

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 649**

51 Int. Cl.:

C07H 15/18 (2006.01)
A61K 31/7032 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2014 PCT/US2014/015286**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14124245**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2014 E 14706210 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2953957**

54 Título: **Glicolípidos modificados y procedimientos de preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

08.02.2013 US 201361762591 P
14.03.2013 US 201313803972
02.07.2013 US 201361842149 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2019

73 Titular/es:

VACCINEX, INC. (50.0%)
1895 Mt. Hope Avenue
Rochester, NY 14620, US y
ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE, INC.
(50.0%)

72 Inventor/es:

PORCELLI, STEVEN A. y
ZAUDERER, MAURICE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 730 649 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

Glicolípidos modificados y procedimientos de preparación y uso de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere en general al campo de la inmunología. En particular, la invención implica la modificación de glicolípidos que son útiles para modular una respuesta inmunitaria.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células T citotóxicas naturales (NKT) representan un subconjunto de linfocitos T que expresan el receptor de células T y el receptor de células NK, y desempeñan un papel en la unión de la inmunidad innata a la inmunidad adaptativa. Kronenberg M y Gapin L, *Nat Rev Immunol* 2: 557-568 (2002). Tras la activación, las células NKT
 15 pueden tener un impacto pronunciado en la inmunidad temprana y tardía de diversos patógenos, incluyendo *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis* y *Leishmania major*. Kronenberg (2002); Behar SM y Porcelli SA, *Curr Top Microbiol Immunol* 314: 215-250 (2007); Emoto M y col., *Eur J Immunol* 29: 650-659 (1999); Ishikawa H y col., *Int Immunol* 12: 1267-1274 (2000); y Ranson T y col., *J Immunol* 175: 1137-1144 (2005). Se ha informado que la activación de células NKT conduce a respuestas mejoradas de células T CD4 y CD8, y que induce la maduración de células
 20 dendríticas (DC). Nishimura T y col., *Int Immunol* 12: 987-994 (2000); y Silk JD y col., *J Clin Invest* 114: 1800-1811 (2004).

A diferencia de las células T convencionales que reconocen los péptidos unidos a MHC, las células NKT son específicas para los antígenos lipídicos presentados por la proteína CD1d tipo MHC de clase I. Hasta la fecha, se
 25 han identificado varios antígenos glicolípidos, incluidos los glicolípidos derivados de bacterias y derivados de sí mismos, que CD1d puede presentar para activar las células NKT. Tsuji M *Cell Mol Life Sci* 63: 1889-1898 (2006). Las células NKT que tienen receptores de células T con reordenamientos invariantes de V α 14-J α 18 (células iNKT) poseen reactividad a un glicosfingolípido, α -galactosilceramida (α GalCer), cuando se presentan por CD1d. Kronenberg M y Gapin L, *Nat Rev Immunol* 2: 557-568 (2002); Kronenberg M, *Annu Rev Immunol* 23: 877-900
 30 (2005). Estudios recientes han demostrado que las vacunas contra Plasmodia, *Leishmania donovani*, *Listeria monocytogenes* y el VIH podrían mejorarse activando las células iNKT mediante la administración conjunta de α GalCer como un adyuvante. Gonzalez-Aseguinolaza G y col., *J Exp Med* 195: 617-624 (2002); Dondji B y col., *European Journal of Immunology* 38: 706-719 (2008); Huang YX y col., *Vaccine* 26: 1807-1816 (2008); y Enomoto N y col., *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 350-362 (2007).

35 Como agente terapéutico, se ha demostrado que α GalCer reduce la carga de parásitos de la malaria en ratones y prolonga la supervivencia de ratones infectados con *M. tuberculosis*. Gonzalez-Aseguinolaza G y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 97: 8461-8466 (2000); Chackerian A y col., *Infection and Immunity* 70: 6302-6309 (2002). Una sola inyección de α GalCer en ratones induce la secreción de IFN γ , IL-12 e IL-4 en suero. Fujii S y col., *Immunol Rev* 220: 183-198 (2007). La estimulación de células iNKT restringidas a CD1d por α GalCer también conduce a una rápida cascada de activación de células inmunitarias e inflamatorias que incluyen células NK, células dendríticas, células B y células T convencionales. Nishimura T y col., *Int Immunol* 12: 987-994 (2000); Kitamura H y col., *J Exp Med* 189: 1121-1128 (1999); Fujii S y col., *J Exp Med* 198: 267-279 (2003). Las células iNKT producen grandes cantidades de IL-4 e IFN γ y la producción requiere un contacto directo entre las células iNKT y las DC a través de las interacciones
 45 del ligando CD40-CD40. Nishimura T y col., *Int Immunol* 12: 987-994 (2000). Se ha demostrado que el IFN γ producido por las células iNKT tiene un papel crítico en el efecto antimetastático de α GalCer en modelos de tumores murinos. Hayakawa Y y col., *Eur J Immunol* 31: 1720-1727 (2001); Smyth MJ y col., *Blood* 99: 1259-1266 (2002). Así, la activación de las células iNKT puede desempeñar un papel en la modulación de las respuestas inmunitarias adaptativas al influir en el entorno temprano de las citoquinas, mejorando de este modo la resistencia del huésped a
 50 las enfermedades infecciosas e inflamatorias.

Las proteínas CD1d solubles cargadas con glicolípidos, tales como las α -galactosilceramidas, se están desarrollando como agentes inmunoterapéuticos. Sin embargo, su utilidad está limitada por la inestabilidad de la interacción no covalente entre el glicolípido y la proteína, lo que les permite disociarse rápidamente o ser
 55 desplazados por inhibidores competitivos naturales y perder actividad *in vivo*. Webb TJ y col. *Cancer Res* 72: 3744-3752 (2012). Sigue habiendo una necesidad de desarrollar un procedimiento para unir covalentemente el glicolípido a la proteína CD1d para crear complejos estables y de larga duración que mantengan potentes propiedades activadoras de las células NKT.

60 El documento US 2006/052316 describe α -galactosilceramidas que modulan las células NKT. Schiefher y col.

describe la evaluación estructural de potentes agonistas de células NKT.

RESUMEN DE LA INVENCION

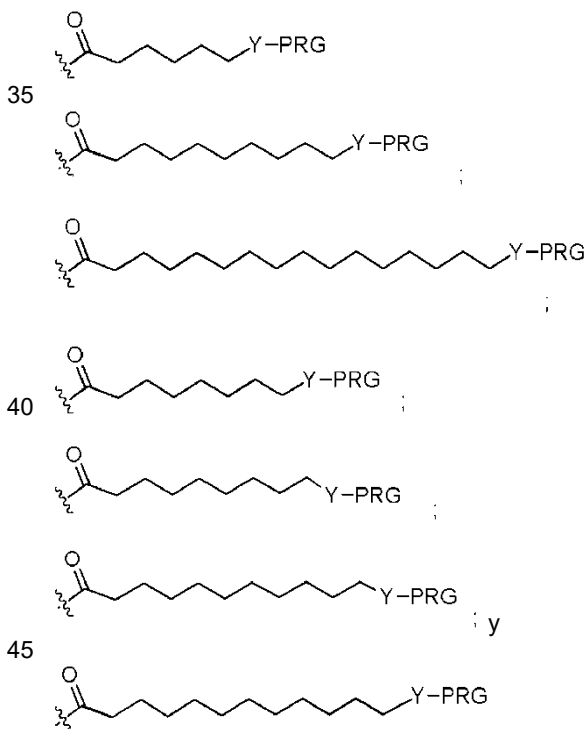
5 La presente invención se refiere a glicolípidos modificados que comprenden un grupo funcional que permite un enlace covalente estable a una proteína, tal como CD1d, complejos, células y vacunas que comprenden los mismos y procedimientos de producción y uso de los mismos. Los complejos de glicolípidos/proteínas modificados de la invención comprenden un glicolípido modificado asociado físicamente con una proteína (CD1d). Los glicolípidos modificados de la invención comprenden un grupo benzofenona. Así, los complejos de glicolípidos/proteínas modificados comprenden el glicolípido unido covalentemente a una proteína (CD1d) a través de un enlace benzofenona. Los glicolípidos modificados encuentran su uso en servir como un medio para unir covalentemente los glicolípidos a otras moléculas, tales como las proteínas. Los complejos de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados encuentran su uso en procedimientos para mejorar o provocar una respuesta inmunitaria, procedimientos para mejorar la actividad de las células T citotóxicas naturales, y procedimientos para tratar o impedir una enfermedad.

Específicamente, la presente invención proporciona:

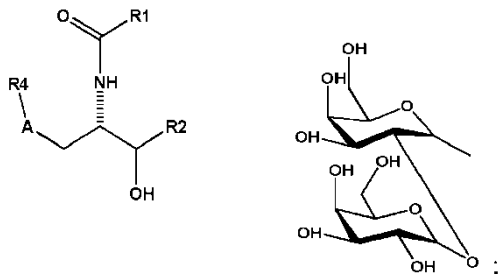
(1) Un glicolípido de tipo ceramida que comprende un grupo fotorreactivo, donde:
 20 ◦ dicho grupo fotorreactivo es un grupo benzofenona unido covalentemente al resto lipófilo N-acilo de dicho glicolípido de tipo ceramida; y
 ◦ dicho glicolípido de tipo ceramida es una α -galactosilceramida;
 donde dicho glicolípido de tipo ceramida es capaz de unirse covalentemente a CD1d y mejorar la actividad de las células citotóxicas naturales (NKT).

(2) El glicolípido de tipo ceramida de (1), donde dicho resto lipófilo N-acilo es una cadena de acilo lineal, y donde dicha cadena de acilo lineal tiene opcionalmente al menos 11 átomos, opcionalmente entre 11 y 14 átomos, donde la numeración de los átomos excluye los hidrógenos.

(3) El glicolípido de tipo ceramida de (2), donde dicha cadena de acilo se selecciona de entre el grupo que consiste en:



donde Y es -O-, -CH₂-, -S-, -OCH₂-, -SCH₂-, -CH₂CH₂-; o un enlace, y PRG es dicho grupo fotorreactivo.

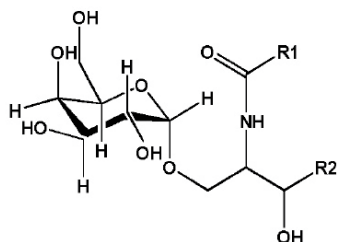


5

(4) El glicolípido de tipo ceramida de (1), donde dicha α-galactosilceramida se selecciona de entre el grupo que consiste en:

a) Fórmula II:

10



(Fórmula II)

donde

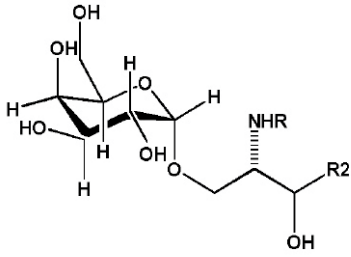
- 15 R1 es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; R1 es -C(OH)-R3; o donde R1 se selecciona de entre el grupo que consiste en: (CH₂)₉CH=CH-CH₂-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₈CH=CH-CH₂-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₇CH=CH-CH₂-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₃CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₃CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂CH₃, (CH₂)₇CH=CH-CH₂-CH=CH=(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₇CH=CH-CH=CH(CH₂)₅CH₃, (CH₂)₈CH=CH-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₉CH=CH-CH=CH(CH₂)₅CH₃, (CH₂)₆CH=CH-CH=CH-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH=CH-CH=CH-CH=CH(CH₂)₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH-CH=CH-CH=CH(CH₂)₃CH₃;
- 20 donde R3 es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; y R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- 25 (a) -CH₂(CH₂)_xCH₃,
 (b) -CH(OH)(CH₂)_xCH₃,
 (c) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)₂,
 (d) -CH=CH(CH₂)_xCH₃,
 (e) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)CH₂CH₃,

30

donde X es un número entero que varía de 4-17,
 donde R2 es opcionalmente -CH(OH)(CH₂)_xCH₃, donde X es un número entero que varía de 4-13,
 donde R2 es opcionalmente -CH(OH)-(CH₂)₁₃CH₃;

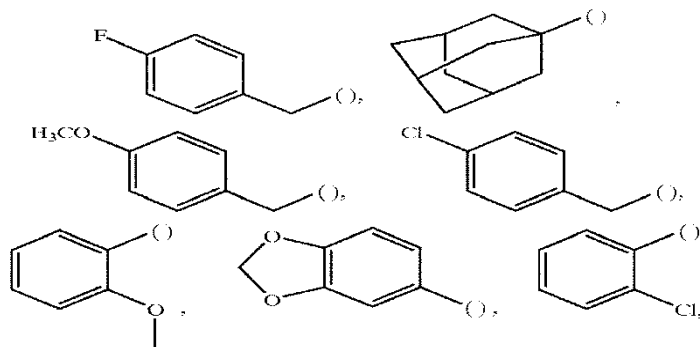
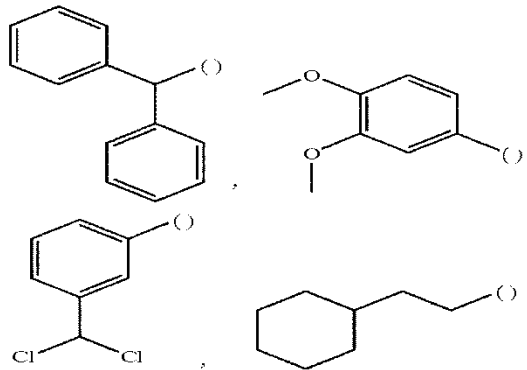
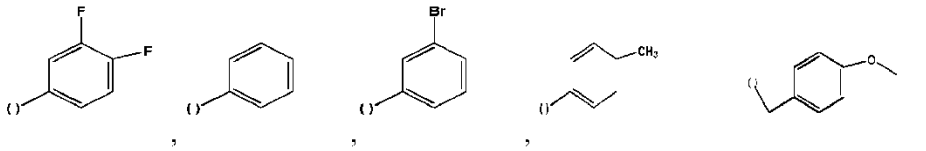
35 b) Fórmula III:



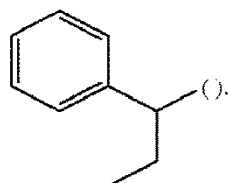
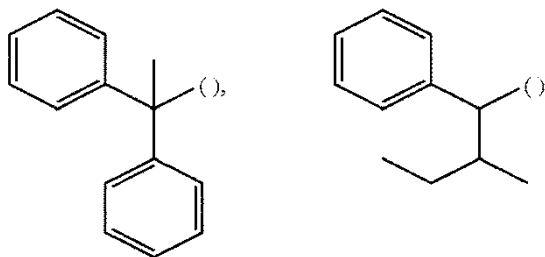
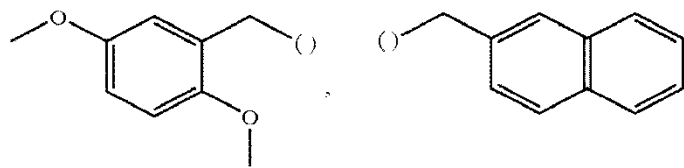
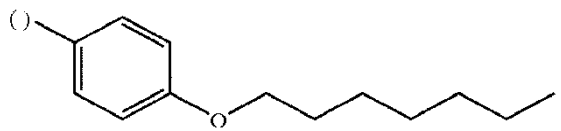
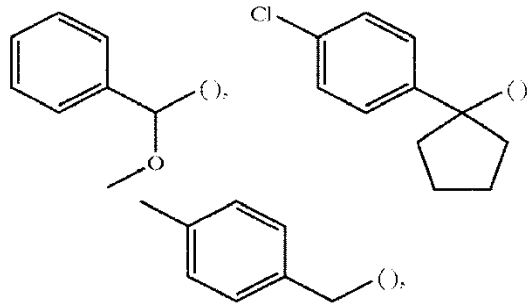
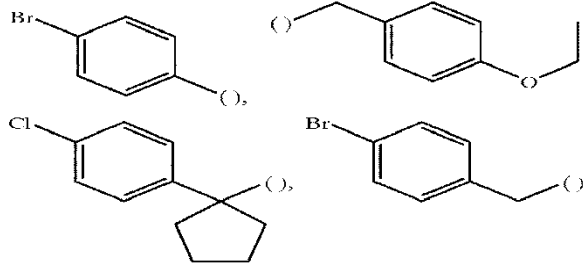
(Fórmula III)

donde R es -C(O)R1, donde R1 es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; o R1 es -C(OH)-R3 donde R3 es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; o R1 es un alcano o alqueno C₆-C₂₇ donde (i) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ está sustituido con un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático o (ii) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo C₆-C₂₇, un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático; o R1 es un anillo aromático opcionalmente sustituido, o un aralquilo, o R1 se selecciona de entre el grupo que consiste en:

10



15



5

10

y

donde () representa el punto de unión de R1 al compuesto de Fórmula III; y
 15 R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- (a) $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
- (b) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
- (c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,

- (d) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
 (e) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$,

donde X es un número entero que varía de 4-17,

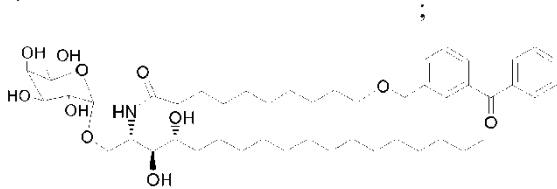
- 5 donde opcionalmente R1 está sustituido con oxo; hidroxilo; halógeno; fenilo; $-\text{OC}(\text{O})\text{R}_6$; $-\text{OR}_6$; $-\text{C}(\text{O})\text{R}_6$; o $\text{N}(\text{R}_6)_2$, donde cada R6 es independientemente un alquilo sustituido con C₁-C₆, o un anillo aromático sustituido opcionalmente sustituido con halógeno; hidroxilo; $-\text{OC}(\text{O})\text{R}_7$; $-\text{OR}_7$; $-\text{C}(\text{O})\text{R}_7$ o $\text{N}(\text{R}_7)_2$, y donde cada R7 es un alquilo C₁-C₆ sustituido; y

- 10 c) (2S, 3S, 4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol (KRN7000), (2S,3S)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3-octadecanodiol), o (2S, 3S, 4R)-1-CH₂-(α -galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol (α -C-GalCer).

- (5) El glicolípido de tipo ceramida de (1), donde dicho glicolípido de tipo ceramida tiene la estructura seleccionada de 15 entre el grupo que consiste en:

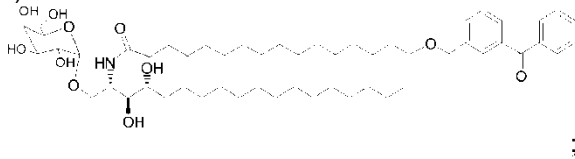
a)

b)

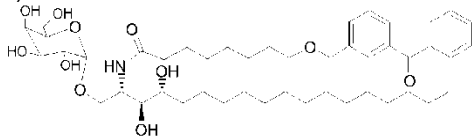


20

c)

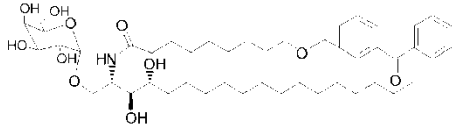


d)

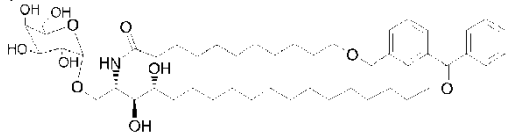


25

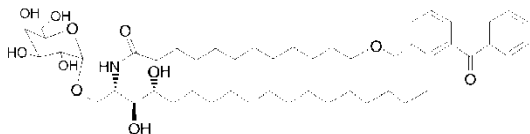
e)



f)



30 g)



(6) Un complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida que comprende una proteína CD1d y el glicolípido de tipo ceramida de uno cualquiera de (1)-(6), donde dicho glicolípido de tipo ceramida está unido covalentemente a dicha proteína mediante la fotoactivación del grupo benzofenona.

(7) El complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de (6), donde dicha CD1d:

a) tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

10

- i) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a los aminoácidos 21 a 295 de la SEQ ID NO:1;
- ii) la secuencia de aminoácidos expuesta como los aminoácidos 21 a 295 de la SEQ ID NO:1;
- iii) una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 21 a 295 de la SEQ ID NO:1, a excepción de al menos una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas;
- 15 iv) la secuencia de aminoácidos expuesta como los aminoácidos 1 a 295 de la SEQ ID NO:1;
- v) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a los aminoácidos 1 a 295 de la SEQ ID NO:1;
- vi) una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 21 a 295 de la SEQ ID NO:1, a excepción de al menos una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas;
- vii) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1;
- 20 viii) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO:1; y
- ix) una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:1, a excepción de al menos una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas; o

b) está físicamente asociada con una β 2-microglobulina,

25

donde dicha β 2-microglobulina tiene opcionalmente una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- i) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a los aminoácidos 21 a 113 de la SEQ ID NO:2;
- 30 ii) la secuencia de aminoácidos expuesta como los aminoácidos 21 a 113 de la SEQ ID NO:2;
- iii) una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 21 a 113 de la SEQ ID NO:2, a excepción de al menos una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas;
- iv) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2;
- v) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO:2; y
- 35 vi) una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:2, a excepción de al menos una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas.

(8) El complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de (6) o (7), donde dicho complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida:

40

a) comprende además un anticuerpo o fragmento del mismo específico para un antígeno diana, y donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está unido a dicha CD1d,

donde dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona opcionalmente de entre el grupo que consiste en un

45

fragmento F(ab), un fragmento F(ab')₂ y un anticuerpo de cadena única, donde dicho marcador de superficie celular se selecciona opcionalmente de entre el grupo que consiste en CEA, Her2/neu, EGFR tipo I o tipo II, CD19, CD20, CD22, Muc-1, PSMA o STEAP, donde dicha CD1d está unida opcionalmente a la cadena pesada o cadena ligera de dicho anticuerpo o fragmento

50

de cadena pesada o fragmento de cadena ligera de dicho fragmento de anticuerpo de unión a antígeno; o

b) comprende además un antígeno,

donde dicho antígeno es opcionalmente un polipéptido inmunogénico de un virus o una célula seleccionada de entre

55

el grupo que consiste en un virus, bacteria, hongo y célula tumoral.

(9) Una composición que comprende el complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de una cualquiera de (6)-(8), y un vehículo farmacéutico,

5 donde dicho vehículo farmacéutico se selecciona opcionalmente de entre el grupo que consiste en solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, y combinaciones de los mismos.

