicloadición 1,3-dipolar de azido-copolímero de bloques y propargil-glicósido se puede llevar a cabo usando sulfato de cobre / ascorbato sódico en *t*-BuOH / H₂O para dar una copolímero de bloques-triazolo-manosa.

Antígeno

20 Según una realización, un antígeno que se va a combinar con un adyuvante inmunitario de la invención puede ser un antígeno procedente de bacterias, virus, hongos o células cancerosas.

25 Por el término "antígeno" se entiende un material biológico (natural, recombinante o sintético) de tipo peptídico o nucleotídico, que estimula una respuesta inmunitaria protectora en animales. Un antígeno adecuado para la invención puede ser una secuencia de aminoácidos tal como un péptido o una proteína, o una secuencia de ácidos nucleicos tal como secuencias híbridas de ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNt, ARNr, ARN interferente (ARNi) pequeño o secuencias sintéticas o semisintéticas de oligonucleótidos que pueden haber sido modificados o no.

30 Un antígeno adecuado para la invención se puede obtener a partir de un organismo seleccionado del grupo que consiste en bacterias, virus, parásitos, rickettsias, protozoos y células cancerosas.

35 Ejemplos de las bacterias se pueden seleccionar del grupo que consiste en *Bordetella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Leptospira spp.*, *Escherichia spp.*, *Salmonella spp.*, *Pasteurella spp.*, *Mycobacteria spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Moraxella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Borrelia spp.*, *Fusobacteria spp.*, *Bacteriodes spp.* y *Rhodococcus spp.*

Ejemplos de los virus se pueden seleccionar del grupo que consiste en herpesvirus, parainfluenzavirus, reovirus, rotavirus, morbilivirus, retrovirus, coronavirus, adenovirus, togavirus, parvovirus, parapoxvirus, paramixovirus, citomegalovirus, arbovirus y hantavirus.

40 Ejemplos de parásitos y protozoos se pueden seleccionar del grupo que consiste en *Neospora spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Dirofilaria spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.*, *Babesia spp.* y *Coccidia spp.*

45 Un ejemplo de rickettsia se puede seleccionar del grupo que consiste en *Chlamydia spp.*, fiebre equina del Potomac, *Ehrlichia canis* y otras *Ehrlichia spp.*

Ejemplos de antígenos obtenidos de células cancerosas se pueden seleccionar del grupo que consiste en alfafetoproteína, Mela1, NY-ESO-1, antígenos BAGE, antígenos MAGE, antígenos GAGE, MART1, MUC1 y CA-125.

50 Los antígenos se pueden obtener de un cultivo entero de un organismo tal como una recolección de un cultivo entero, una recolección de un cultivo entero parcialmente purificada, una subunidad purificada extraída de la recolección, una subunidad obtenida a través de tecnología recombinante y expresada en el organismo homólogo o uno heterólogo, un mutante de eliminación del organismo entero (mutantes de eliminación de gen convencionales o de ADNr), péptidos, ADN desnudo, antígenos sintetizados químicamente, ADNc desnudo transcrito inversamente o combinaciones de los mismos.

55 Generalmente, un antígeno se puede producir mediante técnicas conocidas en la especialidad de cultivo y recolección de organismos, concentrando y/o purificando convencionalmente antígenos de estos organismos. Por ejemplo, un antígeno se puede producir al: hacer crecer el organismo seleccionado en un cultivo que tiene medio de crecimiento. Más específicamente, el organismo se puede hacer crecer en un cultivo tisular preparado a partir de células de mamífero o planta. El organismo también se puede hacer crecer en medios de fermentación en los que el organismo crece sin cultivo tisular pero tiene añadido al mismo un medio de crecimiento.

60 Las vacunas de la invención se pueden usar en el tratamiento o la profilaxis de una amplia gama de enfermedades y trastornos, tales como:

- enfermedades y trastornos en los que están implicados virus: Retroviridae (p. ej. los virus de inmunodeficiencia humana incluyendo HIV-1); Picornaviridae (p. ej. poliovirus, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (p. ej. cepas que provocan gastroenteritis); Togaviridae (p. ej. virus de la encefalitis equina, virus de la rubeola); Flaviridae (p. ej. virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (p. ej. coronavirus); Rhabdoviridae (p. ej. virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (p. ej. virus del Ébola); Paramyxoviridae (p. ej. virus de la parainfluenza, virus de las paperas, virus de sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (p. ej. virus de la gripe); Bungaviridae (p. ej. virus de Hantaan, bungavirus, flebovirus y nairovirus); Arena viridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (p. ej. reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Pan/oviridae (parvovirus); Papovaviridae (papilomavirus, poliomasvirus); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus zóster de la varicela, citomegalovirus (CMV), herpesvirus; Poxviridae (virus de la varicela, virus vacunales, poxvirus); e Iridoviridae (p. ej. virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (p. ej. los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), el virus HCV (que provoca hepatitis no A no B); virus Norwalk y relacionados y astrovirus). De los precedentes, se prefieren particularmente VIH, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, virus de la rabia, poliovirus, virus de la gripe, virus de la meningitis, virus del sarampión, virus de las paperas, rubeola, pertussis, virus de la encefalitis, papilomavirus, virus de la fiebre amarilla, virus sincitial respiratorio, parvovirus, virus chikungunya, virus de la fiebre hemorrágica y herpesvirus, particularmente, varicela, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr. En estas realizaciones, el antígeno o los antígenos seleccionados para el uso en una vacuna se derivan de (o se diseñan mediante referencia a) los antígenos presentes en el virus presente en la naturaleza (o expresados/inducidos por el mismo durante la infección).

- enfermedades y trastornos en los que están implicadas bacterias gramnegativas y grampositivas: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp (p. ej. *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del Grupo B), *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, cualquiera de las especies anaeróbicas del género *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium* spp. (incluyendo *C. diphtheriae*), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* spp (incluyendo *K. pneumoniae*), *Pasturella multocida*, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira* spp., *Rickettsia* spp. y *Actinomyces* spp. (incluyendo *A. israelii*). En estas realizaciones, el antígeno o los antígenos seleccionados para el uso en la vacuna se derivan de (o se diseñan mediante referencia a) los antígenos presentes en la bacteria presente en la naturaleza (o expresados/inducidos por la misma durante la infección).

- enfermedades y trastornos en los que están implicados hongos: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis* y *Candida albicans*, en estas realizaciones, el antígeno o los antígenos seleccionados para el uso en la vacuna se derivan de (o se diseñan mediante referencia a) los antígenos presentes en el hongo presente en la naturaleza (o expresados/inducidos por el mismo durante la infección).

- enfermedades y trastornos en los que están implicados protozoos: *Plasmodium* spp. (incluyendo *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax*), *Toxoplasma* spp. (incluyendo *T. gondii* y *T. cruzii*) y *Leishmania* spp.

- enfermedades y trastornos en los que están implicadas células cancerosas: cánceres de los sistemas sanguíneo y linfático (incluyendo enfermedad de Hodgkin, leucemias, linfomas, mieloma múltiple y enfermedad de Waldenström), melanomas (incluyendo melanoma ocular), adenomas, sarcomas, carcinomas de tejidos sólidos, melanoma, cánceres de pulmón, tiroides, glándula salivar, pierna, lengua, labio, conducto biliar, pelvis, mediastino, uretra, sarcoma de Kaposi (p. ej. cuando está asociado con sida); cánceres de piel (incluyendo melanoma maligno), cánceres del tracto digestivo (incluyendo cánceres de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de colon y rectal, cáncer anal), cánceres de los sistemas genital y urinario (incluyendo cáncer de riñón, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de testículo, cáncer de próstata), cánceres en mujeres (incluyendo cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer ovárico, cánceres ginecológicos y coriocarcinoma) así como en tumores cerebrales, carcinoides óseos, nasofaríngeos, retroperitoneales, tiroideos, de tejidos blandos y cánceres de emplazamiento primario desconocido. En estas realizaciones, el antígeno o los antígenos seleccionados para el uso en la vacuna son el neoantígeno o los neoantígenos cognados o el antígeno o los antígenos asociados a tumores presentes en las células y/o los tejidos malignos.

- enfermedades y trastornos en los que están implicados parásitos metazoarios, tales como helmintos (p. ej. *Schistosoma* spp.).

En una realización preferida, un antígeno útil para la invención es un antígeno peptídico o proteínico.

5 Un antígeno está combinado naturalmente con un adyuvante inmunitario de la invención en una cantidad inmunogénicamente eficaz. Una "cantidad inmunogénicamente eficaz" significa que el antígeno contiene un componente protector en una concentración suficiente para proteger a los animales de una enfermedad elegida cuando se administra a un individuo una vacuna que contiene un adyuvante inmunitario de la invención y que contiene el antígeno. Como ejemplos de cantidades inmunogénicamente eficaces de un antígeno, se pueden mencionar cantidades que varían de 0,01 a 100 µg.

10 Composición de vacuna

Una composición de vacuna adecuada para la invención puede ser una vacuna viva, una vacuna muerta o inactivada y una vacuna subunitaria.

15 Las vacunas vivas generalmente están atenuadas de modo que sean capaces de montar una respuesta inmunitaria prolongada a sus antígenos sin producir la enfermedad con la que normalmente están asociadas.

20 Las vacunas muertas están inactivadas por medios químicos u otros que no inactivan los factores antigénicos que presentan al sistema inmunitario del hospedador.

25 Para algunos vectores de enfermedad, ni siquiera la muerte del organismo evita que provoque efectos no deseados en el receptor. En estos casos, el agente se debe fragmentar en subunidades o subfracciones que, por sí mismas, no son patógenas.

Preferiblemente, una vacuna de la invención es una vacuna subunitaria.

30 Una vacuna de la invención se puede administrar de cualquier modo prescrito para la vacuna particular utilizada, y preferiblemente de modo parenteral, esto es, subcutáneamente, intravenosamente, intramuscularmente o intraperitonealmente.

Una vacuna de la invención se puede usar en terapia bien veterinaria o bien humana.

35 Una vacuna de la invención se puede preparar al disolver o suspender un adyuvante inmunitario de la invención en el diluyente del antígeno y a continuación combinar volúmenes adecuados de la solución de adyuvante inmunitario y la solución de antígeno a la dilución de antígeno apropiada. Los diluyentes de antígeno son los convencionales en la especialidad, tales como solución salina tamponada con fosfato, medio esencial mínimo, peptona y similares.

40 Se puede usar cualquier excipiente adecuado en la especialidad, incluyendo, por ejemplo, diluyentes inertes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y conservantes. Diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato sódico y cálcico, fosfato sódico y cálcico y lactosa, mientras que el almidón y el ácido algínico son agentes desintegrantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato magnésico, ácido esteárico o talco.

45 Además de un adyuvante inmunitario de la invención, una vacuna según la invención puede comprender un adyuvante inmunitario distinto. Se puede usar cualquier adyuvante inmunitario conocido en la especialidad y distinto del adyuvante inmunitario de la invención. Como ejemplos de adyuvante inmunitario distinto adicional se puede hacer mención a adyuvante completo e incompleto de Freund, sales de aluminio, escualeno o agonistas de receptores tipo Toll, tales como poli(I:C), lipopolisacárido u oligodexosinucleótidos de CpG.

50 Una vacuna de la invención puede tomar cualquier forma adecuada, e incluyen, por ejemplo, comprimidos, elixires, cápsulas, soluciones, suspensiones, polvos, gránulos y aerosoles.

55 Para el uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, los compuestos de la invención se proporcionarán generalmente en soluciones o suspensiones acuosas estériles, tamponadas hasta un pH y una isotonicidad apropiados.

60 Vehículos acuosos adecuados incluyen solución de Ringer y cloruro sódico isotónicos. Las suspensiones acuosas según la invención pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona y goma de tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y n-propilo.

65 La cantidad de copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado en una vacuna de la invención puede variar según la naturaleza de la vacuna, la unidad de dosificación particular empleada, el periodo de

tratamiento, la edad, el peso, el tipo de tratamiento adjunto (si lo hay) y el sexo del paciente tratado, la naturaleza y el grado del trastorno tratado y la naturaleza del antígeno administrado.

5 La presente invención se describirá más a fondo con la ayuda de los siguientes ejemplos y figuras que se deben considerar ilustrativos y no limitativos.

Figuras

La Figura 1 ilustra la ruta de síntesis química usada para obtener 704 manosilado mediante química "clic" (a) y acoplamiento directo (b).

10 La Figura 2 ilustra los efectos del modo de acoplamiento de manosa a polímeros tetrafuncionales sobre la respuesta inmunitaria después de la vacunación subunitaria. Grupos de ratones fueron infectados subcutáneamente el día 0 y el día 21 con β -galactosidasa formulada como 0,25% de 704-M, 904-M y 704-O-M, 904-O-M, sintetizada mediante química "clic" (barras blancas, 704-M y 904-M) y acoplamiento directo (barras grises, 704-O-M y 904-O-M), respectivamente. Las Fig. 2(a) y 2(c) ilustran la respuesta humoral el día 21 (barras rayadas verticales) y 42 (barras rayadas horizontales) de ratones inyectados con 25 μ g de β -galactosidasa formulada con 704-M, 704-O-M, 904-M y 904-O-M. La Fig. 2(b) y 2(d) ilustran la respuesta celular restringida a la clase I el día 42 de ratones inyectados con β -galactosidasa formulada con 704-M, 704-O-M, 904-M y 904-O-M. Para la respuesta humoral y la respuesta celular, se muestran los títulos medios para cada grupo +/- desviación estándar para n=6 ratones inyectados.

20 La Figura 3 ilustra los efectos de vectores dirigidos a 704-M sobre la respuesta inmunitaria después de la vacunación subunitaria. Grupos de ratones fueron inyectados subcutáneamente el día 0 y el día 21 con β -galactosidasa formulada con 704 y 704-M. La Fig. 3(a) ilustra la respuesta humoral el día 42 de ratones inyectados con 25 μ g de β -galactosidasa formulada en medio complejo con diversas concentraciones de 704-M que varían de 0,05 a 2%. La Fig. 3(b) ilustra la respuesta humoral el día 21 (barras rayadas verticales) y el día 42 (barras rayadas horizontales) de ratones inyectados con β -galactosidasa formulada bien con 704 (barras blancas) o bien con 704-M (barras grises). La Fig. 3(c) ilustra una respuesta celular restringida a la clase I el día 42 de ratones inyectados con β -galactosidasa formulada bien con 704 (barra blanca) o bien con 704-M (barra gris). La Fig. 3(d) ilustra una respuesta humoral de ratones inyectados con diversas cantidades de β -galactosidasa formulada con un 0,25% de 704-M constante. La Fig. 3(e) ilustra una respuesta humoral el día 21 (barras rayadas verticales) y el día 42 (barras rayadas horizontales) de ratones Balb/c inyectados con 25 μ g formulados con 0,25% de 704 (barra blanca) o 704-M (barra gris). Para la respuesta humoral y la respuesta celular, se muestran los títulos medios para cada grupo +/- desviación estándar para n=6 ratones inyectados.

35 La Figura 4 ilustra el efecto del medio de formulación sobre la vacunación subunitaria con vector 704. Grupos de ratones fueron inyectados subcutáneamente con 25 μ g de β -galactosidasa formulada con 0,25% bien de 704 (barras blancas) o bien de 704-M (barras grises) en solución salina o medio complejo. La respuesta humoral se midió 42 días después de la primera inyección (barras rayadas horizontales) y el refuerzo el día 21 (barras rayadas verticales). Para la respuesta humoral, se muestran los títulos medios para cada grupo +/- desviación estándar para n=6 ratones inyectados.

La Figura 5 ilustra la eficacia de la vacunación con 704-M con β -galactosidasa en estudios en perros. El perro fue inyectado s.c. con 150 μ g de β -galactosidasa formulada con 704-M. Se midieron anticuerpos específicos para β -galactosidasa en diversos puntos temporales después de una sola inyección.