(10) El complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de una cualquiera de (6)-(8) o la composición de (9), para su uso en un procedimiento para tratar o impedir una enfermedad en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento
10 administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, el complejo o composición de glicolípido/proteína de tipo ceramida, donde dicho complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida se administra en una cantidad suficiente para alterar la progresión de dicha enfermedad

15 donde opcionalmente se mejora o modifica una respuesta inmunitaria en relación con una respuesta inmunitaria producida por la proteína que no está unida covalentemente al glicolípido, donde dicha enfermedad se selecciona opcionalmente de entre el grupo que consiste en una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana, una enfermedad fúngica, una enfermedad parasitaria, una enfermedad proliferativa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, tuberculosis, enfermedad pulmonar que se parece a la tuberculosis, linfadenitis, enfermedad de la piel, enfermedad diseminada, peste bubónica, peste neumónica,
20 tularemia, enfermedad de Legionaire, ántrax, fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea, enfermedad transmitida por los alimentos, listeriosis, malaria, VIH, SIV, VPH, VSR, influenza, hepatitis (VHA, VHB y VHC), esclerosis múltiple, diabetes, síndrome de Sjogren y cáncer;
donde dicho sujeto es opcionalmente un mamífero, y donde dicho mamífero es opcionalmente un ser humano.

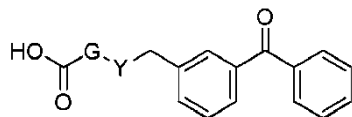
25 (11) El complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de una cualquiera de (6)-(8) o la composición de (9), para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho sujeto el complejo o composición de glicolípido/proteína de tipo ceramida

30 donde dicho complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida comprende opcionalmente dicho antígeno, donde dicho antígeno está unido opcionalmente covalentemente a dicha proteína, donde dicho complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida se administra opcionalmente en una cantidad suficiente para mejorar la actividad de las células T citotóxicas naturales (NKT) en dicho sujeto, donde dicha respuesta inmunitaria comprende opcionalmente una respuesta de anticuerpo,
donde dicho sujeto es opcionalmente un mamífero, y donde dicho mamífero es opcionalmente un ser humano.

35 (12) Un antígeno heterólogo y el complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de una cualquiera de (6)-(8) o la composición de (9), para su uso en un procedimiento para mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto al antígeno heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho sujeto el antígeno heterólogo y el complejo o composición de glicolípido/proteína de tipo ceramida simultáneamente, antes o después de la
40 administración de dicho antígeno heterólogo

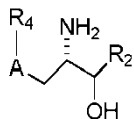
donde dicho sujeto es opcionalmente un mamífero, y donde dicho mamífero es opcionalmente un ser humano.

45 (13) Un procedimiento de síntesis de un glicolípido de tipo ceramida de Fórmula (VI) que comprende un grupo benzofenona, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
activar un derivado de ácido carboxílico de Fórmula (IV) para formar un derivado de acilo activado



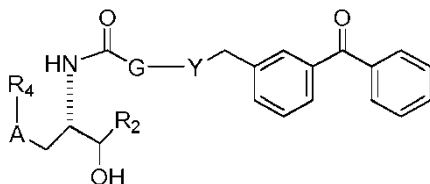
(IV)

50 ; y
acoplar el derivado de acilo activado con un glicolípido de tipo ceramida de Fórmula (V), donde dicho glicolípido de tipo ceramida es capaz de unirse covalentemente a CD1d y mejorar la actividad de las células T citotóxicas naturales (NKT)



(V),

formando de este modo el glicolípido de tipo ceramida que comprende un grupo benzofenona de Fórmula (VI)



5 (VI); donde

G es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; o G es -C(OH)-R₃ donde R₃ es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; o R₁ es un alcano o alqueno C₆-C₂₇ donde (i) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ está sustituido con un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático o (ii) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo C₆-C₂₇, un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático; o R₁ es un anillo aromático opcionalmente sustituido, o un aralquilo;

R₄ es un α-galactosilo;

A es -O-, -CH₂-; o es un enlace simple,

Y es -O-, -CH₂- o -S-, y

15 R₂ es una cadena alquilo, alquenilo o alquinilo C₃-C₄₀ sustituida o no sustituida, donde R₂ de Fórmula (VI) es opcionalmente uno de los siguientes (a)-(e):

(a) -CH₂(CH₂)_xCH₃,

(b) -CH(OH)(CH₂)_xCH₃,

20 (c) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)₂,

(d) -CH=CH(CH₂)_xCH₃,

(e) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)CH₂CH₃, donde x es un número entero que varía de 0-40, o

donde R₂ de Fórmula (VI) es opcionalmente:

25 -CH(OH)(CH₂)_xCH₃, donde x es un número entero que varía de 4-17; o
-CH(OH)(CH₂)₁₃CH₃; o

donde opcionalmente G es -(CH₂)_n-, donde n es un número entero que varía de 0-20 e Y es O; o
30 donde:

G es -(CH₂)_n-, donde n es un número entero que varía de 0-20 e Y es O;

R₂ es -CH(OH)(CH₂)_xCH₃, donde x es un número entero que varía de 4-17;

A es O;

35 Y es O; y

donde dicho glicolípido de tipo ceramida es capaz de unirse covalentemente a CD1d y mejorar la actividad de las células T citotóxicas naturales (NKT).

40 (14) Un procedimiento de producción de un complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) poner en contacto el glicolípido de tipo ceramida de una cualquiera de (1)-(5) o un glicolípido de tipo ceramida producido por el procedimiento de (13) con una proteína CD1d; y

45 b) irradiar dicho glicolípido de tipo ceramida y dicha proteína CD1d con luz ultravioleta para producir un complejo de

glicolípido/proteína de tipo ceramida, donde dicho complejo de glicolípido/proteína modificado mejora la actividad de las células T citotóxicas naturales (NKT).

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1: muestra un esquema para la síntesis de derivados de α GalCer-benzofenona.

La figura 2: muestra un esquema para la síntesis del complejo α GalCer-benzofenona/CD1d.

La figura 3: muestra los espectros de fluorescencia de CD1d de ratón con y sin ligandos de glicolípidos como un enfoque para estimar la unión a glicolípidos. Las estructuras de los diversos ligandos glicolípidos se pueden encontrar en la Tabla 1. 7DW8-5 es un análogo de α -GalCer con un resto C10-fluoro-fenil acilo que no contiene grupos fotorreactivos para la formación de enlaces covalentes con CD1d.

La figura 4: muestra el ensayo de estimulación de hibridoma iNKT (que mide la secreción de IL-2) usando células presentadoras de antígenos que expresan CD1d murinas.

15 La figura 5: muestra el ensayo de estimulación de hibridoma iNKT (que mide la secreción de IL-2) usando células HeLa que expresan CD1d humanas.

Las figuras 6A-6B: muestran la detección de la afinidad de unión al ligando de la mCD1d unida a la placa mediante ELISA usando mAb L363 para detectar específicamente complejos de CD1d/ α GalCer murinos. La figura 6A muestra muestras que no habían sido irradiadas con UV y la figura 6B muestra muestras que habían sido irradiadas con UV.

20 ND = no disociado; D = disociado

Las figuras 7A-7B: muestran la detección de la afinidad de unión al ligando de la mCD1d unida a la placa mediante ELISA usando el hibridoma iNKT DN3A4-1.2 para detectar complejos de CD1d/ α GalCer murinos. La figura 7A muestra muestras que no habían sido irradiadas con UV y la figura 7B muestra muestras que habían sido irradiadas con UV.

25 Las figuras 8A-8B: muestran una comparación directa de los complejos DB12-8 y 7DW8-5 con mCD1d mediante ELISA usando mAb L363. La figura 8A muestra muestras que no habían sido irradiadas con UV y la figura 8B muestra muestras que habían sido irradiadas con UV. NDis o NoDis = no disociado; Dis = disociado

Figuras 9A-9D: Las figuras 9A-9B: muestran una comparación directa de los complejos DB12-8 y 7DW8-5 con la proteína de fusión mCD1d.CEA mediante ELISA usando mAb L363. Las figuras 9C-9D muestran el efecto de un aumento a escala de 10 veces en el entrecruzamiento UV y la disociación de DB12-8: mCD1d.CEA. Las figuras 9A y 9C muestran muestras que no habían sido irradiadas con UV y las figuras 9B y 9D muestran muestras que habían sido irradiadas con UV. NDis o NoDis = no disociado; Dis = disociado

35 La figura 10: muestra la cinética y la magnitud de las citoquinas interferón γ (IFN γ) e interleuquina-2 (IL-2) en el suero de ratones 2, 10 y 24 horas después de la inyección con solución salina o con 30 μ g de cualquiera de α GalCer cargado de forma no covalente en sCD1d-anti-CEA o complejos DB12-8:sCD1d-anti-CEA entrecruzados con UV.

La figura 11: muestra la producción de IFN γ intracelular por las células iNKT después de tres inyecciones con solución salina o con 30 μ g de α GalCer cargado de forma no covalente en sCD1d-anti-CEA o complejos DB12-8:sCD1d-anti-CEA entrecruzados con UV al inicio del experimento y nuevamente el día 2 y el día 8. Los ratones se sacrificaron 1 h después de la tercera inyección y las células iNKT del bazo se tiñeron para determinar el IFN γ intracelular con anti-IFN γ -APC después de la fijación y permeabilización con Cytotfix/Cytoperm (BD). Para determinar el porcentaje de células iNKT que producen IFN γ , las células se clasificaron mediante tinción positiva tanto para CD3-FITC como para un tetrámero de CD1d PE cargado con α GalCer y se evaluó la expresión de IFN γ intracelular mediante citometría de flujo en un FACS Calibur.

45 La figura 12: muestra la inhibición del crecimiento *in vivo* de las células tumorales MC38 que expresan el antígeno carcino-embriionario (CEA) por la α -galactosilceramida unida covalentemente a la proteína de fusión sCD1d-anti-CEA. Siete ratones se trataron los días 7, 11, 15 y 20 después del injerto con PBS (solución salina), 3 μ g de α GalCer libre o el equivalente molar de α GalCer unida covalentemente a sCD1d-anti-CEA (sCD1d-antiCEA/ α -GalCer covalente). El crecimiento del tumor se midió cada 2 o 3 días y los ratones fueron sacrificados el día 24. ** p = 0,0079 (ANOVA de dos vías)

50

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones, vacunas y procedimientos, que son útiles para mejorar, es decir, provocar, estimular o aumentar, una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunitaria primaria y/o secundaria. En este documento se describen glicolípidos modificados que comprenden un grupo funcional, tal como benzofenona, que permiten un enlace covalente estable con una proteína, tal como CD1d. Los complejos que comprenden los glicolípidos modificados y una proteína asociada físicamente (por ejemplo, CD1d) y los procedimientos de síntesis y uso de los mismos también se proporcionan en este documento. El glicolípido modificado o complejo de glicolípido/proteína modificado de la invención mejora la respuesta inmunitaria al afectar la actividad de las células T citotóxicas naturales («NKT») restringidas a CD1d. Los glicolípidos modificados y los

complejos de glicolípidos/proteínas modificados como se describen en este documento son útiles para estimular respuestas inmunitarias deseables, por ejemplo, respuestas inmunitarias contra antígenos micobacterianos, tumores, antígenos heterólogos o una molécula de direccionamiento. La respuesta inmunitaria puede ser útil para impedir, tratar, o mejorar las enfermedades causadas por patógenos bacterianos; por ejemplo, micobacterias, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, que causa la TB en seres humanos; otros agentes infecciosos; o tumores. En algunos aspectos de la descripción, al emplear determinadas formas del glicolípidos, como se describe en otra parte, la descripción puede emplearse para redirigir una respuesta inflamatoria o autoinmunitaria de una respuesta predominantemente TH1 a una respuesta TH2. Se pueden encontrar ejemplos, por ejemplo, en la pub. de sol. de patente de EE. UU. n.º 2006/0052316 y 2010/0183549.

El sistema inmunitario natural logra un equilibrio complejo entre las respuestas inmunitarias protectoras y altamente agresivas frente a patógenos extraños y la necesidad de mantener la tolerancia a los tejidos normales. En los últimos años, se ha reconocido cada vez más que las interacciones entre muchos tipos de células diferentes contribuyen a mantener este equilibrio. Dichas interacciones pueden, por ejemplo, dar como resultado respuestas polarizadas con la producción de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, la interferón-gamma) por células T de tipo TH1 o la producción de interleuquina-4 (IL-4) por células T de tipo TH2 que suprimen la actividad de TH1. En varios modelos animales diferentes, se ha demostrado que la polarización de células T a TH1 favorece la inmunidad protectora contra tumores o patógenos infecciosos, mientras que la polarización de células T a TH2 puede ser un factor crítico para impedir el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria mediada por células. Las condiciones que determinan si la estimulación inmunitaria dará como resultado una inmunidad mediada por células agresiva o una regulación negativa de dichas respuestas están altamente localizadas en el sentido de que cada tejido está compuesto por un conjunto distintivo de células presentadoras de antígenos (APC) y linajes de linfocitos que interactúan para favorecer diferentes respuestas inmunitarias. Por ejemplo, en condiciones óptimas, las células dendríticas (DC) localizadas en un tejido normal pueden representar predominantemente un linaje y una etapa de maduración que favorece las interacciones tolerogénicas y sirve como una barrera para la autoinmunidad mediada por células mientras que un tumor o sitio de infección atraerá células dendríticas mieloides maduras que estimulan potentes respuestas inmunitarias mediadas por células.

Las células NKT tienen una capacidad inusual para secretar citoquinas TH1 y TH2, y se han documentado potentes funciones citotóxicas y reguladoras en la inflamación, la autoinmunidad y la inmunidad tumoral (Bendelac y col., Science 268:863 (1995); Chen y Paul, J Immunol 159:2240 (1997) y Exley y col., J Exp Med 186: 109 (1997)). También son conocidos por su rápida producción de grandes cantidades de IL-4 e IFN- γ tras la estimulación a través de sus α - β TCR (Exley y col., J. Exp. Med. 186:109 (1997)).

Las células NKT restringidas a CD1d son una clase particular de células T no convencionales que parecen desempeñar un papel importante en la definición del resultado de la estimulación inmunitaria en el entorno local. Comparten con la clase más grande de células NKT la expresión de marcadores de los linajes de células T y de células citotóxicas naturales (NK). Como tales, las células NKT se consideran parte de la inmunidad innata como las células NK y en los seres humanos su frecuencia en individuos normales puede ser de hasta el 2,0 % de los linfocitos T totales (Gumperz y col., J Exp Med 195:625 (2002); Lee y col., J Exp Med 195:637 (2002)).

Las células NKT restringidas a CD1d se distinguen de otras células NKT por su especificidad por los antígenos lipídicos y glicolipídicos presentados por la molécula monomórfica MHC de clase Ib, CD1d (Kawano y col., Science 278:1626-1629 (1997)). CD1d es una molécula no codificada por el MHC que se asocia con la β 2-microglobulina y está relacionada estructuralmente con las moléculas clásicas de la clase I del MHC. CD1d tiene un bolsillo de unión a antígeno hidrófobo que está especializado para unir las cadenas de hidrocarburos de las colas de lípidos o péptidos hidrófobos. Zeng y col., Science 277: 339-345 (1997). Se sabe que CD1d se une a un esfingolípido α -glicosilado derivado de esponja marina, α -galactosilceramida (α -GalCer), y a moléculas relacionadas tales como los antígenos glicolípidos de tipo ceramida con galactosa o glucosa unida a α pero no a manosa. Kawano y col., Science 278:1626-1629 (1997); y Zeng y col., Science 277: 339-345 (1997). Como se analiza en este documento, la capacidad de activar células NKT restringidas a CD1d mediante estimulación con α -GalCer o moléculas relacionadas unidas a CD1d de células presentadoras de antígeno ha facilitado en gran medida el análisis funcional de este subconjunto de células T no convencionales. En ausencia de inflamación, se ha demostrado que las células NKT restringidas a CD1d se localizan preferentemente en determinados tejidos como el timo, el hígado y la médula ósea (Wilson y col., Trends Mol Med 8: 225 (2002)) y la actividad antitumoral de las células NKT se ha investigado, por ejemplo, en la metástasis hepática de ratón.

Entre las células NKT restringidas a CD1d se encuentra un subconjunto, denominado en este documento «células iNKT», que expresa un receptor de células $\alpha\beta$ T altamente conservado (TCR). En seres humanos, este TCR invariable está compuesto por V α 24J α 15 en asociación con V β 11, mientras que en ratones el receptor comprende el

V α 14J α 18 y el V β 8.2 altamente homólogos. Otras células NKT restringidas a CD1d expresan TCR más variable. Tanto la clase invariante de TCR como la variante de TCR de células T restringidas a CD1d pueden detectarse mediante la unión de tetrámeros de CD1d cargados con α -GalCer (Benlagha y col., J Exp Med 191:1895-1903 (2000); Matsuda y col., J Exp Med 192:741-754 (2000) y Karadimitris y col., Proc Natl Acad Sci USA 98:3294-3298 (2001)). Las células NKT restringidas a CD1d, como se define en esta solicitud (NKT restringida a CD1d), incluyen células que expresan TCR invariante o variante y que se unen o se activan mediante CD1d cargado con α -GalCer o con antígenos glicolípidos de tipo ceramidas relacionados. Las células NKT restringidas a CD1d, como se define en esta solicitud (CD1d-NKT), incluyen células que expresan TCR invariante o variante y que se unen o se activan mediante CD1d cargado con α -GalCer o con esfingolípidos relacionados que tienen galactosa enlazada en α o glucosa que incluye moléculas tales como OCH, que difiere de la α -GalCer por tener una base de esfingosina de cadena larga acortada (C5 frente a C14) y una cadena de acilo (C24 frente a C26) (Miyamoto y col., Nature 413:531-4 (2001)).

Se ha demostrado que las NKT restringidas a CD1d tienen actividad citotóxica directa contra dianas que expresan CD1d. Sin embargo, es probable que el efecto de la NKT restringida a CD1d en las respuestas inmunitarias se amplifique a través del reclutamiento de otros linfocitos, ya sea por interacción directa o, quizás incluso más importante, por el reclutamiento indirecto a través de la interacción con DC. Las NKT restringidas a CD1d tienen la capacidad particular de secretar grandes cantidades de IL-4 e IFN- γ temprano en una respuesta inmunitaria. La secreción de IFN- γ induce la activación de DC que produce la interleuquina-12 (IL-12). IL-12 estimula aún más la secreción de IFN- γ por las células NKT y también conduce a la activación de las células NK que secretan más IFN- γ .

Como la NKT restringida a CD1d es capaz de secretar rápidamente grandes cantidades de IL-4 e IFN- γ , la polarización de las respuestas inmunitarias dependerá de si predomina el efecto de IFN- γ proinflamatorio o de las citoquinas antiinflamatorias IL-4. Se ha informado que esto es, en parte, una función de la frecuencia relativa de diferentes subconjuntos de NKT restringidas a CD1d. Estos subconjuntos incluyen (i) una población de NKT restringida a CD1d invariable que es negativa tanto para CD4 como para CD8 y que da lugar a una respuesta de tipo TH1 predominantemente incluida la secreción de IFN- γ y TNF- α proinflamatorios y (ii) una población separada de NKT restringida a CD1d que es CD4+ y que da lugar a respuestas tanto tipo TH1 como tipo TH2, incluida la secreción de las citoquinas antiinflamatorias de tipo Th2 IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Lee y col., J Exp Med 195:637-41 (2002); y Gumperz y col., J Exp Med 195:625-36 (2002)). Además, la actividad de las células NKT se modula diferencialmente dependiendo del glicolípido de tipo ceramida particular unido a CD1d (véase, por ejemplo la patente de EE. UU. n.º 7.772.380)). Las composiciones de la presente descripción incluyen aspectos con asociación selectiva de CD1d con estos glicolípidos de tipo ceramida funcionalmente diferentes y las α -glicosilceramidas relacionadas. Los factores locales que influyen en la activación de los subconjuntos de NKT restringidas a CD1d incluyen el entorno de citoquinas y, lo que es más importante, las DC que se reclutan para ese entorno.

Se ha demostrado que una familia de glicolípidos de tipo ceramida (es decir, la α -galactosilceramida (α -GalCer) y ceramidas α -glicosil relacionadas) estimula las fuertes respuestas restringidas a CD1d por las células NKT murinas (Kawano y col., 1997). Estos compuestos contienen un azúcar de hexosa α -anomérica (galactosa o glucosa activa para el reconocimiento de células NKT), que los distingue de las ceramidas que comúnmente se producen en tejidos de mamíferos que contienen solo azúcares β -anoméricos. Se sabe que estos compuestos se producen naturalmente en las esponjas marinas, la fuente de la cual se aislaron originalmente, y se volvieron de interés para los inmunólogos cuando se demostró que α -GalCer indujo un rechazo dramático del tumor como resultado de la activación inmunitaria cuando se inyecta en ratones portadores de tumores. (Kobayashi y col., Oncol. Res. 7:529-534 (1995)). Posteriormente, esta actividad se vinculó a la capacidad de la α -GalCer para activar rápidamente las células NKT a través de un mecanismo dependiente de CD1d. Ahora se ha demostrado que la α -GalCer se une a CD1d, creando así un complejo molecular que tiene una afinidad medible por los TCR de las células NKT (Naidenko y col., J. Exp. Med. 190:1069-1080 (1999); Matsuda y col., J Exp. Med. 192:741 (2000); Benlagha y col., J Exp. Med. 191:1895-1903 (2000)). Así, α -GalCer proporciona un potente agente que puede permitir la activación de la mayoría de las células NKT tanto *in vitro* como *in vivo*.

La α -GalCer activadora de NKT más exhaustivamente estudiada llamada KRN7000 en la bibliografía, es una molécula sintética que tiene una estructura similar a las formas naturales de α -GalCer que se aislaron originalmente de una esponja marina sobre la base de su actividad anticancerígena en roedores (Kawano y col., Science 278: 1626-1629 (1997); Kobayashi y col., 1995; Iijima y col., Bioorg. Med. Chem. 6:1905-1910 (1998); Inoue y col., Exp. Hematol. 25:935-944 (1997); Kobayashi y col., Bioorg. Med. Chem. 4:615-619 (1996a) y Biol. Pharm. Bull. 19:350-353 (1996b); Uchimura y col., Bioorg. Med. Chem. 5:2245-2249 (1997a); Uchimura y col., Bioorg. Med. Chem. 5:1447-1452 (1997b); Motoki y col., Bioorg. Pharm. Bull. 19:952-955 (1996a); Nakagawa y col., Oncol. Res. 10:561-568 (1998); Yamaguchi y col., Oncol. Res. 8:399-407 (1996)). Un análogo sintético de KRN7000 con una base de esfingosina truncada mostró una capacidad mejorada para suprimir la autoinmunidad en un modelo de ratón de

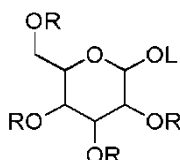
encefalomielitis alérgica experimental (EAE) (Miyamoyo y col., Nature 413:531-534 (2001)). Otras variantes alteradas en la base de estingosina α -GalCer se identifican en la patente de EE. UU. n.º 5.936.076.

- Una gran cantidad de bibliografía que data de noviembre de 1997 hasta la actualidad ha estudiado el mecanismo por el cual KRN7000 activa el sistema inmunológico de los mamíferos (Kawano y col., Science 278: 1626-1629 (1997); Benlagha y col., J Exp. Med. 191:1895-1903 (2000); Burdin y col., Eur. J Immunol. 29:2014-2025 (1999); Crowe y col., J. Immunol. 171:4020-4027 (2003); Naidenko y col., J Exp. Med. 190:1069-1080 (1999); Sidobre y col., J. Immunol. 169:1340-1348 (2002); Godfrey y col., Immunol. Today 21:573-583 (2000); Smyth y Godfrey, Nat. Immunol. 1:459-460 (2000)). Estos estudios muestran de manera uniforme que el mecanismo proximal para el efecto de KRN7000 es la unión de este compuesto a una proteína CD1d, que se expresa en la mayoría de las células hematopoyéticas, así como en algunos epitelios y otros linajes celulares. La unión de KRN7000 a CD1d crea un complejo molecular que se reconoce con alta afinidad por los receptores de antígeno de células T (TCR) de un subconjunto de linfocitos T llamados células T citotóxicas naturales (células NKT). El reconocimiento del complejo KRN7000/CD1d conduce a una rápida activación de las células NKT, que residen en el hígado, el bazo y otros órganos linfoides y tienen el potencial de migrar potencialmente a cualquier tejido. Las células NKT activadas secretan rápidamente una amplia gama de quimioquinas y citoquinas, y también tienen la capacidad de activar otros tipos de células tales como las células dendríticas y las células citotóxicas naturales (NK). Se ha demostrado que la cadena de eventos que sigue a la activación de las células NKT por los complejos KRN7000/CD1d tiene muchos efectos potenciales cadena abajo en el sistema inmunológico. Por ejemplo, en el contexto de determinados tipos de infecciones, esto puede llevar a un efecto adyuvante que potencia la inmunidad adaptativa a la infección y promueve la curación. O, en el contexto de determinados tipos de enfermedades autoinmunes, la activación de las células NKT por KRN7000 puede alterar el curso de la respuesta autoinmunitaria de una manera que suprime la destrucción del tejido y mejora la enfermedad.
- Varios mecanismos indirectos contribuyen al efecto protector de las células NKT restringidas a CD1d. La activación de células NKT mediante la administración de α -GalCer in vivo da como resultado la activación conjunta de células NK (Eberl y MacDonald, Eur. J. Immunol. 30:985-992 (2000); y Carnaud y col., J. Immunol. 163:4647-4650 (1999)). En ratones deficientes en células NKT, α -GalCer no puede inducir actividad citotóxica por parte de las células NK. Las células NKT también mejoran la inducción de las células T citotóxicas restringidas a MHC clásicas de clase I (Nishimura y col., Int Immunol 12:987-94 (2000); y Stober y col., J Immunol 170:2540-8 (2003)).

Como se explica con más detalle a continuación, la presente descripción incluye un glicolípido. Como se usa en este documento, un «glicolípido» se refiere a un compuesto químico que comprende un resto carbohidrato unido a un resto lipófilo representado por la estructura general:

- G-L
donde L es un lípido y G es un carbohidrato. Como se usa en este documento, un «lípido» se refiere a un compuesto orgánico que es soluble en grasas, aceites y disolventes no polares, tales como los disolventes orgánicos. El término «lipófilo» se refiere a la propiedad de un compuesto orgánico para disolverse en grasas, aceites, lípidos y disolventes no polares, tales como los disolventes orgánicos. Los compuestos lipófilos son poco solubles o insolubles en agua. G puede ser un sacárido, que puede ser una hexosa o una pentosa, y puede ser un mono-, di-, tri-, oligo o polisacárido, o un derivado del mismo. Los azúcares de interés incluyen alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, fructosa, maltosa, lactosa y sacarosa. El enlace entre el azúcar y el lípido puede estar en cualquiera de los átomos de O, generalmente en las posiciones 1, 2, 3 o 4, más generalmente en la posición 1. El enlace puede estar en la configuración alfa o beta. El enlace puede estar en la configuración alfa.

En algunos aspectos de la descripción, los glicolípidos pueden tener la estructura:



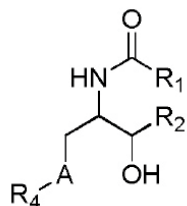
- donde L es un lípido, y R se selecciona de entre el grupo que consiste en H, un azúcar pentosa, un azúcar hexosa, un oligo o polisacárido; o un grupo alquilo, arilo o alquenilo, tal como un alquilo inferior de C1 a C6, cuyo alquilo está opcionalmente sustituido, cuyo sustituyente puede incluir, sin limitación, un grupo alquilo, arilo, alquenilo, aralquilo, aralquenilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo o cicloalquilalquenilo; y puede contener uno o más heteroátomos N, S u O. Cada uno de los átomos O puede estar en la orientación α o β , por ejemplo, glucosa, galactosa, manosa, etc.

Varios lípidos encuentran su uso como L, incluyendo ácidos grasos C8 a C30, alcoholes secundarios de cadena larga, amino alcoholes de cadena larga, amidas de ácidos grasos con bases di- o trihidroxi de cadena larga; y similares. Por ejemplo, un resto glicosilo (una o varias unidades) puede estar unido a un grupo hidroxilo de un alcohol graso o alcohol graso hidroxilado, o a un grupo carbonilo de un ácido graso. Ejemplos no limitantes de lípidos adecuados incluyen ceramidas, esfingomielina, cerebrósidos y similares, que incluyen esfingosina, dihidroesfingosina, C20-dihidroesfingosina, fitosfingosina, C20-fitosfingosina, deshidrofitosfingosina y esfingadienina.

En la invención, el glicolípido es un glicolípido de tipo ceramida, específicamente, una α -galactosilceramida, también denominada en este documento α -GalCer. También se describen análogos de la misma, tal como la α -C-GalCer, que contiene un enlace C-glicósido en lugar de un enlace O-glicosídico entre el azúcar y la base esfingoide.

Las ceramidas son derivados lipófilos de N-acilo de una base de cadena larga o esfingoide, siendo la más común en los animales la esfingosina y en las plantas la fitosfingosina. En general, el resto lipófilo N-acilo es un ácido graso, que en algunas realizaciones, comprende cadenas de carbono largas C3-C27. Estas cadenas de carbono de ácidos grasos pueden ser cadenas de alquilo, alquenilo o alquinilo sustituidas, no sustituidas, saturadas, insaturadas, ramificadas, no ramificadas. Como se usa en este documento, el término «ceramida» incluirá cualquiera de los análogos de ceramida, sintéticos o naturales.

Como se usa en este documento, las expresiones «glicolípido de tipo ceramida» y «ceramida de glicolípido» se usan indistintamente. Un glicolípido de tipo ceramida es un glicolípido que comprende un resto lipófilo N-acilo y un resto de esfingosina o un análogo de la misma (por ejemplo, una ceramida), y está representado por la Fórmula general (VII), donde el R2 de Fórmula (VII) puede ser una cadena de alquilo, alquenilo o alquinilo, lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, o un anillo cíclico, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, o un anillo de arilo sustituido o no sustituido:



Fórmula (VII)

En esta Fórmula (VII), R4 es un carbohidrato y el resto de la molécula es una ceramida o un análogo de la misma. En algunos aspectos de la descripción, R4 puede ser un sacárido. Los glicolípidos de tipo ceramida donde R4 es un sacárido se denominan en este documento glicosilceramida. El sacárido puede ser una hexosa o una pentosa o análogos de las mismas. La hexosa o pentosa o análogos de las mismas pueden ser mono-, di-, tri-, oligo o polisacárido, o un derivado de los mismos. Los glicolípidos de tipo ceramida donde el sacárido de R4 es un galactósido (en enlaces α o β) se denominan en este documento galactosilceramidas. En la invención, R4 es un α -galactósido. En algunos aspectos, A, si está presente, puede ser -O-, -CH2- o -S; o es un enlace simple. En la invención, A es O.

R1 y R2 pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones, R1, R2, o ambos pueden ser un alcano, alqueno, cicloalquilo sustituido o no sustituido; alcanos o alquenos sustituidos con heteroátomos; o arilos o heteroarilos sustituidos o no sustituidos. En algunas realizaciones particulares, R1, R2, o ambos pueden ser cadenas de alquilo o alquenilo sustituidas o no sustituidas con heteroátomos, anillos cíclicos o anillos arilo incorporados dentro de la cadena. En algunas realizaciones, R1, R2 o ambos contienen dobles enlaces contiguos o no contiguos. Estos dobles enlaces pueden ser de configuración E/Z. En algunas realizaciones, R2 es un grupo alquilo o alqueno C3-C27 de cadena larga saturado o insaturado con al menos un grupo hidroxilo unido a él.

En realizaciones particulares, R1 es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; o R1 es -C(OH)-R3 donde R3 es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; o R1 es un alcano o alqueno C₆-C₂₇ donde (i) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ está sustituido con un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático o (ii) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo C₆-C₂₇, un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático; o R1 es un anillo aromático opcionalmente sustituido,

o un araquilo.

En algunas de las realizaciones anteriores, R2 es una cadena de alquilo, alquenilo o alquinilo sustituida o no sustituida, ramificada o no ramificada. En algunas realizaciones particulares, R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- 5
 (a) $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
 (b) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
 (c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
 (d) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
 10 (e) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$,

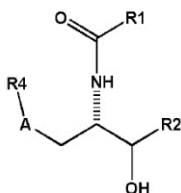
donde x es un número entero que varía de 0-40.

En algunas realizaciones más, R2 es $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$, donde x es un número entero que varía de 4-17. En algunas realizaciones particulares, R2 es $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$.

Ejemplos no limitantes de glicolípidos de tipo ceramida se describen en este documento y también se pueden encontrar, por ejemplo, en Porcelli, pub. de sol. de patente de EE. UU. n.º 2006/0052316, Tsuji, pub. de sol. de patente de EE. UU. n.º 2006/0211856, Jiang, pub. de sol. de patente de EE. UU. n.º 2006/0116331, Hirokazu y col., pub. de sol. de patente de EE. UU. n.º 2006/0074235, Tsuji y col., pub. de sol. de patente de EE. UU. n.º 2005/0192248, Tsuji, solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0127429, y Tsuji y col., solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0157135.

Un glicolípidos de tipo ceramida modificado de la invención comprende una α -galactosilceramida.

En algunos aspectos de la descripción, una glicosilceramida o un análogo de la misma comprende la Fórmula I:



(Fórmula I)

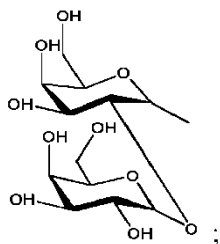
donde R1 es un alcano $\text{C}_1\text{-C}_{27}$ lineal o ramificado o alqueno $\text{C}_2\text{-C}_{27}$; o R1 es $-\text{C}(\text{OH})\text{-R}_3$ donde R3 es un alcano $\text{C}_1\text{-C}_{26}$ lineal o ramificado o alqueno $\text{C}_2\text{-C}_{26}$; o R1 es un alcano o alqueno $\text{C}_6\text{-C}_{27}$ donde (i) el alcano o alqueno $\text{C}_6\text{-C}_{27}$ está sustituido con un cicloalcano $\text{C}_5\text{-C}_{15}$, cicloalqueno $\text{C}_5\text{-C}_{15}$, heterociclo, o un anillo aromático o (ii) el alcano o alqueno $\text{C}_6\text{-C}_{27}$ incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo $\text{C}_6\text{-C}_{27}$, un cicloalcano $\text{C}_5\text{-C}_{15}$, cicloalqueno $\text{C}_5\text{-C}_{15}$, heterociclo, o un anillo aromático;

R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- (a) $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
 (b) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
 (c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
 40 (d) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
 (e) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$,

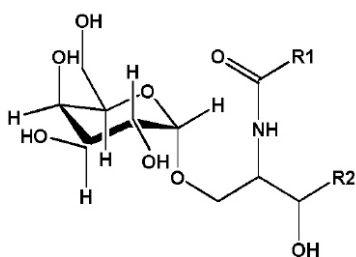
donde X es un número entero que varía de 4-17;

R4 es un monosacárido unido en α o unido en β , o cuando R1 es un alcano $\text{C}_1\text{-C}_{27}$ lineal o ramificado, R4 es:



y
A es O o -CH₂.

5 En una realización de la invención, la α -galactosilceramida comprende la Fórmula II:



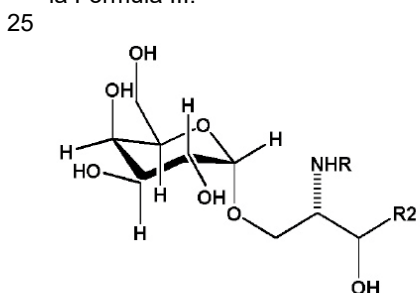
(Fórmula II)

10 donde
R1 es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; o R1 es -C(OH)-R3; donde
R3 es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; y
R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- 15 (a) -CH₂(CH₂)_xCH₃,
(b) -CH(OH)(CH₂)_xCH₃,
(c) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)₂,
(d) -CH=CH(CH₂)_xCH₃,
(e) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)CH₂CH₃,

20 donde X es un número entero que varía de 4-17.

En otra realización, el glicolípido de tipo ceramida modificado comprende una α -galactosilceramida que comprende la Fórmula III:



(Fórmula III)

donde R es -C(O)R1, donde R1 es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; o R1 es -C(OH)-R3 donde
R3 es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; o R1 es un alcano o alqueno C₆-C₂₇ donde (i) el alcano
30 o alqueno C₆-C₂₇ está sustituido con un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático o
(ii) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo C₆-C₂₇, un cicloalcano C₅-C₁₅,

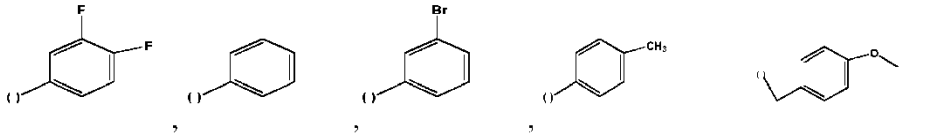
cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático; o R1 es un anillo aromático opcionalmente sustituido, o un aralquilo, y

R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

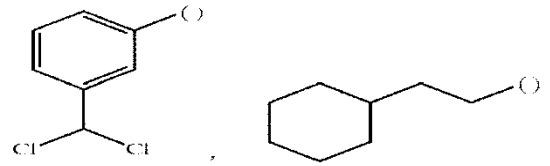
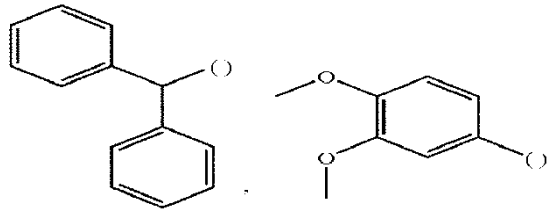
- 5 (a) -CH₂(CH₂)_xCH₃,
 (b) -CH(OH)(CH₂)_xCH₃,
 (c) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)₂,
 (d) -CH=CH(CH₂)_xCH₃,
 (e) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)CH₂CH₃,

10 donde X es un número entero que varía de 4-17.

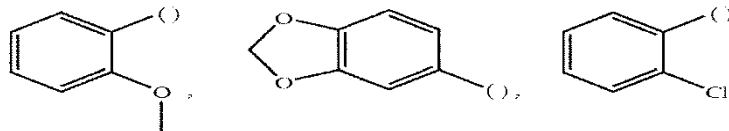
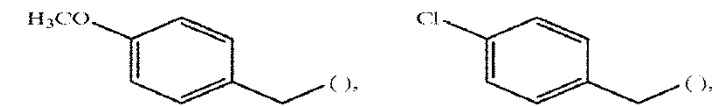
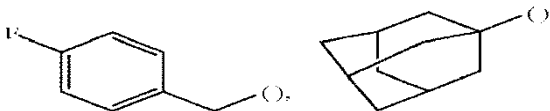
En una realización adicional, R1 se selecciona de entre el grupo que consiste en



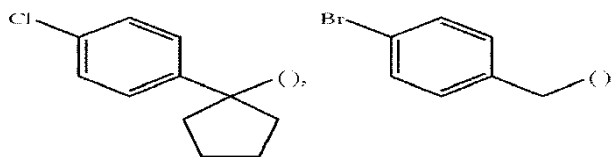
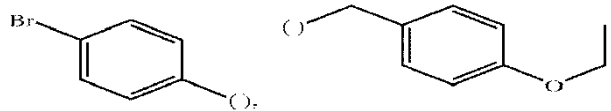
15

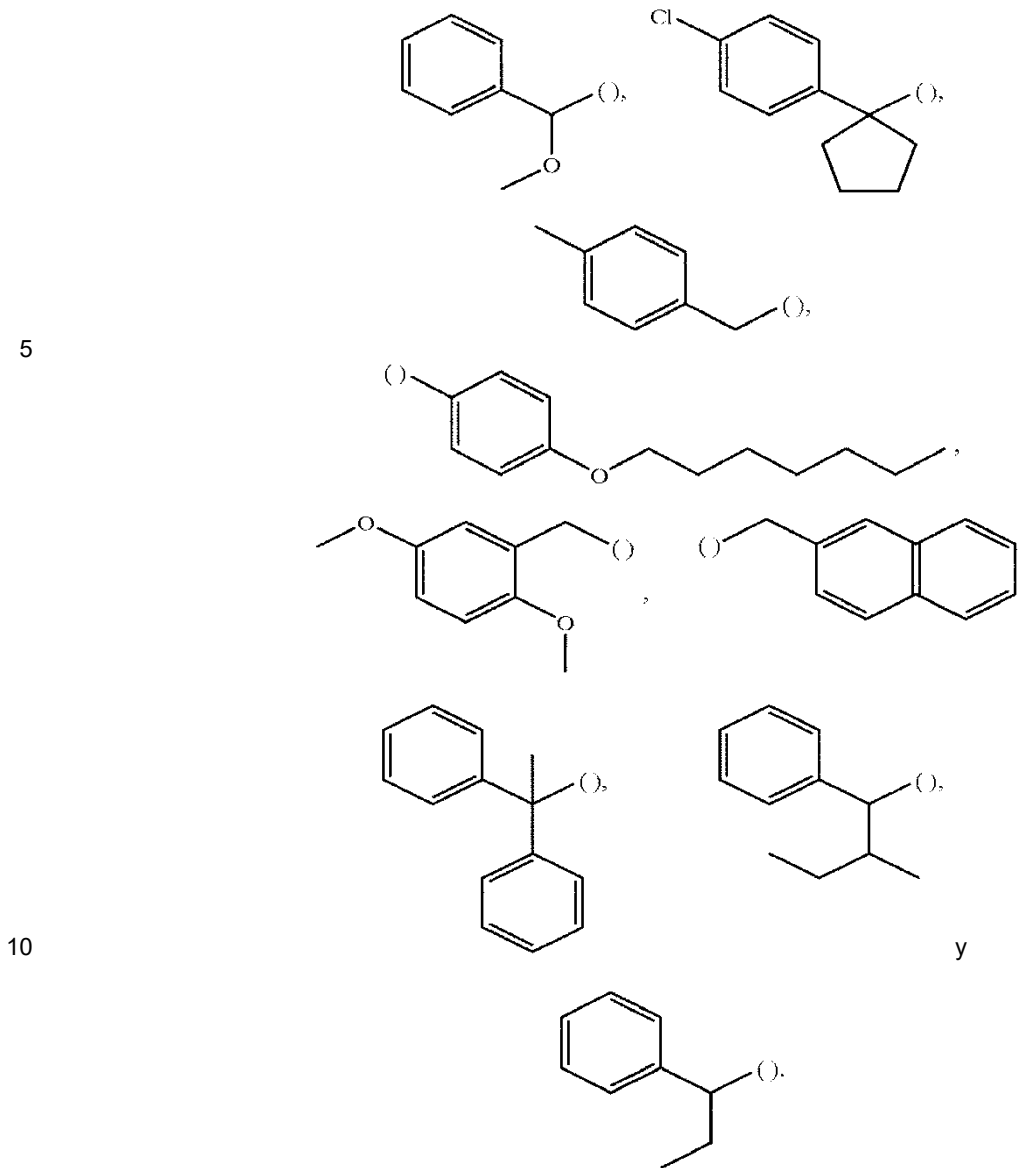


20



25





donde () representa el punto de unión de R1 al compuesto de Fórmula III. En la invención, el R1 está sustituido con un grupo fotorreactivo. El grupo fotorreactivo está unido al grupo R1 en cualquier posición adecuada del grupo R1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el grupo fotorreactivo está unido al anillo fenilo del grupo R1. En algunas realizaciones más, el grupo fotorreactivo está unido a los sustituyentes colgantes del anillo de fenilo.

En otra realización, la α -galactosilceramida comprende (2S, 3S, 4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol (KRN7000) o (2S, 3S)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3-octadecanodiol).

En otra realización, la α -galactosilceramida comprende (2S, 3S, 4R)-1-CH₂-(α -galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol (α -C-GalCer).

Otros ejemplos no limitantes de glicolípidos de tipo ceramida se describen en la patente de EE. UU. n.º 7.273.852; la patente de EE. UU. n.º 6.531.453; y la patente de EE. UU. n.º 5.936.076, la patente de EE. UU. n.º 7.772.380.

Los «glicolípidos modificados» como se hace referencia en este documento incluyen glicolípidos que comprenden

un grupo funcional que permite un enlace covalente estable a una proteína (por ejemplo, CD1d). La expresión abarca glicolípidos de origen natural que se han modificado a través de la intervención humana para comprender dicho grupo funcional y también se refiere a glicolípidos sintéticos.