40 Ejemplos

Material y métodos

45 Formulaciones. Los 704, 904, 704-M y 904-M fueron suministrados amablemente por In-Cell-Art (Nantes, Francia). La β -galactosidasa fue proporcionada por Roche (Rosny-Sous-Bois, Francia). La β -galactosidasa o la ovoalbúmina se formularon inmediatamente antes de la inyección subcutánea (s.c.). La formulación con adyuvante incompleto y completo de Freund se realizó según el protocolo del fabricante (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia).

Manosilación de 704 y 904 mediante química "clic" (704-M y 904-M)

2-Propinil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido

5 Bajo atmósfera de nitrógeno, se añadió gota a gota a 0°C trifluoruro de boro-eterato de etilo (7,90 ml, 64 mmol, 5 equiv) a una solución de pentaacetato de α -D-manopiranososa (5 g, 12,8 mmol) y alcohol propargílico (2,98 ml, 51,2 mmol, 4 equiv) en diclorometano anhidro (150 ml) y la solución se agitó a 0°C durante 4 días. Se añadió carbonato potásico anhidro (8 g) y la mezcla de reacción se agitó 1 h más y se filtró. El filtrado se diluyó con diclorometano (200 ml), se lavó con agua (3 \times 200 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró para proporcionar 2-propinil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido (4,95 g, rendimiento cuantitativo) como un aceite pardo que se usó sin purificación adicional. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ = 5,38-5,20 (m, 3H, H_{2,3,4}), 5,02 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H₁), 4,27 (dd, J = 5,2, 12,2 Hz, 1H, H₆), 4,26 (d, J = 2,4 Hz, 2H, OCH₂C \equiv CH), 4,10 (dd, J = 2,5, 12,2 Hz, 1H, H₆), 4,45-3,72 (m, 1H, H₅), 2,46 (t, J = 2,4 Hz, 1H, C \equiv CH), 2,15, 2,09, 2,03, 1,98 (4s, 4 \times 3H, OCOCH₃) ; ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃) : δ = 170,7, 170,0, 169,9 y 169,8 (OCOCH₃), 96,4 (C₁), 78,0 (C \equiv C-H), 75,7 (C \equiv C-H), 69,5 (C₅), 69,1 (C₄), 69,0 (C₃), 66,2 (C₂), 62,5 (C₆), 55,1 (OCH₂C \equiv C-H), 20,9, 20,8 \times 2 y 20,7 (OCOCH₃); MS (ESI) : m/z = 409,0 [M+Na]⁺.

Propargil- α -D-manopiranosido

15 Se disolvió 2-propinil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido (990 mg, 2,56 mmol) en una solución de metóxido sódico (69 mg, 1,28 mmol, 0,5 equiv) en metanol seco (15 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 24 h, se neutralizó con resina DOWEX (H⁺), se filtró y se concentró para proporcionar propargil- α -D-manopiranosido (559 mg, rendimiento cuantitativo) como un aceite que se usó sin purificación adicional. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) : δ = 5,02 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H₁), 4,38-4,22 (m, 2H, OCH₂C \equiv CH), 3,98-3,56 (m, 6H, H_{2,3,4,5,6}), 2,90 (t, J = 2,4 Hz, 1H, C \equiv CH) ; ¹³C NMR (100,6 MHz, D₂O) : δ = 99,1 (C₁), 79,1 (C \equiv CH), 76,5 (C \equiv CH), 73,4 (C₂), 70,8 (C₅), 70,2 (C₃), 66,9 (C₄), 61,1 (C₆), 54,9 (OCH₂C \equiv CH) ; MS (ESI) : m/z = 240,8 [M+Na]⁺, 218,9 [M+H]⁺.

Copolímero de bloques 704 tetratosilado: 704-OTs

25 Bajo atmósfera de nitrógeno, se añadió cloruro de *p*-toluenosulfonilo (416 mg, 2,18 mmol, 12 equiv) a una solución de 704 (1 g, 182 μ mol) en diclorometano anhidro (16 ml) en presencia de tamiz molecular de 4 Å. La mezcla se enfrió hasta 0°C con un baño de hielo y se añadió cuidadosamente hidróxido potásico el polvo (163 mg, 2,90 mmol, 16 equiv) en pequeñas porciones a una temperatura por debajo de 5°C. La mezcla se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 6 días y se diluyó con diclorometano (150 ml). La capa orgánica se lavó con agua (3 \times 100 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró para proporcionar 704-OTs (948 mg, 91% de funciones tosiladas) como un aceite que se usó sin purificación adicional. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ = 7,79 (d, J = 8,3 Hz, Har), 7,33 (d, J = 8,3 Hz, Har), 4,15 (t, J = 4,9 Hz, CH₂OTs), 3,70-3,30 (m, [CH₂CH₂O]_n, [CH₂CH(CH₃)O]_n, CH₂N), 2,44 (s, CH₃), 1,17-1,08 (m, [CH₂CH(CH₃)O]_n).

Copolímero de bloques 704 tetra-azido: 704-N₃

35 Se añadió azida sódica (280 mg, 4,31 mmol, 25 equiv) a una solución de 704-OTs (948 mg, 172 μ mol) en etanol absoluto (8 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente a 80°C durante 6 días. A continuación, la solución se concentró y el residuo se disolvió en agua (15 ml) y se purificó mediante diálisis (MCWO = 2000) frente a agua desionizada MilliQ (6 \times 1,5 l) a 4°C, seguido por liofilización para proporcionar 704-N₃ como un aceite amarillo (583 mg, conversión cuantitativa, 91% de funciones azido). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ = 3,70-3,30 (m, CH₂N₃, [CH₂CH₂O]_n, [CH₂CH(CH₃)O]_n, CH₂N), 1,17-1,07 (m, [CH₂CH(CH₃)O]_n) ; ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃) : δ = 75,6, 75,5, 75,3, 73,5, 73,1, 73,0, 71,0, 70,9, 70,8, 70,7 y 70,2 ([CH₂CH₂O]_n, [CH₂CH(CH₃)O]_n, CH₂N, CH₂CH₂N₃), 50,8 (CH₂N₃), 17,6 y 17,5 ([CH₂CH(CH₃)O]_n). Anál. Calc. para 704-N₃ : C, 57,70 ; H, 9,68 ; N, 3,44. Encontrado: C, 57,25 ; H, 9,75 ; N, 2,85.

704 manosilado: 704-Triazolo-Man (704-M)

45 Una solución recientemente preparada de pentahidrato de sulfato de cobre (II) (90,7 mg, 364 μ mol, 2 equiv) y ascorbato sódico (288 mg, 1,45 mmol, 8 equiv) en agua (6 ml) se añadió a temperatura ambiente a una solución de propargil- α -D-manopiranosido (476 mg, 218 mmol, 12 equiv) en agua (6 ml). La mezcla resultante se añadió a una solución de 704-N₃ (1 g, 182 μ mol) en *tert*-butanol (12 ml). Después de 48 h de agitación a 55°C, se añadió dihidrato de sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 677 mg, 1,82 mmol, 10 equiv) en agua (15 ml) y la agitación se continuó durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción en bruto se purificó mediante diálisis (membrana de diálisis Cellu-Sep® H1 1.000 MCWO) frente a agua desionizada MilliQ (6 \times 1,5 l) a 4°C, seguido por liofilización para proporcionar 704-Triazolo-Man como un aceite pardo (221 mg, hasta 85% de incorporación de manosa). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) : δ = 8,11 (s, 4H, H triazol), 4,95 (s, 4H, H₁ manosa), 4,83 (d, J = 12,4 Hz, 4H, OCH₂-triazol), 4,70 (d, J = 12,4 Hz, 4H, OCH₂-triazol), 4,63 (t, J = 4,8 Hz, 8H, OCH₂CH₂N), 3,97 (t, J =

4,8 Hz, 8H, OCH_2CH_2N), 3,92-3,25 (m, $H_{2,3,4,5,6}$ galactosa, CH_2N , $[CH_2CH_2O]_n$, $[CH_2CH(CH_3)O]_n$), 1,42-0,89 (m, $[CH_2CH(CH_3)O]_n$); ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O): δ = 143,8 (NCH=C), 126,0 (NCH=C), 99,7 (C_1 manosa), 75,8, 75,7, 75,6, 74,8, 73,3, 72,6, 72,3, 70,8, 70,3, 69,9, 69,8, 69,1, 67,9, 67,0, 61,2, 60,0, 50,4, 17,5, 16,4.