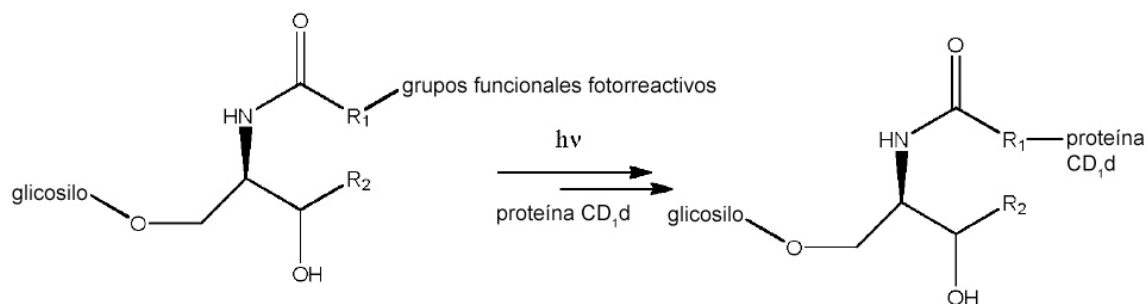
- 5 El glicolípido modificado de la presente invención comprende un grupo funcional que permite un enlace covalente estable a una proteína (por ejemplo, CD1d) dentro o en el extremo de una cadena de acilo del glicolípido. En la invención, el glicolípido de tipo ceramida se modifica dentro o en el extremo del resto lipófilo N-acilo, tal como una cadena acilo.
- 10 En algunos aspectos de la descripción, un grupo funcional que forma un enlace covalente estable a una proteína tal como CD1d, es un grupo que puede activarse fotoquímicamente o térmicamente. En algunos aspectos, dicho grupo funcional puede ser activado fotoquímicamente. Tal como se usa en este documento, la expresión «grupo fotorreactivo» o «grupo funcional fotorreactivo» se refiere a un grupo funcional que es químicamente inerte, pero se vuelve reactivo cuando se expone a la energía de una fuente de luz. El grupo fotorreactivo puede volverse reactivo
- 15 cuando se irradia con luz visible o en algunas realizaciones, luz ultravioleta.

En aspectos particulares, los grupos fotorreactivos que pueden activarse usando una luz UV se eligen porque un compuesto que posee dicho grupo (por ejemplo, un glicolípido con un grupo fotorreactivo) se puede añadir a la proteína (por ejemplo, CD1d) y el tiempo de formación de enlaces covalentes puede controlarse mediante la

20 irradiación UV en cualquier momento dado.

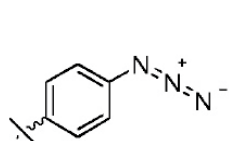
Cualquier grupo funcional fotorreactivo puede usarse en la presente descripción. En algunos aspectos, los grupos fotorreactivos que se pueden usar para formar un enlace covalente entre un glicolípido y la proteína CD1d incluyen uno cualquiera de arilazidas, azidometil cumarinas, benzofenonas, antraquinonas, determinados compuestos de

25 diazo, diazirinas y derivados de psoraleno. En general, una reacción fotoactivada entre un compuesto que posee un grupo funcional fotorreactivo y una proteína CD1d se puede ilustrar como sigue en el Esquema 1.

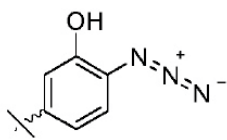


Esquema 1

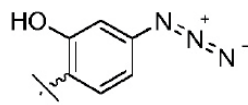
- 30 En algunos aspectos, las arilazidas y diazirinas pueden usarse como grupos funcionales fotorreactivos. En algunos de los aspectos específicos, se pueden usar los siguientes grupos funcionales fotorreactivos (Esquema 2)



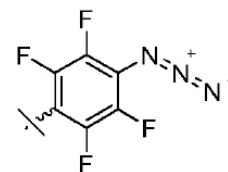
fenilazida



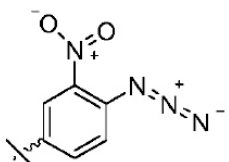
ortofenil azida



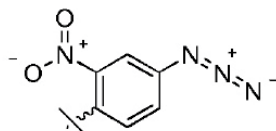
metafenilazida



tetrafluorofenilazida



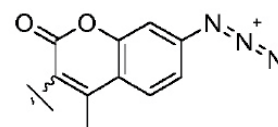
ortonitrofenilazida



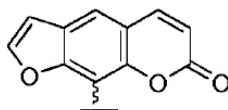
metanitrofenilazida



diazirida



ácido-metil cumarina



psoraleno

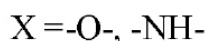
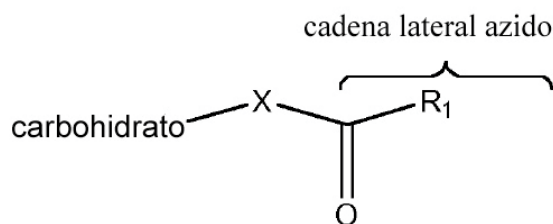
Esquema 2

Los enlaces de garabato representan la posición de unión de estos grupos funcionales fotorreactivos al glicolípido, tal como dentro o en el extremo de una cadena lateral acilo del glicolípido.

5

En algunos aspectos, los grupos funcionales fotorreactivos que pueden activarse con irradiación ultravioleta larga (por ejemplo, 300 a 460 nm) se usan en los procedimientos y composiciones descritos actualmente.

En algunos aspectos de la descripción, el grupo lipófilo de un glicolípido está conectado al grupo de carbohidratos a través de un enlace acilo. El enlace acilo podría ser a través de un O o N o similar. A este respecto, la «cadena lateral de acilo» se muestra a continuación:



15 La cadena lateral de acilo puede ser lineal o ramificada. En aquellas realizaciones donde la cadena lateral de acilo es lineal, cuando se refiere a la longitud de la cadena lateral de acilo lineal (sin incluir el grupo funcional que permite un enlace covalente estable a una proteína), se incluye el carbono carbonilo. En algunas realizaciones, la cadena lateral de acilo lineal tiene aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más átomos (excluyendo los hidrógenos), que pueden incluir uno o más heteroátomos.

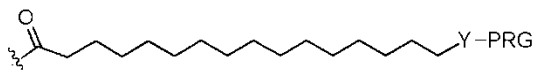
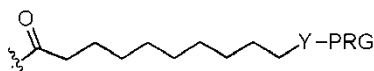
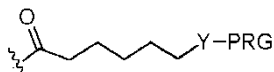
20

En algunas de estas realizaciones, la cadena lateral de acilo lineal tiene al menos 11 átomos (excluyendo los

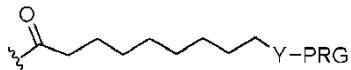
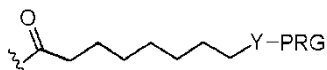
hidrógenos), que pueden incluir uno o más heteroátomos. En determinadas realizaciones, la cadena lateral de acilo comprende de aproximadamente 11 a aproximadamente 14 átomos (excluyendo los hidrógenos).

En determinadas realizaciones, la cadena lateral de acilo lineal tiene una de las siguientes estructuras:

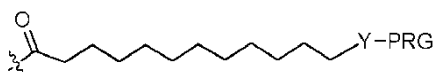
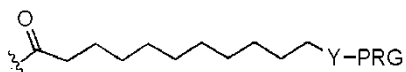
5



10



15

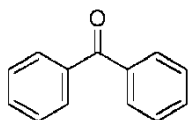


20 donde Y, si está presente es -O-, -CH₂-, -S-, -OCH₂-, -SCH₂-, -CH₂CH₂-; o un enlace, y PRG es un grupo fotorreactivo.

En la invención, el glicolípido es una α-galactosilceramida. El grupo funcional fotorreactivo está unido al resto lipófilo N-acilo. En realizaciones particulares, el grupo funcional fotorreactivo está unido dentro o en el extremo de la cadena lateral acilo de ácido graso.

En la invención, el grupo funcional fotorreactivo que se añade a un glicolípido es un grupo benzofenona. El término «benzofenona» es bien conocido por un experto en la materia. En general, las benzofenonas están representadas por la fórmula general C₆H₅-CO-C₆H₅ como se muestra a continuación.

30

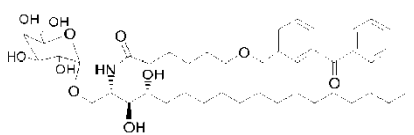
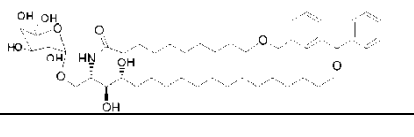
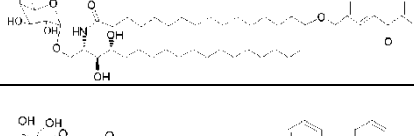
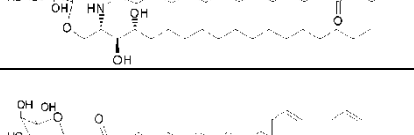
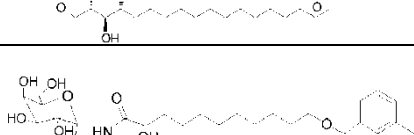
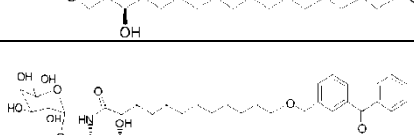
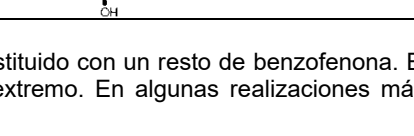


Como se usa en este documento, las benzofenonas o análogos de las mismas pueden usarse en determinados aspectos de la descripción. Por ejemplo, en algunos aspectos se pueden usar isómeros de grupos fenilo (es decir, 35 tiofenos y similares) en lugar de grupos fenilo. En algunos otros aspectos, los grupos fenilo de análogos de los mismos pueden estar sustituidos con otros grupos funcionales. En algunos aspectos más, los grupos fenilo y análogos de los mismos no están sustituidos.

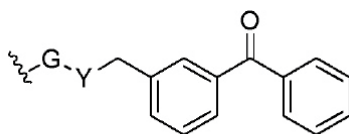
Así, el glicolípido modificado de la presente invención comprende un grupo benzofenona. El grupo benzofenona está unido covalentemente al resto lipófilo N-acilo. En algunas realizaciones, el grupo benzofenona se encuentra en el extremo de la cadena acilo de un glicolípido de tipo ceramida. Ejemplos no limitantes de dichos glicolípidos modificados se proporcionan en la Tabla 1.

40

TABLA 1. Ejemplos no limitantes de glicolípidos de tipo ceramida modificados con benzofenona.

Compuesto	Grupo CHO	Estructura
DB11-1	α -D-Gal	
DB11-2	α -D-Gal	
DB11-3	α -D-Gal	
DB12-6	α -D-Gal	
DB12-7	α -D-Gal	
DB12-8	α -D-Gal	
DB12-9	α -D-Gal	

Así, en la invención, R1 de fórmula (VII) está sustituido con un resto de benzofenona. En realizaciones particulares, el resto de benzofenona está sustituido en el extremo. En algunas realizaciones más, R1 de Fórmula (VII) está 5 representado por la siguiente Fórmula (VIII):

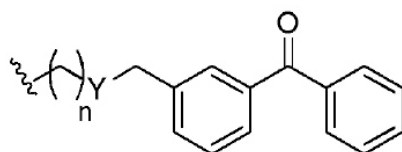


Fórmula (VIII)

donde Y es -O-, -CH₂-o -S-, y G es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; o G es -C(OH)-R3 donde 10 R3 es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; o R1 es un alcano o alqueno C₆-C₂₇ donde (i) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ está sustituido con un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático o (ii) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo C₆-C₂₇, un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático; o R1 es un anillo aromático opcionalmente sustituido, o un aralquilo.

15

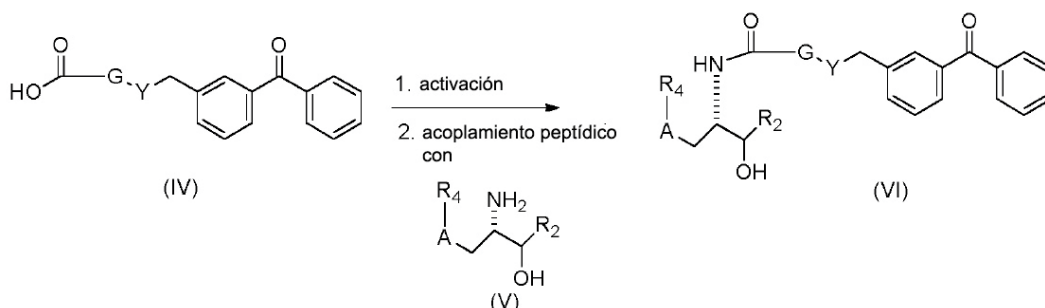
En algunas realizaciones, R1 de Fórmula (VII) está representado por la siguiente Fórmula (IX):



Fórmula (IX)

donde Y es -O-, -CH₂-o -S-, y n es un número entero que varía de 0-30. En algunas realizaciones, n es un número entero que varía de 3-17.

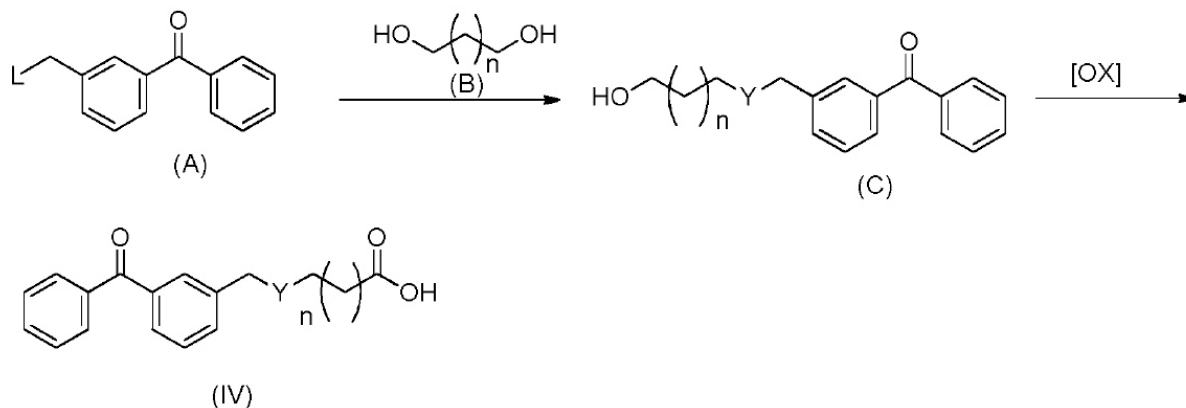
- 5 Los glicolípidos modificados descritos actualmente y los complejos de glicolípidos/proteínas modificados pueden sintetizarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos los procedimientos descritos en este documento.
- 10 Según una realización de la invención, la síntesis general de glicolípidos modificados con benzofenonas se muestra en el Esquema 3. En consecuencia, un derivado de ácido benzofenona carboxílico de Fórmula (IV) se activa con un agente activador adecuado y se hace reaccionar mediante un acoplamiento peptídico con un glicolípido de tipo ceramida de Fórmula (V) para proporcionar los glicolípidos modificados con benzofenonas deseados. Cualquier agente activador, reactivo y disolvente conocido en la técnica como adecuado para un acoplamiento peptídico entre una amina y un ácido carboxílico se puede usar para la reacción de acoplamiento del derivado del ácido benzofenona carboxílico (IV) y el glicolípido de tipo ceramida (V).



Esquema 3

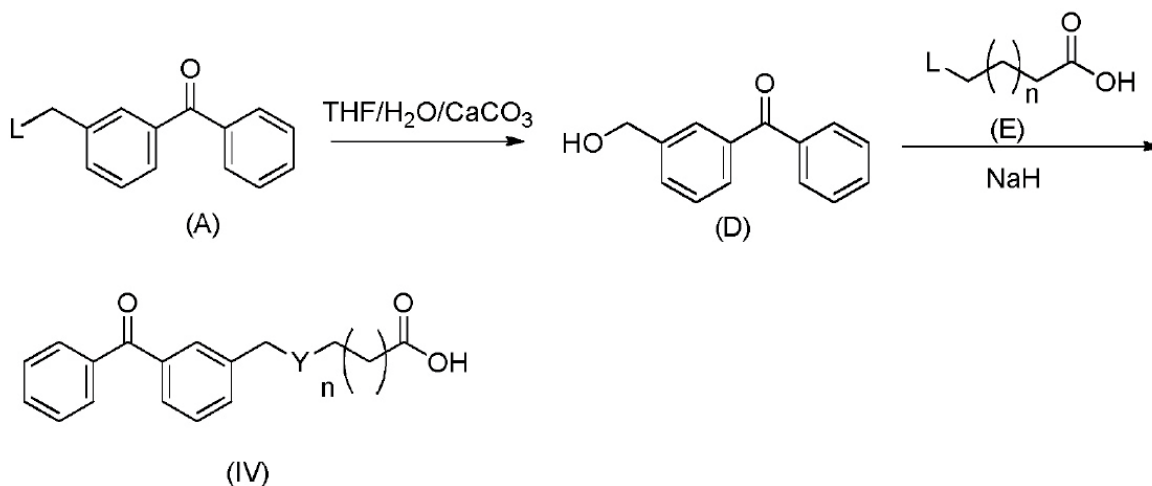
- 20 En algunas realizaciones, Y es -O-, -CH₂-o -S-; G es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; o G es -C(OH)-R₃ donde R₃ es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; o R₁ es un alcano o alqueno C₆-C₂₇ donde (i) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ está sustituido con un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático o (ii) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo C₆-C₂₇, un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático; R₄ es un α-galactosil; A, si está presente,
- 25 es -O-, -CH₂-; o es un enlace simple; y R₂ es una cadena de alquilo, alquenilo o alquinilo C₃-C₄₀ sustituida o no sustituida. En algunas realizaciones más, el R₂ del glicolípido modificado que comprende un grupo benzofenona de Fórmula (VI) es uno de los siguientes (a)-(e):
- 30 (a) -CH₂(CH₂)_xCH₃,
 (b) -CH(OH)(CH₂)_xCH₃,
 (c) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)₂,
 (d) -CH=CH(CH₂)_xCH₃,
 (e) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)CH₂CH₃, donde x es un número entero que varía de 0-40.
- 35 En algunas de las otras realizaciones, el R₂ del glicolípido modificado que comprende un grupo benzofenona de Fórmula (VI) es -CH(OH)(CH₂)_xCH₃, donde x es un número entero que varía de 4-17. En algunas realizaciones particulares, el R₂ del glicolípido modificado que comprende un grupo benzofenona de Fórmula (VI) es -CH(OH)(CH₂)₁₃CH₃. Según algunas realizaciones de la invención, el derivado de ácido benzofenona carboxílico de
- 40 Fórmula (IV) donde G es -(CH₂)_n-, donde n es un número entero que varía de 0-20 e Y es O, se puede sintetizar

según los esquemas 4 y 5.



Esquema 4

- 5 En consecuencia, un derivado de benzofenona (A) que comprende un grupo saliente adecuado se hace reaccionar con un derivado de diol (B) para formar el derivado de hidroxilo (C). Para esta reacción se puede usar cualquier grupo saliente adecuado L conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el grupo saliente L puede ser Br, Cl, I, tosilo, mesilo y similares. En algunas realizaciones particulares, el grupo saliente L es bromo. El derivado de hidroxilo se oxida luego al derivado de ácido carboxílico (IV) donde Y es O usando cualquiera de los reactivos de oxidación adecuados para oxidar un alcohol a un ácido. En particular, los agentes oxidantes que oxidan el alcohol primario a ácidos son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el agente oxidante es dicromato de piridinio (PDC).



Esquema 5

- 15 En algunas realizaciones, el derivado de ácido benzofenona carboxílico de Fórmula (V) donde G es $-(\text{CH}_2)_n-$, donde n es un número entero que varía de 0-20 e Y es O, se puede sintetizar como se ilustra en el esquema 3. En consecuencia, un derivado de benzofenona (A) se hace reaccionar con THF/H₂O en presencia de CaCO₃ para formar el correspondiente derivado de alcohol (D). El derivado de alcohol D se hace reaccionar luego con un derivado de ácido carboxílico que comprende un grupo saliente L en condiciones básicas para producir el derivado de ácido benzofenona carboxílico (IV) donde Y es O. Cualquier grupo saliente adecuado L conocido en la técnica puede usarse para esta reacción. En algunas realizaciones, el grupo saliente L puede ser Br, Cl, I, tosilo, mesilo y similares. En algunas realizaciones particulares, el grupo saliente L es bromo.

- 25 En un complejo de glicolípido/proteína modificado de la descripción, un glicolípido modificado está «asociado

físicamente» con una proteína, por ejemplo, la proteína CD1d, para producir un «complejo de glicolípido/CD1d modificado». En determinadas realizaciones, el complejo de glicolípido/CD1d modificado comprende además un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento. Por «físicamente asociado» se entiende una interacción directa con la proteína CD1d. En la invención, el glicolípido de tipo ceramida está asociado físicamente con una proteína CD1d a través de medios covalentes. En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo o la molécula de direccionamiento, o ambos están asociados físicamente con una proteína CD1d (por ejemplo, a través de medios covalentes).

Un glicolípido modificado que comprende un grupo fotorreactivo puede unirse covalentemente a una proteína (por ejemplo, CD1d) entrando en contacto el glicolípido modificado con la proteína e irradiando el glicolípido modificado con luz (por ejemplo, luz visible o luz ultravioleta). Cuando el grupo fotorreactivo es un grupo benzofenona, el glicolípido modificado que comprende el grupo benzofenona puede unirse covalentemente a una proteína (por ejemplo, CD1d) entrando en contacto el glicolípido modificado con la proteína e irradiando el glicolípido modificado con benzofenona y la proteína con luz ultravioleta (es decir, luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 10 nm, aproximadamente 400 nm). En realizaciones particulares, el glicolípido modificado entra en contacto con la proteína mediante la incubación de las dos moléculas en una solución. En algunas de estas realizaciones, la solución comprende una solución salina tamponada. En determinadas realizaciones, el glicolípido modificado y la proteína se irradian con luz ultravioleta con una longitud de onda larga (es decir, de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 460 nm, incluidos, pero no se limitan a, aproximadamente 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455 y 460 nm). En determinadas realizaciones, el glicolípido modificado y la proteína se irradian con UV con una longitud de onda de aproximadamente 365 nm. En algunas realizaciones, el glicolípido modificado y la proteína se irradian usando una lámpara UV que se coloca aproximadamente 1 pulgada por encima de la muestra. En algunas realizaciones, el glicolípido modificado y la proteína se irradian durante aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas o más. En realizaciones particulares, el glicolípido modificado y la proteína se irradian durante aproximadamente 1 hora.

La detección del glicolípido modificado físicamente asociado con la proteína puede realizarse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Mediante la unión estable de un glicolípido modificado a una proteína, por ejemplo, una proteína CD1d, se puede preparar un complejo de glicolípido/CD1d modificado. En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención permiten la administración simultánea de un glicolípido y una proteína, (proteína CD1d) a una célula presentadora de antígeno.

Un complejo de glicolípido/proteína modificado de la presente invención puede comprender un glicolípido único, o puede comprender mezclas heterogéneas de glicolípidos. Es decir, una proteína o proteínas múltiples pueden asociarse físicamente con un glicolípido único o pueden asociarse físicamente con una mezcla de glicolípidos.

La expresión «opcionalmente sustituido» como se usa en este documento significa no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes que incluyen halógeno (F, Cl, Br, I), alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido o alcoxi.

El término «alquilo», como se usa en este documento por sí mismo o parte de otro grupo, se refiere a un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o ramificada que tiene típicamente de uno a dieciocho carbonos o el número de carbonos designado. En una de dichas realizaciones, el alquilo es metilo. Los grupos alquilo ejemplares no limitantes incluyen etilo, n-propilo, isopropilo y similares.