- 5 Se aplicó el mismo procedimiento que se describe anteriormente para preparar 904 manosilado mediante química "clic" (904-M).

Manosilación de 704 y 904 mediante conexión con O (704-O-M y 904-O-M)

2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-manopiranosido

- 10 Bajo atmósfera inerte, se añadió acetato de hidracina (190 mg, 2,06 mmol, 1,35 eq) a una solución de penta-O-acetil- α -D-manopiranosido (596 mg 1,53 mmol) en THF anhidro (6 ml) en presencia de un tamiz molecular de 4 Å. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h 30, se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (CH_2Cl_2/CH_3OH ; 25:1) para dar 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-manopiranosido (383,3 mg, 78%) como un aceite amarillo. RMN 1H ($CDCl_3$): δ = 5,41 (m, 0,5H, $H_{1\alpha}$), 5,40 (m, 0,5H, $H_{1\beta}$), 5,31-5,19 (m, 3H, $H_{4,3,2}$), 4,30-4,06 (m, 3H, $H_{5,6a,6b}$), 2,21-1,98 (m, 12H, CH_3CO). RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ = 176,2, 171,2, 170,5 et 170,2 (C=O), 92,6 (C_1), 71,5 (C_4) 69,2 (C_3), 68,9 (C_2), 66,6 (C_5), 62,9 (C_6), 21,3, 21,2, 21,1 et 20,9 (4 \times CH_3CO).

2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-O-tricloroacetimidol- α -D-manopiranosido

- 20 Bajo atmósfera inerte, se añadieron sucesivamente carbonato potásico (836 mg, 6,05 mmol, 6,7 eq) y tricloroacetnitrilo (0,78 ml, 7,8 mmol, 8,8 eq) a una solución de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-manopiranosido (310 mg, 0,89 mmol) en diclorometano anhidro (20 ml) en presencia de un tamiz molecular de 4 Å. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h y a continuación se filtró y se evaporó para dar 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-O-tricloroacetimidol- α -D-manopiranosido (457 mg, 96%) como un aceite incoloro.

2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-O-704- α -D-manopiranosido (704-manAc4) :

- 25 Bajo atmósfera de nitrógeno, se añadió a temperatura ambiente trifluoruro de boro-eterato de etilo (200 μ l, 1,62 mmol, 25 equiv) a una solución de 704 (377,6 mg, 69 μ mol) y tricloroacetamido de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido (509,4 mg, 1,03 μ mol, 15 equiv) en diclorometano anhidro (20 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución se concentró bajo presión reducida, se diluyó con tampón de fosfato (pH 7, 4 ml) y se purificó mediante diálisis (membrana de diálisis Cellu-Sep® H1 2.000 MCWO) frente a agua desionizada MilliQ (6 \times 1,5 l) a 4°C, seguido por liofilización para proporcionar 704-ManAc4 como un aceite amarillo
- 30 (290 mg, hasta 35% de incorporación de manosa acetilada). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,36 (dd, J = 3,4, 10,1 Hz, 1H, H_4), 5,30-5,25 (m, 2H, H_2 , H_3), 4,86 (d, J = 3,3 Hz, 1H, H_1), 4,34-4,13 (m, 4H, $CH_2OgalAc_4$, H_5 , H_6), 3,80-3,21 (m, $[CH_2CH_2O]_n$, $[CH_2CH(CH_3)O]_n$, CH_2N), 2,15, 2,10, 2,03 et 1,98 (4 \times s, 4 \times 3H, CH_3CO), 1,15-1,05 (m, $[CH_2CH(CH_3)O]_n$); RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 97,9 (C_1), 77,5, 77,2, 76,8, 75,7, 75,5, 73,5, 73,0, 72,7, 71,0, 70,7, 70,5, 70,1, 69,2 (C_2), 68,7(C_4), 66,3, 62,6, 61,9 (C_6), 29,8, 21,0 \times 2 et 20,8 (4 \times CH_3CO), 17,6, 17,4.

- 35 Copolímero de bloques de 704 1-O-704- α -D-Manopiranosido: 704-O-M

- 40 El producto 704-manAc4 (296 mg, 43 μ mol) se añadió a una solución de metanoato sódico recientemente preparada (200 mM, 1,7 mmol, 29 eq.), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y a continuación se concentró bajo presión reducida, se diluyó con tampón de fosfato (pH 7, 4 ml) y se purificó mediante diálisis (membrana de diálisis Cellu-Sep® H1 2.000 MCWO) frente a agua desionizada MilliQ (6 \times 1,5 L) a 4°C, seguido por liofilización para conducir a 704-Man como un aceite amarillo (246 mg, hasta 35% de incorporación de manosa acetilada). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,87 (d, J = 3,4 Hz, 1H, H_1), 3,85-3,75 (m, 2H, CH_2Ogal), 3,70-3,25 (m, $H_{2,3,4,5,6}$ $[CH_2CH_2O]_n$, $[CH_2CH(CH_3)O]_n$, CH_2N), 1,22-1,02 (m, $[CH_2CH(CH_3)O]_n$); RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ = 100,5 (C_1), 77,7, 77,4, 77,1, 76,2, 75,9, 75,7 (C_5), 74,9 (C_3), 74,2, 74,0, 73,7, 73,3 (C_2), 73,0, 72,3 (C_4), 72,1, 71,2, 70,9 70,6, 68,9, 67,1, 62,1 (C_6), 18,9, 18,6, 17,8, 17,7.

- 45 Se aplicó el mismo procedimiento que se describe anteriormente para preparar 904 manosilado mediante acoplamiento directo (904-O-M).

- 50 Procedimientos en animales. Se usaron para los experimentos ratones C57bl/6 hembra (Janvier, Le Genest Saint Isle, Francis) de 8 semanas de edad. Los animales se alojaron en cajas de plástico de dimensiones estándar para alojar ratones. Los animales se pusieron en un entorno de aire acondicionado (15 - 21°C). El ciclo artificial de día/noche implicaba 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con la luz encendida a las 8:00 a.m. Antes de cada inyección, los ratones fueron anestesiados mediante isoflurano. Las formulaciones sintéticas de proteínas recombinantes se inyectaron usando un jeringa microfina U100 (BD Medical Rungis, Francia). Cada animal fue

inyectado subcutáneamente (s.c.) con 100 μ l siguiendo un esquema de cebado/refuerzo el día 0 y 21. Se recogieron muestras de sangre el día 0, 21 y 42 para todos los ratones del seño retroorbital usando una pipeta de vidrio. Las muestras de sangre se calentaron hasta 37°C durante 30 minutos y a continuación se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos. El suero se recogió y se almacenó a -80°C. El día 42, los ratones fueron sacrificados, se recogieron muestras de sangre y el bazo se usó para análisis por ELISPOT.

Un perro beagle macho (ENV, Nantes, Francia) fue inyectado subcutáneamente en la región interescapular con 150 μ g de proteína recombinante de β -galactosidasa formulada con 0,25% de 704-M en un medio de Tyrode (CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 6 mM, NaCl 140 mM, glucosa 10 mM y Hepes 10 mM, pH 7,4; Tyrode Pharmacology. Filadelfia, 1908, 2ª Edición, 1912). La formulación de 1 ml se inyectó usando una jeringa de 2,5 ml con una aguja de 21G.