La expresión «alquilo sustituido» como se usa en este documento se refiere a un alquilo como se define anteriormente que tiene uno o más sustitutos de halógeno (F, Cl, Br, I).

El término «heterociclo», como se usa en este documento, significa un anillo heterocíclico monocíclico o bicíclico de 3 a 10 miembros que es saturado, insaturado, no aromático o aromático que contiene hasta 4 heteroátomos. Cada heteroátomo se selecciona independientemente de entre nitrógeno, que puede cuaternizarse; oxígeno; y azufre, incluyendo sulfóxido y sulfona. El heterociclo puede unirse a través de un átomo de nitrógeno, azufre o carbono. Los heterociclos representativos incluyen: piridilo, furilo, tiofenilo, pirrolilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, morfolinilo, pirrolidinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hindatoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, quinolinilo, -isoquinolinilo, -cromonilo, -cumarinilo, -indolilo, -inolinilo, -benzo[b]furanilo, -benzo[b]tiofenilo, -indazolilo, -purinilo, -4H-quinolinilo, -isoquinolilo, -quinolilo -ftalazinilo, -naftiridinilo, -carbazolilo y similares. El término heterociclo también incluye heteroarilos.

El término «arilo» como se usa en este documento por sí mismo o parte de otro grupo, se refiere a sistemas de anillos monocíclicos y aromáticos bicíclicos que tiene típicamente de seis a catorce átomos de carbono (es decir, arilo C₆-C₁₄) tales como fenilo, 1-naftilo y similares.

5

La expresión «arilo sustituido» como se usa en este documento se refiere a un arilo como se define anteriormente que tiene uno o más sustitutos que incluyen halógeno (F, Cl, Br, I) o alcoxi.

El término «aralquilo» como se usa en este documento por sí mismo o parte de otro grupo se refiere a un alquilo como se define anteriormente que tiene uno o más sustituyentes arilo. Los grupos aralquilo ejemplares no limitantes incluyen bencilo, feniletilo, difenilmetilo y similares.

10

El término «alcoxi» como se usa en este documento por sí mismo o parte de otro grupo se refiere a un alquilo unido a un átomo de oxígeno terminal. Los grupos alcoxi ejemplares no limitantes incluyen metoxi, etoxi y similares.

15

El término «alcano» como se usa en este documento significa un hidrocarburo saturado no cíclico de cadena lineal o ramificada. Los alcanos de cadena lineal representativos incluyen -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo. Los alcanos ramificados representativos incluyen -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, -neopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 3-etilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-metilhexilo, 2-metilhexilo, 3-metilhexilo, 4-metilhexilo, 5-metilhexilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,2-dimetilhexilo, 1,3-dimetilhexilo, 3,3-dimetilhexilo, 1,2-dimetilheptilo, 1,3-dimetilheptilo y 3,3-dimetilheptilo.

20

El término «alqueno» como se usa en este documento significa un hidrocarburo no cíclico de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. El alqueno representativo de cadena lineal y ramificado incluye -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutileno, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, -1-hexenilo, -2-hexenilo, -3-hexenilo, -1-heptenilo, -2-heptenilo, -3-heptenilo, -1-octenilo, -2-octenilo, -3-octenilo, -1-nonenilo, -2-nonenilo, -3-nonenilo, -1-decenilo, -2-decenilo, -3-decenilo y similares.

25

El término «cicloalcano», como se usa en este documento, significa un hidrocarburo cíclico saturado que tiene de 3 a 15 átomos de carbono. Los cicloalcanos representativos son ciclopropilo, ciclopentilo y similares.

35

El término «alquilcicloalqueno», como se usa en este documento por sí mismo o parte de otro grupo, se refiere a un alquilo como se define anteriormente unido a un cicloalcano como se define anteriormente.

El término «cicloalqueno» como se usa en este documento significa que se refiere a un hidrocarburo no aromático monocíclico que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono en el sistema cíclico y de 5 a 15 átomos de carbono. Los cicloalquenos representativos incluyen -ciclopentenilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexenilo, -ciclohexadienilo, -cicloheptenilo, -cicloheptadienilo, -cicloheptatrienilo, -ciclooctenilo, -ciclooctadienilo, -ciclooctatrienilo, -ciclooctatetraenilo, -ciclononenilo -ciclononadienilo, -ciclodecenilo, -ciclodecadienilo y similares. El término «cicloalqueno» también incluye bicicloalquenos y tricicloalquenos. El término «bicicloalqueno» como se usa en este documento significa un sistema de anillo de hidrocarburo bicíclico que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono en uno de los anillos y de 8 a 15 átomos de carbono. Los bicicloalquenos representativos incluyen, pero no se limitan a, -indenilo, -pentalenilo, -naftalenilo, -azulenilo, -heptalenilo, -1,2,7,8-tetrahidronaftalenilo y similares. El término «tricicloalqueno», como se usa en este documento, significa un sistema de anillo de hidrocarburo tricíclico que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono en uno de los anillos y de 8 a 15 átomos de carbono. Los tricicloalcanos representativos incluyen, pero no se limitan a, -antraceno, -fenantreno, -fenalenilo y similares.

40

45

50

La expresión «anillo aromático», como se usa en este documento, significa un anillo carbocíclico aromático de 5 a 14 miembros, que incluye sistemas de anillos mono, bicíclicos y tricíclicos. Los anillos aromáticos representativos son fenilo, naftilo, antrilo y fenantrilo.

El término «oxo», como se usa en este documento, significa un doble enlace al oxígeno. es decir, C=O.

El término «monosacárido», como se usa en este documento, significa cualquiera de los azúcares simples que sirven como bloques de construcción para los carbohidratos. Ejemplos de monosacáridos incluyen glucosa, fucosa, galactosa y manosa.

55

60

El término «hidroxilo», como se usa en este documento, se refiere a un grupo funcional compuesto por un oxígeno unido a un hidrógeno, con el oxígeno unido covalentemente a otro átomo, por ejemplo, un carbono. Un «glicolípido protegido con hidroxilo» de la invención incluye un glicolípido, por ejemplo, un glicolípido sintético, que tiene un grupo hidroxilo acoplado a un grupo de protección.

Los glicolípidos modificados de la invención se han modificado para comprender un grupo funcional que puede formar un enlace covalente estable a una proteína (por ejemplo, CD1d). Cuando la proteína es CD1d y el glicolípido modificado es un glicolípido de tipo ceramida, un «complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida modificado estable» es uno donde el glicolípido de tipo ceramida modificado se une covalentemente a CD1d y el complejo es capaz de conservar una actividad estimulante significativa de las células T citotóxicas naturales (NKT) o el glicolípido de tipo ceramida permanece asociado con CD1d en una conformación detectada por un anticuerpo tal como L363 que es específico para un complejo biológicamente funcional después de una incubación *in vitro* (Yu y col. (2007) J Immunol Methods 323:11-23). En algunas realizaciones, un complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida modificado conserva al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 95 %, o más actividad estimulante de células NKT o complejo funcional detectado por un anticuerpo tal como L363 después de aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 1 semana o más de incubación *in vitro*. En algunas de estas realizaciones, la incubación *in vitro* se produce a temperatura ambiente. En realizaciones particulares, la incubación *in vitro* se produce en una solución salina tamponada (por ejemplo, PBS + Triton X-100 al 0,05 %). En determinadas realizaciones, un glicolípido de tipo ceramida modificado se une covalentemente a CD1d y el complejo es capaz de conservar al menos aproximadamente el 75 % de la actividad estimulante de las células NKT después de una incubación *in vitro* a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 o aproximadamente 3 días.

El glicolípido modificado es capaz de asociarse físicamente con una proteína, por ejemplo, CD1d, a través de interacciones covalentes. El «complejo de glicolípido modificado» o el «complejo de glicolípido/proteína modificado», como se menciona en este documento, incluye glicolípidos modificados que están asociados físicamente con una proteína, tal como la CD1d. Como se usa en este documento, la expresión «asociado físicamente» se refiere a una interacción entre dos moléculas donde las dos moléculas están unidas entre sí directa o indirectamente (por ejemplo, a través de moléculas intermedias) a través de interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas). En la invención, el complejo de glicolípido/proteína modificado comprende una glicoproteína modificada que se une covalentemente a la proteína a través del grupo funcional de la glicoproteína modificada que permite la interacción covalente (el grupo benzofenona). Los glicolípidos modificados de la invención pueden asociarse físicamente con (unirse covalentemente a) cualquier proteína. En algunas realizaciones, el glicolípido modificado está asociado físicamente con (unido covalentemente a) CD1d. Un complejo de glicolípido/proteína modificado donde la proteína es CD1d se denomina en este documento un «complejo de glicolípido /CD1d modificado».

Como se usa en este documento, el término «proteína CD1d» abarca una proteína CD1d de longitud completa, fragmentos o variantes de la misma que son capaces de unirse a un glicolípido y β 2-microglobulina o un fragmento o variante de los mismos. La molécula CD1d es un miembro de la familia de las glicoproteínas similares a antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad que se asocian con β 2-microglobulina y se expresan en la superficie de los timocitos corticales, células B, células dendríticas, células de Langerhans en la piel, y células epiteliales gastrointestinales. CD1d se expresa principalmente en células dendríticas o células epiteliales del tracto gastrointestinal. Los miembros de la familia CD1 participan en la presentación de glicolípidos como antígenos. En particular, la CD1d regula el tono de las citoquinas mediante la activación de un subconjunto distinto de linfocitos T, a saber, las células T NK1 que secretan IL-4 e INF- γ . Todas las glicoproteínas CD1 han sido clonadas y analizadas. Para un análisis detallado de las glicoproteínas CD1, y en particular de CD1d, véase, por ejemplo, Balk y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:252-256 (1989); Kojo y col., Biochem. Biophys. Res. Comm. 276:107-111 (2000); Kojo y col., J. Rheumatology 30:2524-2528 (2003); Kang y Cresswell, Nature Immunology 5:175-181 (2004); Im y col., J. Biol. Chem. 279:299-310 (2004); Dutronc y Porcelli, Tissue Antigens 60:337-353 (2002).

El CD1d de longitud completa consiste en una secuencia señal, un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. El polipéptido CD1d de longitud completa tiene 335 aminoácidos de longitud.

La secuencia CD1d humana es conocida en la técnica y tiene el número de acceso NP_001757 en Genbank, que se expone en la SEQ ID NO: 1.

Una variante de CD1d humana incluye, pero no se limita a, un polipéptido con la siguiente mutación: T64S.

La secuencia de CD1d de ratón se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: NP_031665.

5 La secuencia de CD1d de rata se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: NP_058775. La secuencia de CD1d de oveja se puede encontrar en Genbank con los siguientes números de acceso: O62848 y Q29422. La secuencia de CD1d de chimpancé se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: NP_001065272. La secuencia de CD1d de conejo se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: P23043.

10

El dominio extracelular de CD1d consiste en tres dominios: el dominio $\alpha 1$, el dominio $\alpha 2$ y el dominio $\alpha 3$. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ comprenden los sitios de unión a antígeno. El dominio $\alpha 3$ incluye un sitio de asociación a $\beta 2$ -microglobulina.

15 Las designaciones de dominios CD1d usadas en este documento se definen como en la Tabla 2.

Tabla 2. Dominios CD1d

Dominio	CD1d (humana)
Secuencia señal	1-19
Extracelular	20-301
Dominio $\alpha 1$	20-108
Dominio $\alpha 2$	109-201
Dominio $\alpha 3$	202-295
Transmembrana	302-322
Citoplásmico	323-335

Como apreciarán los expertos en la materia, los residuos iniciales y finales de los dominios enumerados anteriormente pueden variar dependiendo del programa de modelado por computadora usado o el procedimiento usado para determinar el dominio.

Algunas realizaciones de la invención proporcionan un complejo de glicolípido/CD1d modificado, que comprende un polipéptido CD1d soluble. La Tabla 1 anterior describe los diversos dominios del polipéptido CD1d. Los polipéptidos CD1d solubles generalmente comprenden una parte o la totalidad del dominio extracelular de los polipéptidos, incluidos los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Los polipéptidos CD1d solubles generalmente carecen de parte o de la totalidad del dominio transmembrana y del dominio citoplásmico. Como apreciará un experto en la materia, el dominio extracelular completo de CD1d puede comprender aminoácidos adicionales o menos en el extremo C-terminal o N-terminal del polipéptido del dominio extracelular.

30

Los polipéptidos CD1d para su uso en los procedimientos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido CD1d que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, a excepción de hasta veinte sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de referencia se selecciona de entre el grupo que consiste en los aminoácidos a a 295 de la SEQ ID NO:1, los aminoácidos 21 a b de la SEQ ID NO:1 y a a b de la SEQ ID NO:1, donde a es cualquier número entero de 1 a 100, y b es cualquier número entero de 201 a 301, y donde el polipéptido CD1d se asocia con la $\beta 2$ -microglobulina y se une a un glicolípido de tipo ceramida. En una realización, el polipéptido CD1d soluble comprende los aminoácidos 21 a 295 de la SEQ ID NO:1. En otra realización, el polipéptido CD1d soluble comprende los aminoácidos 20-295, 20-296, 20-297, 20-298, 20-299, 20-300 y 20 a 301 de la SEQ ID NO:1.

40

Para los objetivos de los procedimientos y composiciones actualmente descritos, en aquellas realizaciones donde el complejo de glicolípido/proteína modificado comprende una proteína CD1d, el complejo comprende además una $\beta 2$ -microglobulina asociada físicamente (por ejemplo, unida covalentemente) con la proteína CD1d. En algunas de estas realizaciones, la $\beta 2$ -microglobulina está unida covalentemente al extremo amino de CD1d.

45

En determinadas realizaciones, un complejo CD1d de la invención comprende un polipéptido $\beta 2$ -microglobulina, que se asocia con un polipéptido o fragmento de polipéptido CD1d soluble. $\beta 2$ -microglobulina está presente en la superficie de todas las células nucleadas como la subunidad pequeña extracelular de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y participa activamente en la respuesta inmunitaria. Para un análisis detallado de la $\beta 2$ -microglobulina, véase, por ejemplo, Peterson y col., Adv. Cancer Res. 24:115-163 (1977); Sege y col., Biochemistry 20:4523-4530 (1981).

50

La β_2 -microglobulina de longitud completa es una proteína secretada que comprende una secuencia señal y dominio similar a Ig. El polipéptido CD1d de longitud completa tiene 119 aminoácidos de longitud.

5 La secuencia de β_2 -microglobulina humana es conocida en la técnica y tiene el número de acceso NP_004039 en Genbank, que se expone en la SEQ ID NO: 2.

Las variantes de β_2 -microglobulina humana incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos con una o más de las siguientes mutaciones: A20G, P52Q, S55V y Y86YS.

10

La secuencia de β_2 -microglobulina de ratón se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: NP_033865. La secuencia de β_2 -microglobulina de cerdo se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: NP_999143. La secuencia de β_2 -microglobulina de rata se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: NP_036644. La secuencia de β_2 -microglobulina de chimpancé se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: NP_001009066. La secuencia de β_2 -microglobulina de conejo se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: P01885. La secuencia de β_2 -microglobulina de oveja se puede encontrar en Genbank con el siguiente número de acceso: NP_001009284.

15

Las designaciones de dominios β_2 -microglobulina usadas en este documento se definen como en la Tabla 3.

20

Tabla 3. Dominios de β_2 -microglobulina

Dominio	β_2-microglobulina (humana)
Secuencia señal	1-20
β_2 -microglobulina	21-119
Dominio Ig	25-113 22-116

25

Como apreciarán los expertos en la materia, los residuos iniciales y finales de los dominios enumerados anteriormente pueden variar dependiendo del programa de modelado por computadora usado o el procedimiento usado para determinar el dominio.

30

Los complejos de glicolípidos/CD1d modificados de la invención pueden comprender fragmentos, variantes o derivados de los mismos de un polipéptido de β_2 -microglobulina. La Tabla 3 anterior describe los diversos dominios del polipéptido de β_2 -microglobulina. Los polipéptidos de β_2 -microglobulina generalmente comprenden una parte o la totalidad de la parte secretada de los polipéptidos.

35

Los polipéptidos de β_2 -microglobulina humana para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido de β_2 -microglobulina que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de referencia (por ejemplo, la SEQ ID NO: 2) a excepción de hasta veinte sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de referencia se selecciona de entre el grupo que consiste en los aminoácidos a a 119 de la SEQ ID NO:2, los aminoácidos 21 a b de la SEQ ID NO: 2, y los a a b de la SEQ ID NO:2, donde a es cualquier número entero de 15 a 25, y b es cualquier número entero de 100 a 119, donde dicho polipéptido de β_2 -microglobulina se asocia con CD1d y apoya la unión de glicolípidos de tipo ceramida. En una realización, el polipéptido β_2 -microglobulina comprende los aminoácidos 21 a 40 113 de la SEQ ID NO:2. En una realización, el polipéptido β_2 -microglobulina comprende los aminoácidos 21 a 119 de la SEQ ID NO:2.

45

Por «una secuencia de aminoácidos de referencia» se entiende la secuencia especificada sin la introducción de sustituciones de aminoácidos. Como entenderá un experto en la materia, si no hay sustituciones, el «polipéptido aislado» de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia.

50

Los polipéptidos CD1d o β_2 -microglobulina descritos en este documento pueden tener diversas alteraciones, tales como sustituciones, inserciones o deleciones. Los aminoácidos ejemplares que pueden estar sustituidos en el polipéptido incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, 55 triptófano, histidina).

También se contemplan los fragmentos correspondientes de polipéptidos CD1d o β_2 -microglobulina al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idénticos a los polipéptidos y polipéptidos de referencia descritos en este documento.

5 Como se conoce en la técnica, la «identidad de secuencia» entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Cuando se analiza en este documento, si un polipéptido en particular es al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntico a otro polipéptido puede determinarse usando procedimientos y programas informáticos/software conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package,
10 versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95 % idéntica a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros se ajustan, por supuesto, de tal
15 forma que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de polipéptido de referencia y se permiten los huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Un polipéptido CD1d soluble puede contener algunos o la totalidad de los aminoácidos del dominio transmembrana,
20 siempre que el polipéptido aún sea capaz de permanecer soluble en una solución acuosa, por ejemplo, una solución fisiológica. Preferentemente, no más de aproximadamente 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, y preferentemente no se incluirá ninguno de los aminoácidos del dominio transmembrana.

Además, los fragmentos de β_2 -microglobulina son útiles en la presente invención. Para ser útil en la presente
25 invención, el fragmento de β_2 -microglobulina tendría que conservar la capacidad de asociarse con la molécula CD1d. Preferentemente, no más de aproximadamente 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, y preferentemente no se eliminará ninguno de los aminoácidos de β_2 -microglobulina.

Uno puede desear introducir un pequeño número de aminoácidos en el extremo polipeptídico del polipéptido CD1d
30 soluble o del polipéptido de β_2 -microglobulina, por lo general no más de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1. La delección o inserción de aminoácidos generalmente será como resultado de las necesidades de la construcción, proporcionando sitios de restricción convenientes, además del procesamiento de señales, la facilidad de manipulación, la mejora de los niveles de expresión o similares. Además, uno puede desear sustituir uno o más aminoácidos con un aminoácido diferente por razones similares, generalmente no sustituyendo más de
35 aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos en cualquier dominio.

La CD1d y la β_2 -microglobulina puede ser autóloga para cualquier especie de mamífero o aviar, por ejemplo, primates (especialmente seres humanos), roedores, conejos, equinos, bovinos, caninos, felinos, etc. La β_2 -
40 microglobulina típicamente no es inflamatoria *in vivo*. Sin embargo, es preferible emplear la β_2 -microglobulina derivada de la misma especie que se administrará el complejo de glicolípido/CD1d modificado para reducir el riesgo de una respuesta inmunológica xenogénica.

El polipéptido CD1d soluble y el polipéptido de β_2 -microglobulina pueden producirse por separado y se deja que se
45 asocien para formar un complejo de heterodúplex estable, o ambas de las subunidades se pueden expresar en una única célula.

Los polipéptidos CD1d solubles y los polipéptidos de β_2 -microglobulina para su uso en los procedimientos y composiciones de la presente invención pueden aislarse de una multiplicidad de células, por ejemplo, líneas
50 celulares transformadas JY, BM92, WIN, MOC y MG, y CHO usando una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia. También es posible construir una molécula de fusión funcional en la que el extremo carboxilo de β_2 -microglobulina o un fragmento de la misma está conectado a través de un enlazador al extremo amino de CD1d o un fragmento de la misma.

Además, se conocen las secuencias de aminoácidos de CD1d y β_2 -microglobulina de una diversidad de especies, y
55 los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos se han clonado, por lo tanto, los polipéptidos pueden prepararse usando procedimientos recombinantes. Las regiones codificantes para las cadenas de CD1d y β_2 -microglobulina o sus productos de fusión se insertan en vectores de expresión, expresados por separado en un huésped adecuado, tal como *E. coli*, levadura, células de insectos, células de mamíferos u otras células adecuadas.

60 El término «vacuna» se refiere a una composición, que cuando se administra a un animal es útil para estimular una

respuesta inmunitaria, por ejemplo, contra un antígeno, por ejemplo, un antígeno heterólogo. Como se usa en este documento, un antígeno «heterólogo» es un antígeno que se origina a partir de una especie extraña o, si es de la misma especie, se modifica sustancialmente de su forma nativa en su composición por intervención humana deliberada.

5

En determinadas realizaciones, un complejo de glicolípido modificado puede administrarse con un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento. En otras realizaciones, un complejo de glicolípido/proteína modificado de la invención se usa como un «vehículo de antígeno» para el suministro de un antígeno heterólogo, por ejemplo, un polipéptido inmunogénico, o una molécula de direccionamiento. Por ejemplo, un complejo de glicolípido/proteína modificado se puede usar como un vehículo de antígeno para el suministro de antígenos de otro patógeno (por ejemplo, bacterianos (por ejemplo, antígenos de *Salmonella*, *Listeria*, *Bacillus anthracis* y *Shigella*), hongos, parásitos (por ejemplo, un antígeno malarial de *Plasmodium*), o antígenos virales (por ejemplo, un antígeno viral de VIH, SIV, VPH, VSR, influenza o hepatitis (VHA, VHB y VHC) o antígenos específicos de tumores.

15 Las composiciones de la invención incluyen células (por ejemplo, células virales, fúngicas, bacterianas) asociadas físicamente con un glicolípido modificado. Como se describe en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 2010/0183549, los glicolípidos, tales como los glicolípidos de tipo ceramida, pueden asociarse físicamente con células bacterianas mediante el cultivo de las células bacterianas con el glicolípido. Así, en algunas realizaciones, el glicolípido modificado puede asociarse físicamente con una célula bacteriana cultivando primero la célula bacteriana con un glicolípido modificado que comprende un grupo fotorreactivo para permitir la asociación del glicolípido modificado con la pared celular de la célula bacteriana, seguido de irradiación con una fuente de luz (por ejemplo, luz ultravioleta) para permitir el enlace covalente del glicolípido modificado a la superficie de la célula bacteriana.