Medida de la respuesta inmunitaria. El título de anticuerpos de ratón (IgG total) específico para β -galactosidasa se midió mediante ELISA. Se usó proteína de β -galactosidasa para revestir los pocillos durante la noche a 4°C. Después de una hora de saturación con BSA a temperatura ambiente, las diluciones de suero se incubaron a 37°C durante una hora y media. A continuación, anti-(IgG de ratón) caprino conjugado a peroxidasa, diluido a 1/5000, se incubó a temperatura ambiente durante una hora y, después de la adición del sustrato de peroxidasa, las placas se leyeron espectrofotométricamente a 490 nm. Para cada ratón, se probaron el suero preinmunitario, anterior al refuerzo 1 y final a 4 diluciones: 1/20, 1/200, 1/2000, 1/20000. El título del patrón se fijó arbitrariamente a 5000, y se diluyó de 1/1000 a 1/64000 para construir la curva de calibración. Cada una de las muestras de dilución probadas con OD incluida en la parte lineal de la curva de calibración se conservó para la determinación del título del anticuerpo. Se excluyeron otras diluciones. El título de los anticuerpos del perro (IgG total) específico para β -galactosidasa se midió mediante ELISA según se describe anteriormente con algunas pequeñas modificaciones. Brevemente, se usó anti(IgG canina) caprino conjugado a peroxidasa a una dilución 1/5000. El título del patrón se fijó arbitrariamente a 5000. El título de los anticuerpos de ratón (IgG total) específico para ovoalbúmina se midió mediante ELISA al adaptar el protocolo descrito para la determinación del título de anti- β -galactosidasa de ratón.

La secreción de IFN γ restringida a la clase I se determinó mediante ELISPOT (Diaclone, Besançon, Francia), como un marcador de la presencia de β Gal CTL. El péptido ICPMYARV restringido a H2-Kb se usó como un epítipo de β Gal representativo. El control negativo era el péptido KRWILGLNK (gag 263-272 de VIH). Los esplenocitos vivos se contaron sobre un portaobjetos de hemocitómetro mediante exclusión con azul de tripano, se resuspendieron a 1×10^6 /ml en medio completo (RPMI 1640 complementado con 10% de suero de ternero fetal, 2 mmol/l de l-glutamina, penicilina y estreptomycin - todos de Invitrogen, Paisley, RU), a continuación se distribuyeron por triplicado a 1×10^5 células/pocillo. Las células se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂ en presencia de 5 μ g/ml de concanavalina A o 4 μ g/ml de péptido. Las SFCs se detectaron según el protocolo del fabricante, se contaron automáticamente en un lector AID ELISPOT (Autoimm- β Diagnostika, Strassberg, Alemania) y los resultados se expresaron como SFC/millón de esplenocitos. Para corregir los errores de recuento celular, los recuentos de SFC específicos para el péptido procedentes del ratón n° se normalizaron al multiplicar por SFC estimuladas con ConA medias en todos los pocillos divididas por SFC estimuladas con ConA procedentes del ratón n°. Se encontró por consiguiente que la normalización reducía la varianza dentro del grupo. La secreción de IFN γ restringida a la clase I también se determinó mediante ELISPOT según se describe anteriormente para la cuantificación de células específicas ovoalbúmina CD8. El péptido SIINFEKL restringido a H2-Kb se usó como un epítipo de ovoalbúmina representativo.

Ejemplo 1

Síntesis y caracterización de copolímeros de bloques manosilados

Para probar el potencial de vectores elegidos como adyuvante para la vacunación subunitaria, copolímeros de bloques tetrafuncionales anfífilos se modificaron químicamente al introducir un ligando dirigible de a manosa. A continuación, se analizó su capacidad para inducir respuesta humoral y celular después de la formulación con antígeno recombinante e inyección subcutánea.

La incorporación de residuos manosilo en los extremos distales del copolímero de bloques anfífilo tetrafuncional 704 se realizó siguiendo dos estrategias químicas (Fig. 1); (a) mediante química "clic" que se basa en la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por cobre entre el polímero terminado en azido y el resto de manosa que contiene un grupo alquino (Fig. 1a) y (b) mediante el acoplamiento directo entre el grupo hidroxilo de los polímeros tetrafuncionales y la manosa a través de una conexión de O mediante la reacción de un 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-O- α -D-manopiranosido con los polímeros en presencia de trifluoruro de boro-eterato de etilo y la desprotección del azúcar mediante metanoato sódico (Fig. 1b). 704 manosilados obtenidos mediante química "clic" y acoplamiento directo se denominaron respectivamente 704-M y 704-O-M. Para el enfoque de química "clic", el O-alquil-carbohidrato se preparó fácilmente mediante la reacción entre pentaacetato de β -D-manosa y alcohol propargílico en diclorometano seco en presencia de trifluoruro de boro-eterato de etilo, seguido por retirada con metóxido sódico de los grupos protectores acetilo. Se obtuvo propargil- β -D-manopiranosido con un rendimiento cuantitativo sin formación del anómero α no deseado.

La introducción de grupos azida en el extremo de PEO del 704 tetrafuncional se desarrolló usando un procedimiento en dos etapas modificado que previamente se ha aplicado al polietilenglicol (Mereyala y cols., Carbohydrate Research, 1998, 307, 351; Muthana y cols., J Am Chem Soc, 2007, 129, 11918; Bonger y cols., Bioorg Med Chem, 2007, 15, 4841; Gonçalves y cols., Pharm Res, 2005, 22, 1411-1421; Li y cols., Biomacromol, 2003, 4, 1055; Iyer y cols., Tetrahedron Lett, 2004, 45, 4285). Los extremos distales hidroxilados 704 se convirtieron en el derivado bis-tosilado copolímero de bloques-OTs usando un exceso de cloruro de *p*-toluenosulfonilo (3 equivalentes por grupo hidroxilo) e hidróxido potásico en diclorometano anhidro. La conversión de grupos hidroxilo se determinó mediante experimentos de ¹H NMR a 400 MHz usando la integración comparativa de la señal de CH₃ de PPO a δ = 1,18-1,03 ppm (multiplete, 150H) y la señal de CH₂OTs del metileno de PEO terminal a δ = 4,14 ppm o las señales aromáticas del tosilo a δ = 7,78 y 7,33 ppm. Este método indicaba que hasta 91% de los extremos terminales del 704 estaba funcionalizado. El desplazamiento completo de los ésteres de sulfonato de 704-OTs con ion azida se realizó en etanol absoluto a 80°C y daba el bis-azido 704-N₃. Los análisis de ¹H NMR mostraban una desaparición total de las señales aromáticas de tosilo y un desplazamiento descendente de la señal de protones de metileno de PEO terminal hacia la señal de -OCH₂CH₂- amplia. Los experimentos de ¹³C NMR también confirmaban la conversión cuantitativa de ésteres de sulfonato en azida con una señal única de carbonos de metileno de PEO terminal a δ = 50,8 ppm correspondientes a la señal de -CH₂N₃.

La cicloadición 1,3-dipolar optimizada de la azida 704-N₃ y propargil-β-D-manosapiranósido se llevó a cabo usando sulfato de cobre / ascorbato sódico en *t*-BuOH / H₂O (1:1, v/v) a 55°C durante 2 días para dar el copolímero de bloques 704 triazol-manosa que contiene hasta 85% de residuos de manosa en los extremos distales de 704-M. La formación regioespecífica del anillo de 1,4-triazol se verificó mediante ¹H y ¹³C NMR y la incorporación de manosa se calculó usando la integración comparativa de la señal de CH₃ del PPO y las señales del triazol o el piranósido. La cuantificación de la incorporación de manosa en 704, usando la segunda síntesis química mediante acoplamiento directo para formar la 1-O-polímero-α-D-manosa conducía a 80% de residuos de manosa en los extremos distales de 704-O-M. La síntesis descrita de 704 manosilado bien mediante química "clic" o bien mediante conexión directa con O también se aplicó a la manosilación del copolímero de bloques tetrafuncional 904.

El análisis mediante Maldi-Tof del reparto molecular de 704 y 904 manosilados o no no mostraba diferencias (datos no mostrados).

Ejemplo 2

704 y 904 manosilados mediante las dos estrategias químicas diferentes conducían a respuestas inmunitarias a la vacunación subunitaria s.c.

Se investigó la influencia del modo de acoplamiento de la manosa a los polímeros tetrafuncionales 704 y 904 sobre la eficacia de vacunación. A este fin, los ratones fueron inyectados subcutáneamente el día 0 y el día 21 con β-galactosidasa recombinante formulada con 704 y 904 manosilado bien mediante química "clic" (704-M y 904-M) o bien mediante conexión directa con O (704-O-M y 904-O-M). Los resultados (Fig. 2) muestran que el día 42 las respuestas tanto celular como humoral a β-galactosidasa eran las mismas independientemente del modo de acoplamiento de la manosa a los dos polímeros tetrafuncionales probados.