En algunas realizaciones, los complejos de glicolípidos/proteínas modificados de la invención comprenden una molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo, que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo monoclonal, quimérico, humanizado, humano, bifuncional, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como, por ejemplo, las porciones Fab y F(ab')₂ y los fragmentos Fv, y los anticuerpos de cadena única) que sirven para dirigir el complejo a una célula, tejido, órgano o región particular del cuerpo de un sujeto. En algunas de estas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno diana, tal como un marcador de superficie celular, como se enseña en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 2006/0269540. La proteína (CD1d) puede unirse directamente o fusionarse a la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo), ya sea directamente o a través de una secuencia de enlace o molécula. En determinadas realizaciones, la proteína (CD1d) está unida a la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento del mismo) a través de un compuesto multivalente.

La molécula de direccionamiento puede estar unida a la molécula CD1d o a la microglobulina β₂. En aquellas realizaciones donde la molécula de direccionamiento es un anticuerpo, la proteína (por ejemplo, CD1d o β₂-microglobulina) puede unirse a la cadena ligera o a la cadena pesada del anticuerpo. Como lo enseña la publicación de solicitud internacional n.º WO 9964597 es posible introducir mutaciones en la β₂-microglobulina que aumentan la afinidad por la cadena pesada de clase I para facilitar el ensamblaje y aumentar la estabilidad de la proteína de fusión.

La proteína (por ejemplo, CD1d o β₂-microglobulina) puede estar unida al extremo carboxilo o amino del anticuerpo, o puede estar unida al anticuerpo en un sitio distinto de los extremos carboxilo o amino. Donde CD1d es la proteína dentro del complejo de glicolípido/proteína modificado, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse al extremo carboxilo de CD1d. En algunas de estas realizaciones, el extremo amino de un fragmento Fv de una sola cadena (scFv) está unido al extremo carboxilo de CD1d.

50 En una realización, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para un marcador de superficie celular de una célula tumoral. En algunas realizaciones de la presente invención, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, carcinoma de colon, cáncer de hígado y conductos biliares intrahepáticos, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de la laringe, cáncer de mama, melanoma maligno, mieloma múltiple, sarcomas, rhabdomyosarcoma, linfomas, linfoma no Hodgkin folicular, leucemias, leucemias de células T y B, linfoma de Hodgkin, linfoma de células B, cáncer de ovario, cáncer del útero, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer genital, cáncer renal, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, plasmocitoma o cáncer cerebral.

60 Los antígenos asociados a tumores comprenden antígenos pancarcinoma como CEA (Sundblad Hum. Pathol. 27,

(1996) 297-301, Llantzis Lab. Invest. 76 (1997), 703-16), EGFR tipo I (Nouri, Int. J. Mol. Med. 6 (2000), 495-500) y EpCAM (17-1A/KSA/GA733-2, Balzar J. Mol. Med. 77 (1999), 699-712). EGFR tipo I está especialmente sobreexpresado en glioma y EpCAM en el carcinoma de colon. El EGFR tipo II (Her-2/neu, ERBB2_Sugano Int. J. Cancer 89 (2000), 329-36) y la glicoproteína TAG-72 (antígeno sTn, Kathan Arch. Pathol. Lab. Med. 124 (2000), 234-5) están regulados positivamente en el cáncer de mama. El neoepítipo de delección de EGFR también podría desempeñar un papel como antígeno asociado a tumor (Sampson Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97 (2000), 7503-8). Los antígenos A33 (Ritter Biochem. Biophys. Res. Commun. 236 (1997), 682-6), Lewis-Y (DiCarlo Oncol. Rep. 8 (2001), 387-92), Cora Antigen (molécula de adhesión celular relacionada con CEA CEACAM 6, CD66c, NCA-90, Kinugasa Int. J. Cancer 76 (1998), 148-53) y MUC-1 (Mucin) están asociados con el carcinoma de colon (Iida Oncol. Res. 10 (1998), 407-14). El antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF, Gal1B-3GalNAc1-0-Thr/Ser) no solo se encuentra en el carcinoma de colon (Baldus Cancer 82 (1998), 1019-27) sino también en el cáncer de mama (Glinsky Cancer. Res. 60 (2000), 2584-8). Se ha descrito la sobreexpresión de Ly-6 (Eshel J. Biol. Chem. 275 (2000), 12833-40) y la desmogleína 4 en el cáncer de cabeza y cuello y del neoepítipo E-cadherina en el carcinoma gástrico (Fukudome Int. J. Cancer 88 (2000), 579-83). El antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA, Lapidus Prostate 45 (2000), 350-4), el antígeno de células madre de la próstata (PSCA, Gu Oncogene 191 (2000) 288-96) y STEAP (Hubert, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 96 (1999), 14523-8) están asociados con el cáncer de próstata. Las subunidades alfa y gamma del receptor de acetilcolina de tipo fetal (AChR) son marcadores inmunohistoquímicos específicos para el rhabdomyosarcoma (RMS, Gattenlohner Diagn. Mol. Pathol. 3 (1998), 129-34).

20 Se ha descrito la asociación del CD20 con el linfoma folicular no Hodgkin (Yatabe Blood 95 (2000), 2253-61, Vose Oncology (Huntingt) 2 (2001) 141-7), del CD19 con el linfoma de células B (Kroft Am. J. Clin. Pathol. 115 (2001), 385-95), del antígeno de células plasmáticas Wue-1 con el mieloma múltiple (Greiner Virchows Arch 437 (2000), 372-9), del CD22 con la leucemia de células B (d'Arena Am. J. Hematol. 64 (2000), 275-81), del CD7 con la leucemia de células T (Porwit-MacDonald Leukemia 14 (2000), 816-25) y del CD25 con determinadas leucemias de células T y B (Wu Arch. Pathol. Lab. Med. 124 (2000), 1710-3). El CD30 se asocia con el linfoma de Hodgkin (Mir Blood 96 (2000), 4307-12). La expresión del melanoma proteoglicano condroitina sulfato (MCSP, Eisenmann Nat. Cell. Biol. 8 (1999), 507-13) y el gangliósido GD3 se observa en el melanoma (Welte Exp Dermatol 2 (1997), 64-9), mientras que el GD3 también es encontrado en el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, Brezicka Lung Cancer 1 (2000), 29-36). La expresión del gangliósido GD2 también está regulada positivamente en el SCLC y en el neuroblastoma (Cheresh y col. Cancer Res. 10 (1986), 5112-8). El carcinoma de ovario está asociado con el receptor tipo II de la sustancia inhibitoria de Mueller (MIS) (Masiakos Clin. Cancer Res. 11 (1999), 3488-99) y el carcinoma renal así como el cervical con la expresión de carboanhidrasa 9 (MN/CAIX, Grabmaier Int. J. Cancer 85 (2000) 865-70). Se encontraron niveles elevados de expresión de CA 19-9 en el cáncer de páncreas (Nazli Hepatogastroenterology 47 35 (2000), 1750-2).

Otros ejemplos de antígenos de superficie de células tumorales son el Her2/neu, expresados en carcinomas de mama y ovario (Zhang, H. y col., Experimental & Molecular Pathology 67: 15-25 (1999)); el CM-1, expresado en el cáncer de mama (Chen, L. y col., Acta Academiae Medicinae Sinicae 19 (2): 150-3); el 28K2, expresado en el adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma de células grandes (Yoshinari, K. y col., Lung Cancer 25: 95-103 (1999)); el E48 y el U36 expresados en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Van Dongen, GAMS y col., Anticancer Res. 16:2409-14 (1996)); el NY-ESO-1, expresado en el carcinoma de esófago, y el melanoma Jager, E. y col., J. Exp. Med. 187:265-70 (1998); Jager, E. y col., International J. Cancer 84:506-10 (1999)); el KU-BL 1-5, expresado en el carcinoma de vejiga (Ito, K. y col., Reunión Anual AUA 2000, Abstract 3291 (2000)); el NY CO 1-48, expresado en el carcinoma de colon (Scanlan, MJ y col., International J. Cancer 76:652-8 (1998)); el HOM MEL 40, expresado en el melanoma (Tureci, O. y col., Cancer Res. 56:4766-72 (1996)); el OV569, expresado en el carcinoma de ovario (Scholler, N. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 96:11531-6 (1999)); el ChCE7, expresado en el neuroblastoma y el carcinoma de células renales (Meli, ML y col., International J. Cancer 83:401-8 (1999)); el CA19-9, expresado en el carcinoma de colon (Han, JS y col., Cancer 76:195-200 (1995)); el CA125, expresado en el carcinoma de ovario (O'Brien, TJ y col., International J. Biological Markers 13:188-95 (1998)); y los gangliósidos (GM2, GD2, 9-o-acetil-GD3, GD3), expresados en el melanoma y el neuroblastoma (Zhang, S. y col., Cancer Immunol. Immunotherapy 40:88-94 (1995)).

En realizaciones particulares de los procedimientos descritos actualmente, el antígeno asociado a tumor se 55 selecciona de entre el grupo que consiste en Lewis Y, CEA, Muc-1, erbB-2, -3 y -4, Ep-CAM, neoepítipo E-cadherina, receptor EGF (por ejemplo, EGFR tipo I o EGFR tipo II), neoepítipo de delección EGFR, CA19-9, Muc-1, LeY, antígeno TF, Tn y sTn, TAG-72, PSMA, STEAP, Cora antigen, CD7, CD19 y CD20, CD22, CD25, Ig-a e Ig-B, A33 y G250, CD30, MCSP y gp100, CD44-v6, MT-MMPS, receptor tipo II (MIS), carboanhidrasa 9, antígeno F19, Ly6, desmogleína 4, PSCA, antígenos Wue-1, TM4SF (CD63, L6, CO-29, SAS), la subunidad alfa y gamma del 60 receptor de acetilcolina de tipo fetal (AChR), CM-1, 28K2, E48, U36, NY -ESO-1, KU-BL 1-5, NY CO 1-48, HOM

MEL 40, OV569, ChCE7, CA19-9, CA125, GM2, GD2, 9-o-acetil-GD3 y GD3.

En otra realización, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para un marcador de superficie celular de células NKT restringidas a CD1d. Ejemplos no limitantes de marcadores de células NKT adecuados a los que se dirigen los anticuerpos específicos son CD161, CD56 o (para subconjuntos de NKT) CCR4 en NKT restringidas a CD4+ CD1d o CCR1 o CCR6 en NKT restringidas a CD1d doble negativas (CD4 y CD8 negativo). Esto es particularmente útil en el tratamiento de enfermedades o síntomas que son el resultado de una baja actividad de NKT, tales como el cáncer o la infección. Además, dado que la actividad de las células NKT se modula de manera diferencial dependiendo del glicolípido de tipo ceramida particular unido a CD1d (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.772.380,), las composiciones de la presente descripción incluyen aspectos con asociación selectiva de CD1d con estos glicolípidos de tipo ceramidas funcionalmente diferentes y las α -glicosilceramidas relacionadas que pueden modular enfermedades que son el resultado de una actividad NKT alta o perjudicial (por ejemplo, una actividad Th1 excesiva) tal como miastenia gravis (Reinhardt y col. *Neurology* 52:1485-87,1999), psoriasis (Bonish, J. *Immunol.* 165:4076-85,2000), colitis ulcerosa (Saubermann y col. *Gastroenterology* 119:119-128, 2000), y cirrosis biliar primaria (Kita y col. *Gastroenterology* 123:1031-43,2002).

En otra realización, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para un marcador de superficie celular de un tejido diana de enfermedad autoinmunitaria o respuesta inflamatoria. En una realización preferida, el complejo de glicolípido/CD1d modificado se dirige a dichos sitios mediante el acoplamiento del complejo a una molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) específico para un antígeno de tejido local. El complejo de glicolípido/CD1d modificado, concentrado en las células de tejido local, conducirá al reclutamiento y activación de las células NKT restringidas a CD1d y desencadenará una cascada de eventos que regulan la respuesta autoinmunitaria o inflamatoria. Los antígenos de tejido específico relevantes pueden ser diferentes para diferentes enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.

En el caso de las enfermedades desmielinizantes que incluyen, especialmente, la esclerosis múltiple, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para MBP (proteína básica de mielina), PLP (proteína proteolípida de mielina) o MOG (glicoproteína mielínica de oligodendrocito). En realizaciones particulares, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para MOG.

En el caso de la diabetes tipo I de inicio juvenil que se deriva de la destrucción de las células beta del islote pancreático productor de insulina, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para los antígenos diana de las células beta del islote, tal como el gangliósido GT3, la IGRP (proteína relacionada con la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes), o SUR1 (Proks P y col., *Diabetes*: 51 Suppl 3:S368-76, 2002). Recientemente, las células de Schwann del peri-islote han sido descritas como una diana temprana de destrucción autoinmunitaria en esta enfermedad (Winer S y col: *Nature Medicine* 9:198-205, 2003). Por lo tanto, en otra realización preferida de la invención, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de antígenos específicos de células de Schwann y S100beta para el tratamiento o diagnóstico de la diabetes tipo I de inicio juvenil.

En otras realizaciones de los procedimientos descritos actualmente para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, se inyectan conjugados que comprenden complejos de glicolípidos/CD1d modificados y moléculas de direccionamiento (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) específicos para el colágeno de tipo II en las articulaciones afectadas para el tratamiento de la artritis reumatoide; las moléculas de direccionamiento específicas para la tiroglobulina o el receptor de TSH se dirigen a la tiroides para el tratamiento de la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Graves; y las moléculas de direccionamiento específicas para la K+/H+ ATPasa se emplean para el tratamiento de la anemia perniciosa o la gastritis atrófica (dirigida a las células parietales gástricas).

En otras realizaciones, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para un marcador de superficie celular de una célula o tejido infectado. En una realización preferida, un complejo de glicolípido/CD1d modificado se dirige al sitio de infección mediante el acoplamiento del complejo a una molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) específico para un antígeno codificado por el agente infeccioso. Los antígenos relevantes son diferentes en el caso de diferentes agentes infecciosos. En realizaciones particulares de los procedimientos descritos actualmente, el marcador de superficie para una célula infectada se selecciona de entre el grupo que consiste en

antígenos de envoltura viral, por ejemplo, de retrovirus humanos (HTLV I y II, VIH1 y 2) o virus del herpes humano (HSV1 y 2, CMV, EBV), hemaglutinina, por ejemplo, del virus de la influenza (influenza A, B o C), las glicoproteínas E1 y E2 del virus de la rubeola o el RGP del virus de la rabia.

- 5 En otras realizaciones, la molécula de direccionamiento es específica para antígenos codificados por otros virus infecciosos, bacterias, hongos, protozoos o helmintos.

En una realización, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para un marcador de superficie celular de una célula presentadora de antígeno profesional. En algunas de estas realizaciones, la molécula de direccionamiento es específica para un marcador de superficie celular de una célula dendrítica, por ejemplo, CD83, DEC205, CMRF-44 (Fearnley DB y col. Blood 89:3708-16,1997), CMRF-56 (Hock BD y col. Tissue Antigens 53:320-34,1999), BDCA-1, BDCA-2, BDCA-3 y BDCA-4 (Dzionek A y col. J. Immunol. 165:6037-6046,2000). En otras realizaciones, la molécula de direccionamiento es específica para marcadores de células presentadoras de antígeno que incluyen receptores tipo Toll (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9), el receptor de manosa y lectina de unión a manano (MBL); así como marcadores adicionales específicos para células dendríticas, incluidos DC-SIGN (la lectina de tipo C, no integrina, el receptor de ICAM-3 en DC), ALCAM, DC-LAMP y cualquiera de una serie de otros receptores para células apoptóticas que incluyen el receptor de fosfatidilserina. La molécula de direccionamiento puede ser específica para un marcador de superficie celular de otra célula presentadora de antígeno profesional, tal como una célula B o un macrófago. CD19, CD20 y CD22 se expresan en células B, y se han descrito otros marcadores para otras células presentadoras de antígenos.

En otras realizaciones, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) es específica para un marcador de superficie celular de un subconjunto de células dendríticas. En una realización particular de la invención, un complejo de glicolípido/CD1d modificado se dirige a las DC mediante el acoplamiento del complejo a una molécula de direccionamiento específica para un marcador de antígeno de superficie de DC tal como CD83, DEC205, CMRF-44, CMRF-56, DC-SIGN, receptores tipo Toll (TLR) que incluyen TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9, el receptor de manosa, la lectina de unión a manano (MBL), ALCAM, DC-LAMP, el receptor de fosfatidilserina, BDCA-1, BDCA-2, BDCA-3 o BDCA-4 (neuropilina, Tordjman R y col. Nature Immunol. 3:477-82, 2002).

El término «antígeno» y el término relacionado «antigénico» como se usa en este documento se refieren a una sustancia que se une específicamente a un anticuerpo o a un receptor de células T.

35 El término «inmunógeno» y el término relacionado «inmunogénico» como se usa en este documento se refieren a la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria, que incluye un anticuerpo y/o una respuesta inmunitaria celular en un animal, por ejemplo un mamífero. Es probable que un inmunógeno también sea antigénico, pero un «antígeno», debido a su tamaño o conformación, puede que no sea necesariamente un «inmunógeno». Una «composición inmunogénica» induce una respuesta inmunitaria en un sujeto, por ejemplo, anticuerpos que reconocen específicamente uno o más antígenos, contenidos dentro de esa «composición inmunogénica». En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica de la invención comprende un complejo de glicolípido/CD1d modificado y un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento.

La expresión «respuesta inmunitaria» pretende incluir una actividad de las células del sistema inmunitario en respuesta a un antígeno o inmunógeno. Dichas actividades incluyen, pero no se limitan a la producción de anticuerpos, citotoxicidad, proliferación de linfocitos, liberación de citoquinas, inflamación, fagocitosis, presentación de antígenos y similares. Una respuesta inmunitaria que es altamente específica para un antígeno o inmunógeno dado, por ejemplo, la producción de anticuerpos específicos o la producción de linfocitos T específicos se denomina en este documento una «respuesta inmunitaria adaptativa». Una respuesta inmunitaria que no es específica para un antígeno dado, por ejemplo, la liberación de citoquinas por las células NK y NKT, se denomina en este documento una «respuesta inmunitaria innata». Ejemplos de respuestas inmunitarias incluyen una respuesta de anticuerpos o una respuesta celular, por ejemplo, de célula T citotóxica o célula NKT.

Las expresiones «respuesta inmunitaria protectora» o «respuesta inmunitaria terapéutica» se refieren a una respuesta inmunitaria a un inmunógeno, que de alguna manera impide o al menos detiene parcialmente los síntomas de la enfermedad, los efectos secundarios o la progresión. Por «protector» se entiende que la respuesta inmunitaria se induce en un sujeto animal que no ha contraído una enfermedad, donde la respuesta inmunitaria alivia, reduce, modera o, en algunos casos, impide completamente los síntomas de la enfermedad si el animal contrae posteriormente o es susceptible a esa enfermedad, por ejemplo, la exposición a *M. tuberculosis*. Por «terapéutico» se entiende que la respuesta inmunitaria se induce en un sujeto animal que tiene la enfermedad, por

ejemplo, un ser humano con tuberculosis, donde la respuesta inmunitaria alivia, reduce, modera o, en algunos casos, elimina completamente los síntomas de la enfermedad. En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica en un animal, por ejemplo, un ser humano que tiene una enfermedad infecciosa o cáncer o una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.

5

La expresión «modulación de una respuesta inmunitaria» se refiere a cualquier forma en la cual una respuesta inmunitaria dada aumenta, disminuye o cambia mediante una composición o tratamiento en relación con la respuesta inmunitaria sin esa composición o tratamiento. Por ejemplo, el uso de un adyuvante, por ejemplo, un complejo de glicolípido/CD1d modificado que comprende un antígeno heterólogo o una molécula de
10 direccionamiento, para aumentar una respuesta inmunitaria a un antígeno, por ejemplo, el antígeno heterólogo, se considera modulación de esa respuesta inmunitaria. La disminución de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, la prevención de la autoinmunidad, también es una modulación. Además, cambiar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, de una respuesta TH2 primaria a una respuesta TH1 primaria o viceversa, es una modulación de una respuesta inmunitaria. La presente descripción proporciona procedimientos para modular una respuesta inmunitaria
15 administrando a un animal una composición que comprende un complejo de glicolípido/proteína modificado (por ejemplo, un complejo de glicolípido/CD1d modificado) y un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento.

La presente invención proporciona composiciones útiles para mejorar las respuestas inmunitarias tanto primarias como secundarias. En un aspecto, la respuesta inmunitarias primaria y/o secundaria es contra un antígeno
20 heterólogo o una molécula de direccionamiento que se administra junto con, antes o poco después del complejo de glicolípido/proteína modificado de la invención (el complejo de glicolípido/CD1d modificado). En un aspecto, el complejo de glicolípido/proteína modificado se usa como un vehículo de antígeno para el suministro de antígenos, por ejemplo, antígenos heterólogos o moléculas de direccionamiento que mejoran una respuesta inmunitaria contra un agente infeccioso o tumor.

25

El término «adyuvante» se refiere a un material que tiene la capacidad de (1) alterar o aumentar la respuesta inmunitaria a un antígeno particular o (2) aumentar o ayudar a un efecto de un agente farmacológico. En determinadas realizaciones, un glicolípido de tipo ceramida funciona como un adyuvante en la administración simultánea con una proteína CD1d. En determinadas realizaciones, el glicolípido de tipo ceramida, (α GalCer),
30 funciona como un adyuvante cuando se administra con una proteína CD1d y un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento. En otra realización, se incluye un segundo adyuvante. Otros adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, derivados de LPS (por ejemplo, monofosforil lípido A (MPL)), agonistas de TLR9 (por ejemplo, CpG ODN), agonistas TLR7/8 (por ejemplo, imiquimod), citoquinas y factores de crecimiento; componentes bacterianos (por ejemplo, endotoxinas, en particular superantígenos, exotoxinas y componentes de la pared celular);
35 sales a base de aluminio; sales a base de calcio; sílice; polinucleótidos; toxoides proteínas séricas, virus y materiales derivados viralmente, tóxicos, venenos, compuestos de imidazoquinilina, poloxámeros y lípidos catiónicos.