Ejemplo 3

Optimización de los parámetros de formulación con 704-M para respuestas humoral y celular altas

Los ratones fueron inyectados subcutáneamente el día 0 y el día 21 con β-galactosidasa recombinante formulada con una cantidad variable de 704-M. Los ratones fueron sacrificados el día 42 después de la primera inyección de β-galactosidasa para comparar los niveles de título de anti-β-galactosidasa en los diferentes grupos. Se observaba una mejora significativa de la respuesta humoral y alcanzaba un máximo para la formulación que contenía 0,25% de 704-M (Fig. 3a).

Posteriormente, se investigó el efecto de un vector dirigido en comparación con el vector original. A este fin, los ratones fueron inyectados subcutáneamente el día 0 y el día 21 con 25 µg de β-galactosidasa formulada con 704-M y 704 original. Cada vector se usó a la concentración de 0,25% que daba una mejora máxima de título de anticuerpo anti-β-galactosidasa. Se observó una mejora significativa del título de anti-β-galactosidasa el día 42 con 704-M en comparación con el vector 704 original (Fig. 3b). Lo más importante, la respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I también mostraba un incremento en el grupo de ratones inyectados con 704-M (Fig. 3c).

Los experimentos de respuesta a la dosis usando β-galactosidasa formulada con 0,25% de 704-M mostraban que se obtenía una respuesta humoral máxima con 10 µg de β-galactosidasa (Fig. 3d). También se investigó la influencia de la cepa de ratón sobre la eficacia de vacunación con 704 y 704-M. La Figura 3e muestra que también se

observaba un incremento en el título de anticuerpo anti- β -galactosidasa en ratones Bal/c con 704-M en comparación con el obtenido con 704 original.

Ejemplo 4

El medio de formulación no afecta a la eficacia de vacunación de 704 manossilado

- 5 A continuación, se probó la eficacia de 704 y 704-M en diferente medio de formulación. Los ratones fueron inyectados subcutáneamente el día 0 y el día 21 con β -galactosidasa formulada con 704 y 704-M bien en solución salina o bien en un medio de Tyrode. Los resultados muestran que la composición del medio usado para la formulación no modificaba el título de anticuerpo anti- β -galactosidasa en el grupo de ratones inmunizados bien con 704 o bien con 704-M (Fig. 4). Los resultados también confirman el incremento drástico de la respuesta humoral
10 obtenida el día 42 cuando 704 se modificaba químicamente con un resto dirigible de manosa.

Ejemplo 5

704-M provocan la vacunación recombinante en animales grandes

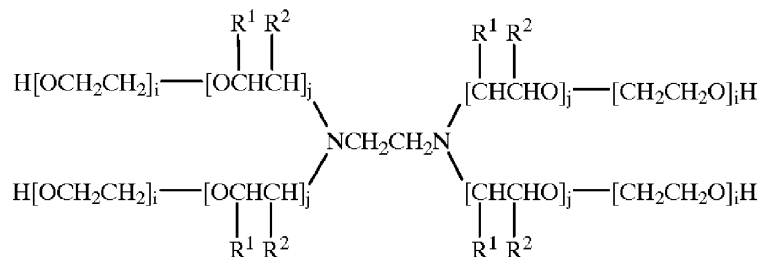
- 15 Para ampliar el hallazgo de los presentes inventores a animales grandes, perros recibieron una sola inyección s.c. el día 0 con 150 μ g de β -galactosidasa formulada con 704-M. Los resultados muestran que la respuesta humoral era detectable 10 días después de una sola inyección y se incrementaba continuamente a lo largo del tiempo (Fig. 5).

BIBLIOGRAFÍA

- Broderson, J.R., *Lab Anim Sci*, **1989**, 39, 400-5
- Gupta, R.K, *Adv Drug Deliv Rev*, **1998**, 32, 155-172.
- Ott, G., G.L. Barchfeld, y G. Van Nest, *Vaccine*, **1995**, 13, 1557-62.
- 5 Cataldo, D.M. y G. Van Nest, *Vaccine*, **1997**, 15, 1710-5.
- Gustafson, G.L. y M.J. Rhodes, *Res Immunol*, **1992**, 143, 483-8; análisis 573-4.
- Mereyala, H. B.; Gurralla, S. R. *Carbohydrate Research* **1998**, 307, 351-354.
- Muthana, S.; Yu, H.; Huang, S.; Chen, X. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 11918-11919.
- 10 Bonger, K. M.; van den Berg, R. J. B. H.; Heitman, L. H.; IJzerman, A. P.; Oosterom, J.; Timmers, C. M.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15, 4841-4856.
- Gonçalves, M.; Estieu-Gionnet, K.; Berthelot, T.; Lain, G.; Bayle, M.; Canron, X.; Betz, N.; Bikfalvi, A.; Déléris, G. *Pharmaceutical Research* **2005**, 22, 1411-1421.
- Li, J.; Kao, W. J. *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1055-1067.
- Iyer, S. S.; Anderson, A. S.; Reed, S.; Swanson, B.; Schmidt, J. G. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 4285-4288.

REIVINDICACIONES

1. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado, para el uso como adyuvante inmunitario, siendo dicho copolímero de bloques de fórmula (II):



5 en la que

- i tiene valores de aproximadamente 10 a aproximadamente 60,
- j tiene valores de igual a o más de 13 y hasta aproximadamente 20,
- para cada par R^1, R^2 , uno será hidrógeno y el otro será un grupo metilo;

10 en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa.

2. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según la reivindicación 1, para el uso como adyuvante inmunitario para inducir una respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I.

15 3. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según la reivindicación 1 o 2, para el uso como adyuvante inmunitario para inducir una respuesta inmunitaria humoral.

20 4. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el uso como adyuvante inmunitario para estimular una inmunidad mucosa.

5. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el uso como adyuvante inmunitario en una composición de vacuna subunitaria.

25 6. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el uso como adyuvante inmunitario, en donde dicho copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional comprende bloques hidrófilos e hidrófobos en una relación bloque hidrófilo/bloque hidrófobo que varía de 0,7 a 1,5.

30 7. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso como adyuvante inmunitario, en donde dicho copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional comprende al menos un bloque hidrófilo terminal.

35 8. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso como adyuvante inmunitario, en el que al menos un resto glicosilo está conjugado a dicho copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional por medio de un espaciador que conecta covalentemente un grupo funcional del resto de manosa y un grupo funcional del copolímero de bloques.

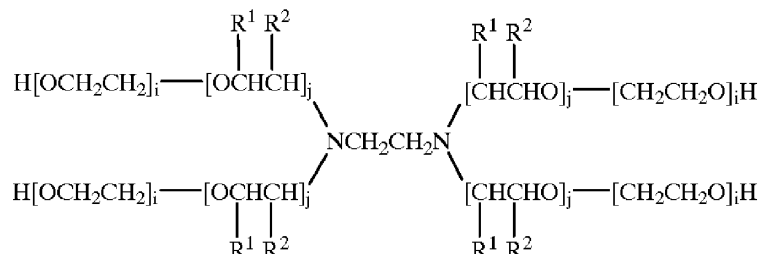
40 9. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el uso como adyuvante inmunitario, en donde dicho copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional comprende al menos un bloque hidrófilo terminal conjugado con el resto de manosa.

45 10. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 to 9, para el uso como adyuvante inmunitario, en el que al menos 25%, en particular al menos 50%, en particular al menos 75% y más particularmente al menos 100% de los bloques hidrófilos terminales de dicho copolímero de bloques anfífilico no iónico están conjugados con el resto de manosa.

50 11. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para el uso como adyuvante inmunitario, en donde dicho copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional es un copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional 704 o un copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional 904.

12. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para el uso como adyuvante inmunitario, en el que dicho resto de manosa comprende de 1 a 5 unidades de manosa y preferiblemente contiene una unidad de manosa.

5 13. Adyuvante inmunitario para conferir una respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I protectora contra un antígeno, que comprende al menos un copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado, siendo dicho copolímero de bloques de fórmula (II):

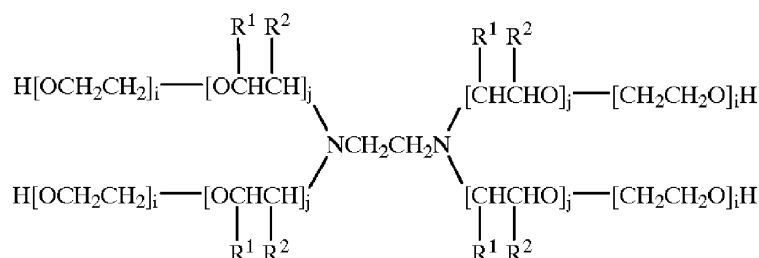


10 en la que

- i tiene valores de aproximadamente 10 a aproximadamente 60,
- j tiene valores de igual a o más de 13 y hasta aproximadamente 20,
- para cada par R^1 , R^2 , uno será hidrógeno y el otro será un grupo metilo;

15 en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa.

20 14. Composición de vacuna que comprende al menos un antígeno y, como adyuvante inmunitario, al menos un copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado, siendo dicho copolímero de bloques de fórmula (II):



en la que

- 25
- i tiene valores de aproximadamente 10 a aproximadamente 60,
 - j tiene valores de igual a o más de 13 y hasta aproximadamente 20,
 - para cada par R^1 , R^2 , uno será hidrógeno y el otro será un grupo metilo;

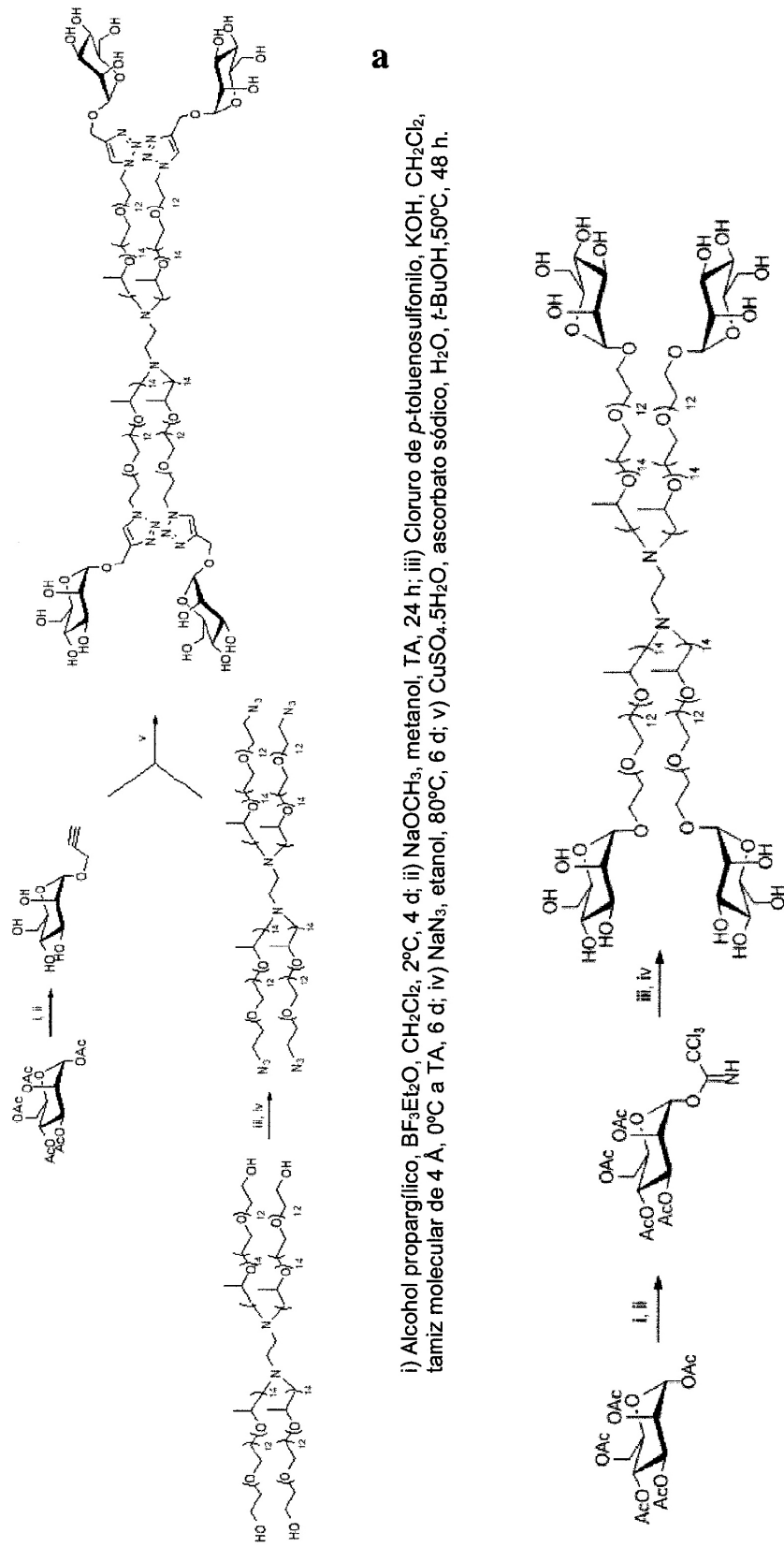
30 en donde dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa.

35 15. Copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado, para el uso como adyuvante inmunitario, siendo dicho copolímero de bloques un copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional 304; en el que dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa.

16. Adyuvante inmunitario para conferir una respuesta inmunitaria celular restringida a la clase I protectora contra un antígeno, que comprende al menos un copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional glicosilado, siendo dicho copolímero de bloques un copolímero de bloques anfífilico no iónico tetrafuncional 304; en el que dicho resto

glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa.

- 5 17. Composición de vacuna que comprende al menos un antígeno y, como adyuvante inmunitario, al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional glicosilado, siendo dicho copolímero de bloques un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 304; en el que dicho resto glicosilo es un resto de manosa; comprendiendo preferiblemente dicho resto de manosa de 1 a 5 unidades de manosa, y más preferiblemente una unidad de manosa.



i) Alcohol propargílico, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 2°C , 4 d; ii) NaOCH_3 , metanol, TA, 24 h; iii) Cloruro de *p*-toluenosulfonilo, KOH , CH_2Cl_2 , tamiz molecular de 4 Å, 0°C a TA, 6 d; iv) NaNO_2 , etanol, 80°C , 6 d; v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato sódico, H_2O , *t*-BuOH, 50°C , 48 h.

i) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$, DMF, tamiz molecular 4 Å, 4 h, TA; ii) Cl_3CCN , DBU, CH_2Cl_2 , tamiz molecular 4 Å, 12 h, TA; iii) 704, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , tamiz molecular 4 Å; iv) CH_3ONa , MeOH, 2 h, TA.