Se ha demostrado que una gran diversidad de materiales tienen actividad adyuvante a través de una diversidad de
40 mecanismos. Cualquier compuesto que pueda aumentar la expresión, la antigenicidad o la inmunogenicidad de un inmunógeno es un adyuvante potencial. Otros adyuvantes potenciales de la invención incluyen, pero no se limitan a: glicolípidos; quimioquinas compuestos que inducen la producción de citoquinas y quimioquinas; interferones; vehículos inertes, tales como alumbre, bentonita, látex y partículas acrílicas; polímeros de bloques plurónicos, tales como TiterMax® (copolímero de bloques CRL-8941, escualeno (un aceite metabolizable) y un estabilizador de sílice
45 microparticulado); formadores de depósitos, tales como adyuvante de Freund; materiales tensioactivos, tales como saponina, lisolecitina, retina, Quil A, liposomas y formulaciones de polímeros plurónicos; estimuladores de macrófagos, tales como lipopolisacáridos bacterianos; activadores del complemento de la vía alternativa, tales como insulina, zimosán, endotoxina y levamisol; tensioactivos no iónicos; copolímeros de tribloques de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno); mLT; MF59™; SAF; sistema adyuvante Ribi™; dimicolato de trehalosa (TDM); esqueleto de la
50 pared celular (CWS); Detox™; QS21; Stimulon™; adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); factor de necrosis tumoral (TNF); MPL 3-O-desacilado; oligonucleótidos CpG; éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno y combinaciones de más de un adyuvante.

En determinadas realizaciones, el adyuvante es una citoquina. Una composición de la presente invención puede
55 comprender una o más citoquinas, quimioquinas o compuestos que inducen la producción de citoquinas y quimioquinas. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias (CSF), eritropoyetina (EPO), interleuquina 2 (IL-2), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 5 (IL-5), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 7 (IL-7), interleuquina 8 (IL-8),
60 interleuquina 10 (IL-10), interleuquina 12 (IL-12), interleuquina 15 (IL-15), interleuquina 18 (IL-18), interferón alfa

(IFN α), interferón beta (IFN β), interferón gamma (IFN γ), interferón omega (IFN ω), interferón tau (IFN τ), factor inductor de la interferón gamma I (IGIF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), RANTES (regulada por la activación, expresada y supuestamente secretada por las células T normales), proteínas inflamatorias de macrófagos (por ejemplo, MIP-1 alfa y MIP-1 beta), factor de inicio de alargamiento de *Leishmania* (LEIF) y ligando de Flt-3.

En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden además otro componente, por ejemplo, un polipéptido con actividad inmunológica. Por ejemplo, la proteína con actividad inmunológica es una molécula coestimuladora, tal como un receptor tipo toll («TLR»), B7.1 o B7.2. «B7» se usa en este documento para referirse genéricamente a B7.1 o B7.2. Una molécula coestimuladora, por ejemplo, el dominio extracelular de B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) que interactúa con CD28 en células T y NK puede administrarse como una fusión amino terminal a β 2-microglobulina incorporada en la estructura de un complejo CD1d soluble para su uso en la presente invención. Véase, por ejemplo, el documento WO 9964597, publicado el 16 de diciembre de 1999. En determinadas realizaciones, la incorporación de una molécula coestimuladora, por ejemplo, una molécula de señalización B7, con las composiciones de la invención permite una activación más eficaz y prolongada de células NKT por un complejo de glicolípido/CD1d modificado de la invención.

En otras realizaciones, las composiciones de la invención comprenden además componentes adyuvantes adicionales, por ejemplo, cualquiera de los adyuvantes descritos anteriormente, tales como los derivados de LPS (por ejemplo, MPL), agonistas de TLR9 (por ejemplo, CPG ODN), agonistas de TLR7/8 (por ejemplo, imiquimod), citoquinas y factores de crecimiento; componentes bacterianos (por ejemplo, endotoxinas, en particular superantígenos, exotoxinas y componentes de la pared celular); sales a base de aluminio; sales a base de calcio; sílice; polinucleótidos; toxoides proteínas séricas, virus y materiales derivados viralmente, tóxicos, venenos, compuestos de imidazoquinilina, poloxámeros, lípidos catiónicos y agonistas del receptor tipo Toll (TLR). Ejemplos de adyuvantes agonistas de TLR que pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan a: N-acetilmuramil-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), lipopolisacáridos (LPS), LPS modificado genéticamente y/o degradado, alumbre, glucano, factores estimulantes de colonias (por ejemplo, EPO, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, G-CSF PEGilado, SCF, IL-3, IL6, PIXY 321), interferones (por ejemplo, interferón γ , interferón α), interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18), saponinas (por ejemplo, QS21), monofosforil lípido A (MPL), monofosforil lípido A 3 de-O-acilado (3D-MPL), secuencias CpG no metiladas, 1-metil triptófano, inhibidores de arginasa, ciclofosfamida, anticuerpos que bloquean las funciones inmunosupresoras (por ejemplo, anticuerpos anti-CTLA4), lípidos (tales como restos de ácido palmítico), tripalmitoil-S-glicerilcisteinil seril-serina (P₃CSS), y adyuvante de Freund. Como alternativa o además, las composiciones de la presente invención pueden comprender además una linfoquina o citoquina que modula la activación de células inmunitarias, tal como el factor de crecimiento transformante (TGF, por ejemplo, TGF α y TGF β); interferones α (por ejemplo, IFN α); interferones β (por ejemplo, IFN β); interferones γ (por ejemplo, IFN γ) o la proteína asociada a la función de los linfocitos, tal como LFA-1 o LFA-3; o una molécula de adhesión intercelular, tal como ICAM-1 o ICAM-2.

Otros ejemplos de adyuvantes incluyen compuestos tales como isatoribin y sus derivados (Anadys Pharmaceuticals) o imidazoquinolinolinaminas, tales como imiquimod y resiquimod (Dockrell y Kinghom, J. Antimicrob. Chemother., 48:751-755 (2001) y Hemmi y col., Nat. Immunol., 3:196-200 (2002), ribonucleósidos de guanina, tales como ribonucleósidos de guanina C8-sustituidos o N7, C-8 disustituidos (Lee y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 100:6646-6651 (2003) y los compuestos que se describen en la publicación de las pat. n.º JP-2005-089,334; WO99/32122; WO98/01448; WO05/092893; y WO05/092892, y el agonista de TLR-7 SM360320 (9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxi-etoxi)adenina) descrito en Lee y col., Proc Natl Acad Sci USA, 103 (6):1828-1833 (2006).

Además de isatoribin, otros adyuvantes agonistas de TLR incluyen 9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)adenina (SM360320) y Actilon™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Otros adyuvantes que pueden usarse junto con la composición de la presente invención se describen en la pub. de PCT n.º WO 2005/000348, la pub. de pat. de EE. UU. n.º 2007/0292418, y la pub. de pat. de EE. UU. n.º 2007/0287664.

Las composiciones de la invención pueden comprender además un polipéptido inmunogénico. En determinadas realizaciones, se puede usar un complejo de glicolípido/proteína modificado de la invención (un complejo de glicolípido/CD1d modificado) como vehículos de antígenos para el suministro de antígenos heterólogos, moléculas de direccionamiento o inmunógenos. Los antígenos heterólogos, moléculas de direccionamiento o inmunógenos pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos inmunogénicos.

Un «polipéptido inmunogénico» pretende abarcar polipéptidos antigénicos o inmunogénicos, por ejemplo, materiales de poliaminoácidos que tienen epítopos o combinaciones de epítopos. Como se usa en este documento, un polipéptido inmunogénico es un polipéptido que, cuando se introduce en un vertebrado, reacciona con las moléculas

del sistema inmunitario del vertebrado, es decir, es antigénico, y/o induce una respuesta inmunitaria en el vertebrado, es decir, es inmunogénico. Es probable que un polipéptido inmunogénico también sea antigénico, pero un polipéptido antigénico, debido a su tamaño o conformación, puede que no sea necesariamente inmunogénico. Ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de agentes infecciosos tales como bacterias, virus, parásitos u hongos, alérgenos tales como los de la caspa de mascotas, plantas, polvo y otras fuentes ambientales, así como determinados autopolipéptidos, por ejemplo, antígenos asociados a tumores.

Los complejos de glicolípidos modificados de la invención que comprenden polipéptidos antigénicos o inmunogénicos se pueden usar para impedir o tratar, por ejemplo, curar, mejorar, disminuir la gravedad, o impedir o reducir el contagio de enfermedades infecciosas virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias, así como para tratar alergias y enfermedades proliferativas tales como el cáncer.

Además, los complejos de glicolípidos/proteínas modificados de la invención que comprenden polipéptidos antigénicos e inmunogénicos se pueden usar para impedir o tratar, por ejemplo, curar, mejorar o disminuir la gravedad del cáncer, incluidos, pero no se limitan a, los cánceres de la cavidad oral y la faringe (por ejemplo, lengua, boca, faringe), sistema digestivo (por ejemplo, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, canal anal, anorrecto, hígado, vesícula biliar, páncreas), sistema respiratorio (por ejemplo, laringe, pulmón), huesos, articulaciones, tejidos blandos (incluido el corazón), piel, melanoma, mama, órganos reproductores (por ejemplo, cuello uterino, endometrio, ovario, vulva, vagina, próstata, testículo, pene), sistema urinario (por ejemplo, vejiga urinaria, riñón, uréter, y otros órganos urinarios), ojo, cerebro, sistema endocrino (por ejemplo, tiroides y otros endocrinos), linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin), mieloma múltiple, leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica).

Los complejos de glicolípidos/proteínas modificados de la invención que comprenden polipéptidos antigénicos e inmunogénicos se pueden usar para impedir o tratar, por ejemplo, curar, mejorar o disminuir la gravedad de una enfermedad causada por un agente infeccioso, por ejemplo, agentes virales, bacterianos, fúngicos y parasitarios.

Ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos virales incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de adenovirus, polipéptidos de alfavirus, polipéptidos de calicivirus, por ejemplo, un antígeno de la cápside de calicivirus, polipéptidos de coronavirus, polipéptidos del virus del moquillo, polipéptidos del virus del Ébola, polipéptidos de enterovirus, polipéptidos de flavivirus, polipéptidos del virus de la hepatitis (AE), por ejemplo, un antígeno del núcleo o de la superficie de la hepatitis B, polipéptidos del virus del herpes, por ejemplo, un virus del herpes simple o la glicoproteína del virus varicela zoster, polipéptidos del virus de la inmunodeficiencia, por ejemplo, la envoltura o proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana, polipéptidos del virus de la peritonitis infecciosa, polipéptidos del virus de la influenza, por ejemplo, una influenza A hemaglutinina, neuraminidasa o nucleoproteína, polipéptidos del virus de la leucemia, polipéptidos del virus de Marburg, polipéptidos ortomixovirus, polipéptidos del virus del papiloma, polipéptidos del virus parainfluenza, por ejemplo, la hemaglutinina/neuraminidasa, polipéptidos de paramixovirus, polipéptidos de parvovirus, polipéptidos de pestivirus, polipéptidos del virus de la picorna, por ejemplo, un polipéptido de la cápside del poliovirus, polipéptidos del virus de la viruela, por ejemplo, un polipéptido del virus de la vacuna, polipéptidos del virus de la rabia, por ejemplo, una glicoproteína G del virus de la rabia, polipéptidos de reovirus, polipéptidos de retrovirus y polipéptidos de rotavirus.

Ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos bacterianos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de *Actinomyces*, polipéptidos de *Bacillus*, por ejemplo, polipéptidos inmunogénicos a partir de *Bacillus anthracis*, polipéptidos de *Bacteroides*, polipéptidos de *Bordetella*, polipéptidos de *Bartonella*, polipéptidos de *Borrelia*, por ejemplo, OspA de *B. burgdorferi*, polipéptidos de *Brucella*, polipéptidos de *Campylobacter*, polipéptidos de *Capnocytophaga*, polipéptidos de *Chlamydia*, polipéptidos de *Clostridium*, polipéptidos de *Corynebacterium*, polipéptidos de *Coxiella*, polipéptidos de *Dermatophilus*, polipéptidos de *Enterococcus*, polipéptidos de *Ehrlichia*, polipéptidos de *Escherichia*, polipéptidos de *Francisella*, polipéptidos de *Fusobacterium*, polipéptidos de *Haemobartonella*, polipéptidos de *Haemophilus*, por ejemplo, la proteína de membrana externa tipo b de *H. influenzae*, polipéptidos de *Helicobacter*, polipéptidos de *Klebsiella*, polipéptidos de bacterias forma L, polipéptidos de *Leptospira*, polipéptidos de *Listeria*, polipéptidos de *Mycobacteria*, polipéptidos de *Mycoplasma*, polipéptidos de *Neisseria*, polipéptidos de *Neorickettsia*, polipéptidos de *Nocardia*, polipéptidos de *Pasteurella*, polipéptidos de *Peptococcus*, polipéptidos de *Peptostreptococcus*, polipéptidos de *Pneumococcus*, polipéptidos de *Proteus*, polipéptidos de *Pseudomonas*, polipéptidos de *Rickettsia*, polipéptidos de *Rochalimaea*, polipéptidos de *Salmonella*, polipéptidos de *Shigella*, polipéptidos de *Staphylococcus*, polipéptidos de *Streptococcus*, por ejemplo, proteínas M de *S. pyogenes*, polipéptidos de *Treponema* y polipéptidos de *Yersinia*, por ejemplo, antígenos *Y. pestis* F1 y V.

60

Ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos parasitarios incluyen, pero no se limitan a polipéptidos de *Balantidium coli*, polipéptidos de *Entamoeba histolytica*, polipéptidos de *Fasciola hepatica*, polipéptidos de *Giardia lamblia*, polipéptidos de *Leishmania* y polipéptidos de *Plasmodium* (por ejemplo, polipéptidos de *Plasmodium falciparum*).

5

Ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos fúngicos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de *Aspergillus*, polipéptidos de *Candida*, polipéptidos de *Coccidioides immitis* o *C. posadasii*, polipéptidos de *Cryptococcus*, polipéptidos de *Histoplasma*, polipéptidos de *Pneumocystis* y polipéptidos de *Paracoccidioides*.

- 10 Ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos asociados a tumores incluyen, pero no se limitan a, regiones variables de inmunoglobulinas específicas de tumores, GM2, Tn, sTn, antígeno de Thompson-Friedenreich (TF), Globo H, Le(y), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, antígenos carcinoembrionarios, cadena beta de la gonadotropina coriónica humana (hCG beta), C35, HER2/neu, CD20, PSMA, EGFRvIII, KSA, PSA, PSCA, GP100, MAGE 1, MAGE 2, TRP 1, TRP 2, tirosinasa, MART-1, PAP, CEA, BAGE, MAGE, RAGE y proteínas relacionadas.

15

Las composiciones de la invención pueden comprender además otros agentes terapéuticos. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos y agentes antimetabólicos. Los antimetabolitos incluyen metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina. Los agentes alquilantes incluyen mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diaminodicloro platino (II) (DDP) cisplatino. Las antraciclinas incluyen daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina (también denominada en este documento adriamicina). Ejemplos adicionales incluyen mitozantrona y bisantreno. Los antibióticos incluyen dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC). Los agentes antimetabólicos incluyen vincristina y vinblastina (que comúnmente se denominan alcaloides de la vinca). Otros agentes citotóxicos incluyen procarbazona, hidroxurea, asparaginasa, corticosteroides, mitotano (O,P'- (DDD)), interferones. Otros ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, ricina, doxorubicina, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, etopósido, tenopósido, colchicina, dihidróxido de antracenediona, 1-deshidrotestosterona y glucocorticoide. Los análogos y homólogos de dichos agentes terapéuticos están abarcados por la presente invención.

20

Un complejo de glicolípido/proteína modificado de la invención, (un complejo de glicolípido/CD1d modificado con benzofenona) o una composición de vacuna que comprende el mismo puede marcarse, para ser directamente detectable, o puede usarse junto con inmunoreactivos marcados secundarios que se unirán específicamente al compuesto, por ejemplo, para la detección o diagnóstico. Las etiquetas de interés pueden incluir colorantes, enzimas, quimioluminiscentes, partículas, radioisótopos u otro agente detectable directa o indirectamente. Como alternativa, se puede usar una etiqueta de segunda etapa, por ejemplo, anticuerpo marcado dirigido a uno de los constituyentes del compuesto de la invención.

25

40 Ejemplos de etiquetas enzimáticas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, estafilocócica nucleasa, delta-5-esteroide isomerasa, levadura-alcohol deshidrogenasa, alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, alcalina fosfatasa, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa.

30

45 Ejemplos de etiquetas radioisotópicas adecuadas incluyen ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , etc. Ejemplos de etiquetas isotópicas no radioactivas adecuadas incluyen ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Tr y ^{56}Fe .

35

Ejemplos de etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen una etiqueta ^{152}Eu , una etiqueta de fluoresceína, una etiqueta de isotiocianato, una etiqueta de rodamina, una etiqueta de ficoeritrina, una etiqueta de ficocianina, una etiqueta de alofocianina, una etiqueta de oftaldehído y una etiqueta de fluorescamina.

40

Ejemplos de etiquetas quimioluminiscentes incluyen una etiqueta luminal, una etiqueta isoluminal, una etiqueta de éster de acridinio aromático, una etiqueta de imidazol, una etiqueta de sal de acridinio, una etiqueta de éster de oxalato, una etiqueta de luciferina, una etiqueta de luciferasa y una etiqueta de aequorina.

45

Ejemplos de agentes de contraste de resonancia magnética nuclear incluyen núcleos de metales pesados tales como Gd, Mn y Fe.

- 60 Las técnicas típicas para unir las etiquetas descritas anteriormente a glicolípidos o polipéptidos de la invención son

proporcionadas por Kennedy y col., Clin. Chim. Acta 70:1-31 (1976), y Schurs y col., Clin. Chim. Acta 81:1-40 (1977). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en este último son el procedimiento de glutaraldehído, el procedimiento de periodato, el procedimiento de dimaleimida, el procedimiento del éster de m-maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida, cuyos procedimientos se incorporan en este documento como referencia.

5

La capacidad de una composición de la presente invención para modular una respuesta inmunitaria puede determinarse fácilmente mediante un ensayo *in vitro*. Las células NKT para su uso en los ensayos incluyen líneas celulares NKT transformadas, o células NKT que se aíslan de un mamífero, por ejemplo, de un ser humano o de un roedor tal como un ratón. Las células NKT se pueden aislar de un mamífero al clasificar las células que se unen a los tetrámeros CD1d: α -GalCer. Véase, por ejemplo, Benlagha y col., J Exp Med 191:1895-1903 (2000); Matsuda y col., J Exp Med 192:741-754 (2000); y Karadimitris y col., Proc Natl Acad Sci USA 98:3294-3298 (2001). Un ensayo adecuado para determinar si un compuesto o composición de la presente invención es capaz de modular la actividad de las células NKT se realiza mediante el cultivo conjunto de células NKT y células presentadoras de antígenos, añadiendo el compuesto particular o la composición de interés al medio de cultivo que se dirige a las células presentadoras de antígeno o a las células NKT directamente, y midiendo la producción de IL-4 o IFN- γ . Un aumento o disminución significativo en la producción de IL-4 o IFN- γ sobre el mismo cocultivo de células en ausencia del compuesto o composición de la invención indica estimulación o inhibición de células NKT.

Las células NKT empleadas en los ensayos se incuban en condiciones adecuadas para la proliferación. Por ejemplo, un hibridoma de células NKT se incuba adecuadamente a aproximadamente 37 °C y 5 % de CO₂ en medio de cultivo completo (RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %, penicilina/estreptomicina, L-glutamina y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M). Se pueden añadir diluciones en serie del compuesto al medio de cultivo celular NKT. Las concentraciones adecuadas del compuesto añadido a las células NKT típicamente estarán en el intervalo de 10^{-12} a 10^{-6} M. El uso de dosis de antígeno y números de APC que proporcionan la activación de las células NKT ligeramente submáximas puede usarse para detectar la estimulación o inhibición de respuestas de células NKT por los compuestos de la invención.

Como alternativa, en lugar de la medición de una proteína expresada tal como IL-4 o IFN- γ , la modulación de la activación de las células NKT se puede determinar por cambios en la proliferación de células T dependientes de antígeno conforme se mide por técnicas de radiomarcaje como se reconoce en la técnica. Por ejemplo, un nucleótido marcado (por ejemplo, tritiatado) puede ser introducido en un medio de cultivo de ensayo. La incorporación de dicho nucleótido marcado en el ADN sirve como una medida de la proliferación de las células T. Este ensayo no es adecuado para las células NKT que no requieren la presentación de antígenos para el crecimiento, por ejemplo, hibridomas de células NKT. Una diferencia en el nivel de proliferación de las células T después del contacto con el compuesto o composición de la invención indica que el complejo modula la actividad de las células T. Por ejemplo, una disminución en la proliferación de las células NKT indica que el compuesto o la composición puede suprimir una respuesta inmunitaria. Un aumento en la proliferación de las células NKT indica que el compuesto o la composición puede estimular una respuesta inmunitaria.

Además, el ensayo de liberación de ⁵¹Cr puede usarse para determinar la actividad citotóxica.

Estos ensayos *in vitro* pueden emplearse para seleccionar e identificar glicolípidos modificados y complejos de glicolípidos/proteínas modificados y composiciones que comprenden los mismos que son capaces de modular adecuadamente una respuesta inmunitaria. Los ensayos descritos anteriormente, por ejemplo, la medición de la producción de IL-4 o IFN- γ o la proliferación de células NKT, se emplean para determinar si el contacto con el compuesto modula la activación de las células T.

Además o como alternativa, los experimentos de desafío de inmunización en animales, por ejemplo, ratones, conejos, primates no humanos, pueden usarse para identificar glicolípidos modificados y complejos de glicolípidos/proteínas modificados y composiciones que comprenden los mismos que son capaces de modular adecuadamente una respuesta inmunitaria y que pueden ser eficaces para el tratamiento y/o prevención de enfermedades bacterianas, por ejemplo, la tuberculosis, en seres humanos.

Un glicolípido modificado y un complejo de glicolípido/proteína modificado, una composición o una composición de vacuna de la presente invención pueden usarse tanto para impedir una enfermedad como para tratar terapéuticamente una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana, una enfermedad fúngica, una enfermedad parasitaria, una enfermedad alérgica o una enfermedad proliferativa, por ejemplo, el cáncer, o una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. En individuos que ya padecen una enfermedad, la presente invención se usa para estimular o modular aún más el sistema inmunológico del animal, reduciendo o eliminando así los síntomas asociados con esa enfermedad o trastorno. Como se define en este documento,

«tratamiento» se refiere al uso de una o más bacterias modificadas, composiciones o composiciones de vacunas de la presente invención para impedir, curar, retardar o reducir la gravedad de los síntomas de la enfermedad en un animal, y/o no produce un empeoramiento de la enfermedad durante un período de tiempo específico en un animal que ya ha contraído la enfermedad y, por lo tanto, necesita terapia.