FIGURA 1

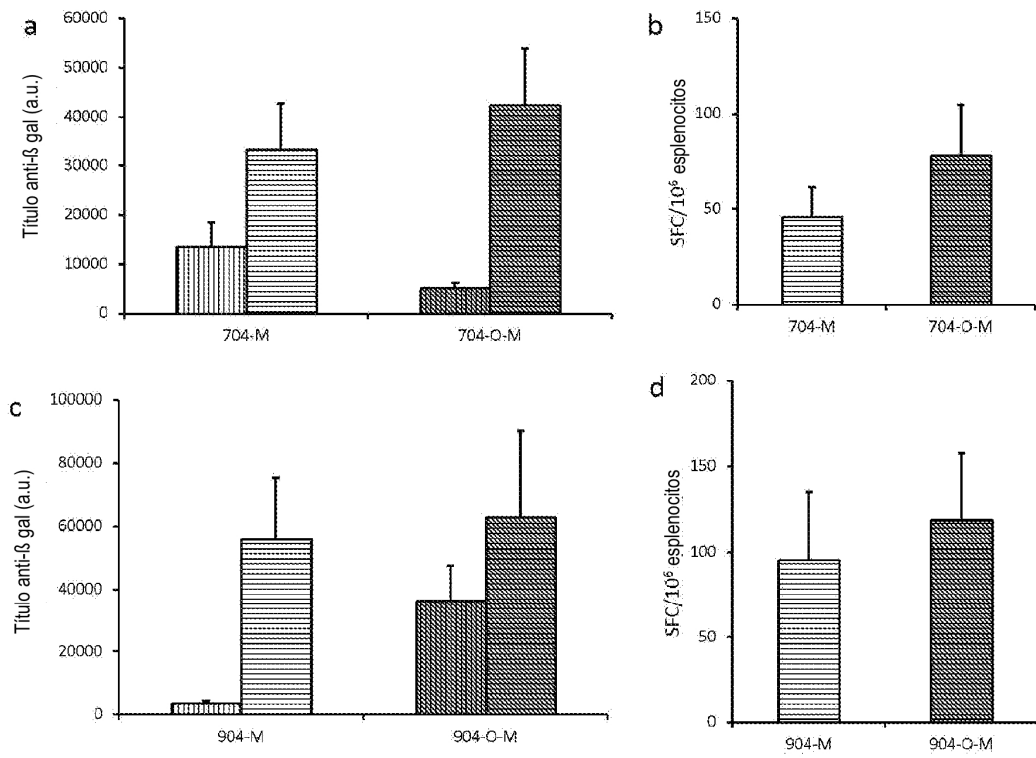


FIGURA 2

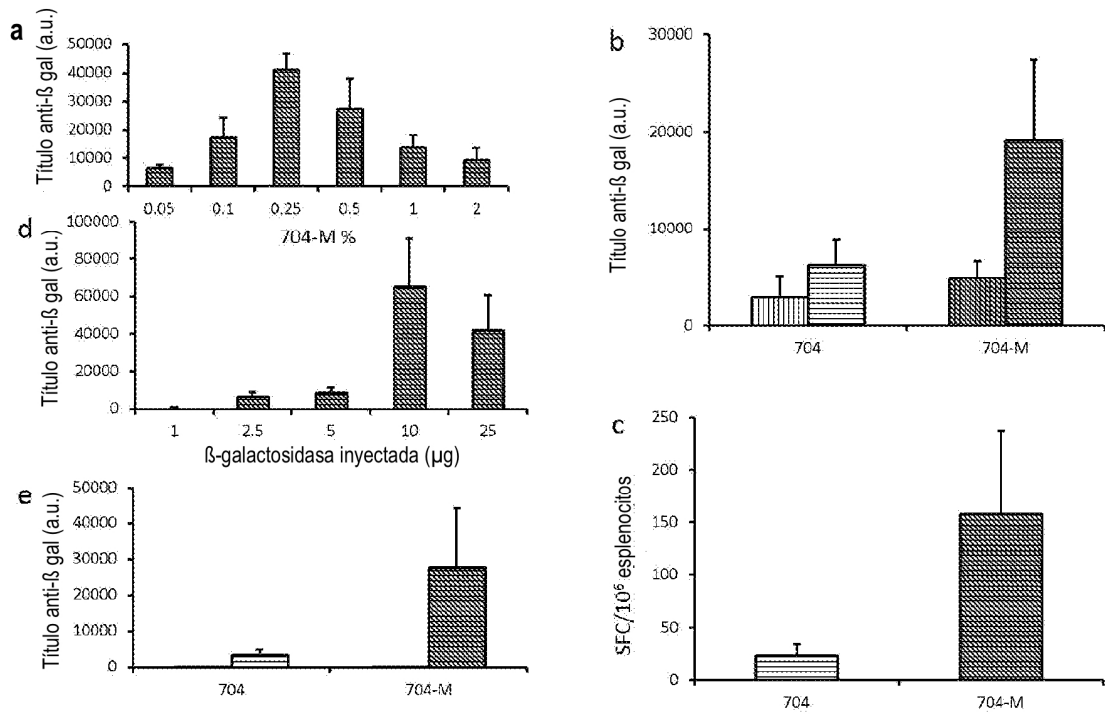


FIGURA 3

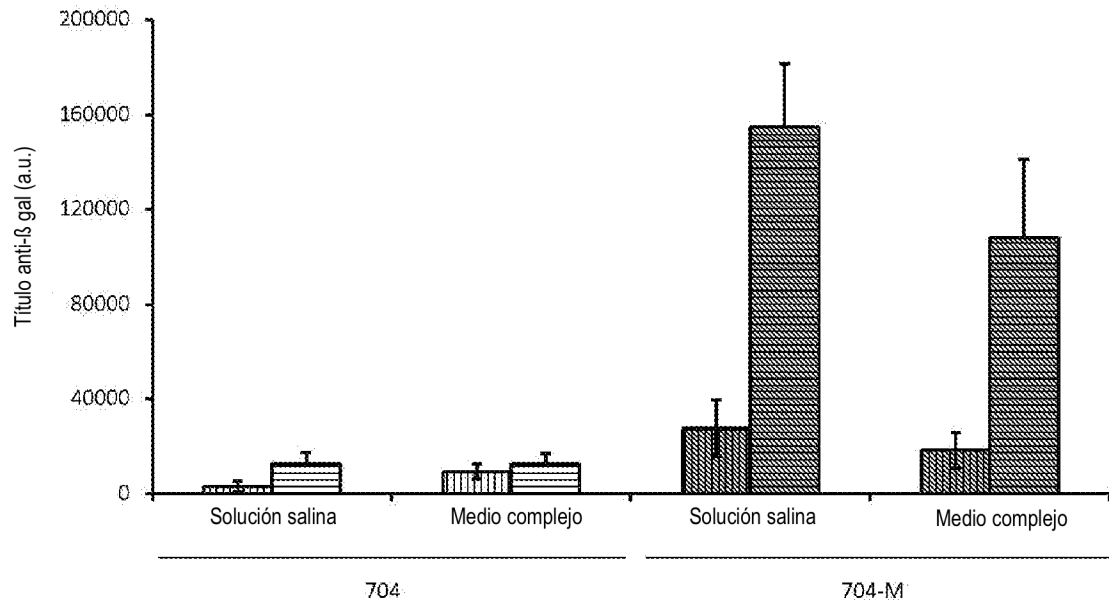


FIGURA 4

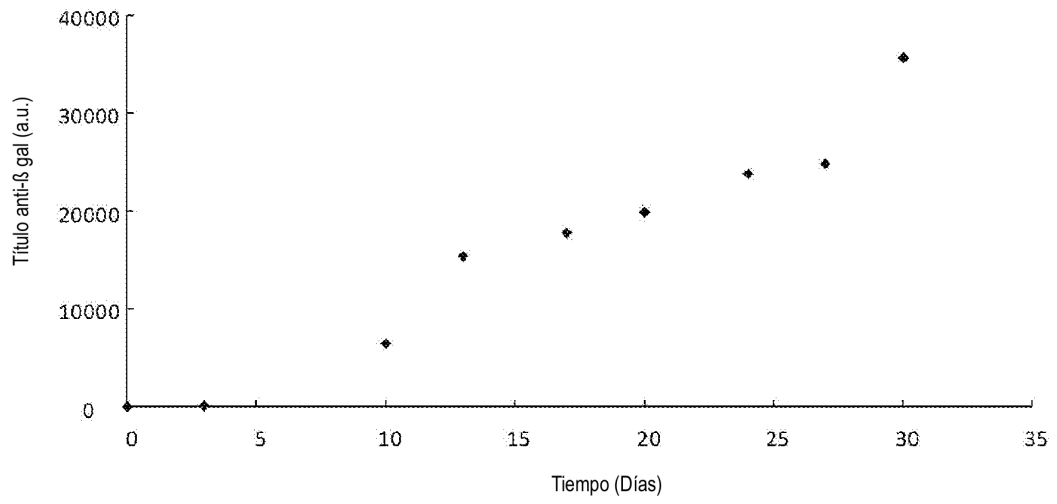


FIGURA 5