5

El término «prevención» o «impedir» se refiere al uso de uno o más glicolípidos modificados, complejos de glicolípidos/proteínas modificados, composiciones o composiciones de vacunas de la presente invención para generar inmunidad en un animal que aún no ha contraído una enfermedad, impidiendo o reduciendo de este modo los síntomas de la enfermedad si el animal está más tarde dispuesto a desarrollar esa enfermedad. Por lo tanto, los procedimientos pueden denominarse procedimientos terapéuticos o procedimientos preventivos o profilácticos. No se requiere que ningún glicolípido modificado, complejo de glicolípido/proteína modificado, composición o composición de vacuna de la presente invención proporcione la inmunidad total hacia un agente patógeno o cure o elimine totalmente todos los síntomas de la enfermedad.

10

15 Como se usa en este documento, un «sujeto que necesita inmunidad terapéutica y/o preventiva» se refiere a un individuo para el que es deseable tratar, es decir, impedir, curar, retardar o reducir la gravedad de determinados síntomas de la enfermedad, y/o no produce un empeoramiento de la enfermedad durante un período de tiempo específico.

20 Una «cantidad efectiva» es aquella cantidad cuya administración a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento y/o la prevención. Una cantidad es efectiva, por ejemplo, cuando su administración da como resultado una incidencia o gravedad reducidas de los síntomas de la enfermedad asociados con *M. tuberculosis* en relación con un individuo no tratado, conforme se determina aproximadamente dos semanas después del desafío con *M. tuberculosis* infecciosa. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y la condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, primates, etc.), la capacidad de respuesta del sistema inmunitario del individuo, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, una evaluación profesional de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad efectiva esté incluida en un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de pruebas habituales.

25

30 El término «vertebrado» pretende abarcar un «vertebrado» singular así como «vertebrados» en plural y comprende mamíferos y aves, así como peces, reptiles y anfibios.

El término «mamífero» pretende abarcar un «mamífero» singular y «mamíferos» en plural e incluye, pero no se limita a los seres humanos; primates tales como simios, monos (por ejemplo, búho, ardilla, Cebus, rhesus, verde africano, patas, cynomolgus, y cercopithecus), orangutanes, babuinos, gibones, y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; felinos tales como gatos, leones y tigres; equinos tales como caballos, burros y cebras, animales de alimento tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados tales como venados y jirafas; úrsidos tales como los osos; y otros tales como conejos, ratones, hurones, focas, ballenas. En particular, el mamífero puede ser un sujeto humano, un animal de alimento o un animal de compañía.

35

El término «ave» está destinado a abarcar un «ave» singular y «aves» en plural, e incluye, pero no se limita a, aves acuáticas salvajes tales como patos, gansos, charranes, pardelas y gaviotas; así como especies de aves domésticas tales como pavos, pollos, codornices, faisanes, gansos y patos. El término «ave» también abarca aves paseriformes tales como estorninos y periquitos.

40

La descripción proporciona procedimientos para impedir o tratar una enfermedad en un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, que comprende administrar al sujeto con esa enfermedad, o con tendencia a contraer esa enfermedad, una composición que comprende un glicolípido modificado o un complejo de glicolípido/proteína modificado, tal como un complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida tal como se describe en este documento. En realizaciones de la invención, la proteína del complejo de glicolípido/proteína modificado de la invención se puede usar como un vehículo de antígeno para el suministro de antígenos heterólogos o moléculas de direccionamiento para un patógeno o un antígeno específico de tumor.

50

55 La presente descripción también incluye un procedimiento de modulación, es decir, estimulando o inhibiendo una respuesta inmunitaria, que comprende administrar a un animal una cantidad efectiva de un glicolípido modificado o un complejo de glicolípido/proteína modificado, tal como un complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida modificado como se describe en este documento. En realizaciones de la invención, la composición de la invención comprende además un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento de otro patógeno o un antígeno específico de tumor, y la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria de cebado contra el antígeno

60

heterólogo o una molécula de direccionamiento.

En determinadas realizaciones, los procedimientos incluyen el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad infecciosa o proliferativa, en un sujeto con la enfermedad, administrando al sujeto con la enfermedad
5 una composición de la invención, por ejemplo, un complejo de glicolípido/CD1d modificado de la invención, en una cantidad suficiente para alterar la progresión de dicha enfermedad.

Los procedimientos incluyen la prevención de una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad infecciosa o proliferativa, en un sujeto que necesita prevención de la enfermedad administrando al sujeto que la necesita una
10 composición de la invención, por ejemplo, un complejo de glicolípido/CD1d modificado de la invención, en una cantidad suficiente para mejorar una respuesta inmunitaria contra un antígeno en relación con la administración de un complejo de glicolípido/CD1d no modificado (por ejemplo, uno que carece de un grupo fotorreactivo).

En algunas realizaciones, la enfermedad a tratar o impedir puede ser, sin limitación, una enfermedad infecciosa viral,
15 bacteriana, fúngica o parasitaria, una alergia o una enfermedad proliferativa tal como el cáncer o una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria tal como la esclerosis múltiple, la diabetes o el síndrome de Sjogren. Más específicamente, la enfermedad puede ser, por ejemplo, tuberculosis, enfermedad de Hansen, enfermedad pulmonar que se parece a tuberculosis, linfadenitis, enfermedad de la piel, enfermedad diseminada, peste bubónica, peste neumónica, tularemia, enfermedad del legionario, ántrax, fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea, enfermedad
20 transmitida por los alimentos, listeriosis, malaria, VIH, VIS, VPH, VSR, influenza, hepatitis (VHA, VHB, y VHC).

En otro aspecto, los procedimientos descritos en este documento incluyen mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un glicolípido modificado o un complejo de glicolípido/proteína modificado de la invención (por ejemplo, un complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida modificado); y donde el
25 glicolípido modificado o el complejo de glicolípido/proteína modificado se administra en una cantidad suficiente para mejorar las respuestas de células T CD8 específicas de antígeno contra un antígeno y mejorar la actividad de células T citotóxicas naturales (NKT) en dicho animal.

Como se usa en este documento, un «sujeto que lo necesita» se refiere a un individuo para el que es deseable
30 tratar, es decir, impedir, curar, retardar o reducir la gravedad de los síntomas de una enfermedad, por ejemplo, una infección bacteriana, y/o no produzca un empeoramiento de la enfermedad durante un período de tiempo específico.

Según estos procedimientos, un glicolípido modificado o un complejo de glicolípido/proteína modificado (por ejemplo, un complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida modificado), una composición o una composición de
35 vacuna de la presente invención se puede administrar en una cantidad suficiente para alterar la progresión de una enfermedad.

La «inmunización» (administración de una vacuna) es un procedimiento común y generalizado y las vacunas de la invención usadas pueden ser esencialmente cualquier preparación destinada a la profilaxis inmunológica activa,
40 incluidas, sin limitación, preparaciones de microbios muertos de cepas virulentas y microbios vivos de cepas atenuadas. El diccionario médico ilustrado de Stedman (24ª edición), Williams & Wilkins, Baltimore, p. 1526 (1982). En algunos casos, las vacunas deben administrarse más de una vez para inducir una protección eficaz; por ejemplo, las vacunas antitoxinas conocidas deben administrarse en dosis múltiples.

Los términos «cebado» o «primario» y «refuerzo» o «potenciación» como se usan en este documento se refieren a
45 las inmunizaciones iniciales y posteriores, respectivamente, es decir, según las definiciones que estos términos normalmente tienen en inmunología. Sin embargo, en determinadas realizaciones, por ejemplo, cuando el componente de cebado y el componente de potenciación están en una sola formulación, las inmunizaciones iniciales y posteriores pueden no ser necesarias, ya que tanto la composición de cebado como la de refuerzo se administran
50 simultáneamente. Véase también, McShane H, Curr Opin Mol Ther 4 (1):13-4 (2002) y Xing Z y Charters TJ, Expert Rev Vaccines 6 (4):539-46 (2007).

En determinadas realizaciones, una o más composiciones de la presente invención se utilizan en un régimen de «refuerzo primario». En determinadas realizaciones, una o más composiciones de vacuna de la presente invención
55 se suministran a un vertebrado, cebando de este modo la respuesta inmunitaria del vertebrado a un antígeno bacteriano, por ejemplo, un antígeno micobacteriano, o un antígeno tumoral, y luego se utiliza una segunda composición inmunogénica como una vacuna de refuerzo. En determinadas realizaciones, una o más composiciones de vacuna de la presente invención se suministran a un vertebrado, cebando de este modo la respuesta inmunitaria del vertebrado a un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento, por ejemplo, un
60 antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento transportada por un complejo de glicolípido/CD1d de tipo

ceramida modificado, y luego se utiliza una segunda composición inmunogénica como una vacuna de refuerzo. En otra realización, una o más composiciones de vacuna de la presente invención se usan para cebar la inmunidad, y luego una segunda composición inmunogénica, por ejemplo, una vacuna bacteriana o tumoral recombinante, se usa para potenciar la respuesta inmunitaria antibacteriana o antitumoral. Las composiciones de vacuna pueden comprender uno o más vectores para la expresión de uno o más genes que codifican polipéptidos inmunogénicos como se describe en este documento.

La presente descripción proporciona además un procedimiento para generar, mejorar o modular una respuesta inmunitaria protectora y/o terapéutica a un patógeno, por ejemplo, un patógeno bacteriano, fúngico, viral o parasitario, o un antígeno tumoral, en un vertebrado, que comprende administrar a un vertebrado que necesita inmunidad terapéutica y/o preventiva, uno o más de los glicolípidos modificados, complejos de glicolípidos/proteínas modificados, composiciones o composiciones de vacunas descritas en este documento. En algunos de estos aspectos, la composición incluye un complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida modificado. En determinados aspectos, el complejo de glicolípido/CD1d modificado comprende además un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento.

En determinadas realizaciones, los glicolípidos modificados, los complejos de glicolípidos/proteínas modificados, la composición o la composición de vacuna de la invención se pueden usar para reducir la dosis requerida para obtener una respuesta favorable a la vacuna. Esto tendría los beneficios potenciales de reducir la toxicidad local y sistémica, aumentando así el perfil de seguridad de la vacuna. Además, esto podría tener el beneficio de permitir un costo de producción reducido.

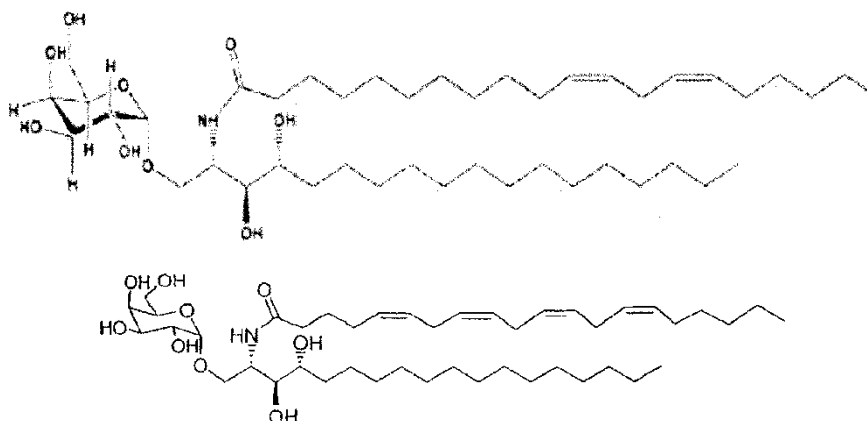
Determinados aspectos de la descripción incluyen un procedimiento para reducir o eliminar la respuesta anérgica de las células NKT a múltiples administraciones de antígenos glicolípidos de tipo ceramida, administrados por ellos mismos, por ejemplo, los que se presentan a las células NKT en el contexto de una pared celular bacteriana. Se ha demostrado que las administraciones múltiples de α -GalCer, administradas por sí mismas, hacen que las células NKT dejen de responder durante un período prolongado de tiempo. La presente invención, en la que se administran glicolípidos modificados (α -GalCer) como parte de un complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida modificado, puede proteger a las células NKT de la anergia en respuesta al antígeno, y permitir una respuesta prolongada en múltiples administraciones. En consecuencia, las células NKT se activan en respuesta a la estimulación con complejos de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados cargados con un glicolípido de tipo ceramida modificado de la presente invención, y además, las células NKT pueden reactivarse en respuesta a la reestimulación por los complejos de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados cargados con un glicolípido de tipo ceramida modificado de la presente invención.

Según los procedimientos de la presente descripción, una composición que comprende un glicolípido modificado o un complejo de glicolípido/proteína modificado (por ejemplo, un complejo de antígeno de glicolípido/CD1d de tipo ceramida) como se describe en este documento se administra para modular una respuesta inmunitaria en un animal, por ejemplo, un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En determinados aspectos, los procedimientos de la presente descripción dan como resultado la mejora de una respuesta inmunitaria, por ejemplo, a un inmunógeno suministrado antes, después o simultáneamente con un glicolípido modificado o un complejo de glicolípido/proteína modificado (por ejemplo, un complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida modificado). La administración de un glicolípido modificado o un complejo de glicolípido/proteína modificado de la invención, por ejemplo, con un inmunógeno, típicamente puede dar como resultado la liberación de las citoquinas de las células inmunitarias, por ejemplo, células NKT o células NK. Las citoquinas liberadas en respuesta a la administración de una composición, o una composición de vacuna de la invención pueden ser aquellas asociadas con una respuesta inmunitaria de tipo TH1, por ejemplo, interferón gamma y TNF-alfa. Como alternativa, o además, la administración de un glicolípido modificado, una composición o una composición de vacuna de la presente invención puede dar como resultado la liberación de las citoquinas asociadas con una respuesta inmunitaria de tipo TH2, por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-10 o IL-13. Como alternativa, o además, la administración de un glicolípido modificado, una composición o una composición de vacuna de la presente invención puede dar como resultado la liberación de otras citoquinas, por ejemplo, IL-2, IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-23, TNF- β /LT, MCP-2, oncostatina-M, y RANTES. Los procedimientos para modular el tipo de citoquinas liberadas incluyen variar el antígeno glicolípido de tipo ceramida del complejo de glicolípido/proteína CD1d de tipo ceramida. La elección y prueba de diversos antígenos glicolípidos de tipo ceramida para determinar su efecto sobre la liberación de citoquinas de NKT u otras células inmunitarias se puede realizar usando ensayos in vitro descritos en otra parte de este documento y en Porcelli, pub. de sol. de patente de EE. UU. n.º 2006/0052316, así como por procedimientos adicionales bien conocidos por los expertos en la materia. La administración de los glicolípidos modificados y los complejos de glicolípidos/proteínas modificados de la presente invención (los complejos de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados) y las composiciones de vacunas que comprenden los mismos pueden modular aún más una respuesta inmunitaria al inducir la proliferación de células

NKT, y también al inducir el reclutamiento y o la activación de otras células inmunitarias e inflamatorias incluyendo, pero no se limitan a células NK, CTL, otros linfocitos T, por ejemplo, los linfocitos T CD8+ o CD4+, células dendríticas, linfocitos B, y otros.

5 En determinadas realizaciones, la administración de los glicolípidos modificados o los complejos de glicolípidos/proteínas modificados de la presente invención y las composiciones que comprenden los mismos afecta a una o más actividades de células NKT tales como, pero no se limitan a la proliferación celular, la producción de una o más citoquinas, o el reclutamiento y/o activación de células del sistema inmunitario no NKT que incluyen, pero no se limitan a, células NK, CTL, otros linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD8+ o CD4+, células dendríticas,
10 linfocitos B y otros.

En algunas realizaciones, el glicolípidos modificados es un glicolípidos de tipo ceramida modificados que muestra un sesgo hacia la inducción de citoquinas tipo 2, es decir, citoquinas que tienen efecto antiinflamatorio (por ejemplo, IL-4) en células iNKT con inducción de citoquinas tipo 1 embotadas (por ejemplo, IFN γ). Ejemplos no limitantes de
15 dichos glicolípidos de tipo ceramida se describen en las patentes de EE. UU. n.º 7.772.380 y 8.022.043. En algunas de estas realizaciones, el glicolípidos de tipo ceramida tiene una de las siguientes dos estructuras.



20

También se describe el uso de glicolípidos modificados o complejos de glicolípidos/proteínas modificados de la invención (complejos de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados) como vacunas recombinantes usadas para modular una respuesta inmunitaria a un inmunógeno, por ejemplo, un antígeno patógeno o un antígeno tumoral, que
25 se administran juntos o justo antes o poco después del glicolípidos modificados o del complejo glicolípidos/proteína modificados (el complejo de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados). En consecuencia, la presente descripción proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria a un inmunógeno en un animal, donde el procedimiento comprende administrar a un animal que lo necesite una composición que comprende un inmunógeno, que está presente en un complejo de glicolípidos/proteína modificados (por ejemplo, un complejo de glicolípidos/CD1d
30 de tipo ceramida). El complejo de glicolípidos/CD1d modificados (por ejemplo, el complejo de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados) se administra en una cantidad suficiente para inducir la respuesta inmunitaria contra el inmunógeno, por ejemplo, el patógeno bacteriano o inmunógeno expresado por bacterias recombinantes, en relación con la administración del inmunógeno sin el complejo de glicolípidos/CD1d modificados (por ejemplo, el complejo de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados). Un glicolípidos modificados o un complejo de
35 glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados para su uso como vacuna puede en determinadas realizaciones dirigirse a un órgano particular, tejido, célula o marcador de superficie celular como se describe, por ejemplo, en la pub. de sol. de patente de EE. UU. n.º 2006/0269540.

En determinadas realizaciones, los glicolípidos modificados o los complejos de glicolípidos/proteínas modificados de
40 la presente invención (los complejos de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados) o las composiciones que comprenden los mismos se administran como una vacuna terapéutica, por ejemplo, a un animal que ya padece una enfermedad. Según estos procedimientos, la respuesta inmunitaria provocada por un glicolípidos modificados o un complejo de glicolípidos/proteína modificados de la invención es eficaz en el tratamiento, por ejemplo, que afecta el resultado de la enfermedad al reducir los síntomas o disminuir la gravedad de la enfermedad, y el glicolípidos
45 modificados o el complejo de glicolípidos/proteína modificados se administra en una cantidad suficiente para modular la respuesta inmunitaria contra el inmunógeno en relación con la administración del inmunógeno en ausencia del complejo de glicolípidos/proteína modificados. Como alternativa, los glicolípidos modificados o los complejos de glicolípidos/proteínas modificados de la presente invención (los complejos de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida

modificados) y las composiciones que los comprenden se administran como una vacuna profiláctica, es decir, para impedir o reducir los síntomas de una enfermedad, tal como una enfermedad infecciosa que podría contraer ese animal en el futuro. Según estos procedimientos, la respuesta inmunitaria provocada por los glicolípidos modificados o los complejos de glicolípidos/proteínas modificados (por ejemplo, los complejos de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados) es eficaz para impedir, por ejemplo, que afecte el resultado de la enfermedad al reducir los síntomas o disminuir la gravedad de la enfermedad, y el glicolípido modificado o el complejo de glicolípido/proteína modificado se administra en una cantidad suficiente para modular la respuesta inmunitaria contra el inmunógeno en relación con la administración del inmunógeno en ausencia del glicolípido modificado o el complejo de glicolípido/proteína modificado (por ejemplo, el complejo de glicolípido/CD1d de tipo ceramida modificado).

Los procedimientos, los glicolípidos modificados, los complejos de glicolípidos/proteínas modificados, las composiciones o las composiciones de vacunas como se describen en este documento también son útiles para generar una respuesta inmunitaria contra agentes infecciosos, por ejemplo, un complejo de glicolípido/proteína modificado donde el complejo comprende un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento, por ejemplo, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico o un antígeno parásito. Los agentes infecciosos que pueden causar enfermedades o síntomas que pueden tratarse con los glicolípidos modificados, los complejos de glicolípidos/proteínas modificados, las composiciones o las composiciones de vacuna de la invención incluyen, pero no se limitan a, agentes virales, bacterianos, fúngicos y parasitarios. Ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias virales de ADN y ARN: Arbovirus, Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Birnaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae (hepatitis), Herpesviridae (tales como, Citomagalovirus, Herpes Simplex, Herpes Zoster), Mononegavirus (por ejemplo, Paramixoviridae, Morbillivirus, Rhabdoviridae), Orthomixoviridae (por ejemplo, influenza), Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae (tales como viruela o vaccinia), Reoviridae (por ejemplo, Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I, HTLV-II, Lentivirus) y Togaviridae (por ejemplo, Rubivirus). Los virus incluidos en estas familias pueden causar una diversidad de enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitarse a: artritis, bronquiolitis, encefalitis, infecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis, queratitis), síndrome de fatiga crónica, hepatitis (A, B, C, E, activo crónico, Delta), meningitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, el SIDA), neumonía, linfoma de Burkitt, varicela, fiebre hemorrágica, sarampión, paperas, parainfluenza, rabia, el resfriado común, poliomielitis, leucemia, rubéola, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, verrugas), y viremia.

De forma similar, los agentes bacterianos o fúngicos que pueden causar enfermedades o síntomas pueden ser tratados o evitados por los glicolípidos modificados, los complejos de glicolípidos/proteínas modificados, las composiciones o las composiciones de vacunas de la invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias bacterianas Gram-negativas y Gram-positivas y hongos: Actinomycetales (por ejemplo, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia), Aspergilosis, Bacillaceae (por ejemplo, Anthrax, Clostridium), Bacteroidaceae, Blastomycosis, Bordetella, Borrelia, Brucellosis, Candidiasis, Campylobacter, Coccidioidomycosis, Cryptococcosis, Dermatococcoses, Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella, Serratia, Yersinia), Erysipelothrix, Helicobacter, Legionellosis, Leptospirosis, Listeria, Mycoplasmatales, Neisseriaceae (por ejemplo, Acinetobacter, Gonorrea, Meningococcal), infecciones de Pasteurellaceae (por ejemplo, Actinobacillus, Haemophilus, Pasteurella), Pseudomonas, Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, Syphilis y Staphylococcal. Estas familias de bacterias o fúngicas pueden causar las siguientes enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitarse a: bacteriemia, endocarditis, infecciones oculares (conjuntivitis, tuberculosis, uveítis), gingivitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, infecciones relacionadas con el SIDA), paroniquia, infecciones relacionadas con prótesis, enfermedad de Reiter, infecciones del tracto respiratorio, tales como tos ferina o empiema, sepsis, enfermedad de Lyme, enfermedad por arañazo de gato, disentería, fiebre paratifoidea, intoxicación alimentaria, tifoidea, neumonía, gonorrea, meningitis, clamidia, sífilis, difteria, lepra, paratuberculosis, tuberculosis, enfermedad de Hansen, enfermedad pulmonar que se parece a la tuberculosis, linfadenitis, enfermedad de la piel, enfermedad diseminada, lupus, botulismo, gangrena, tetanos, impetigo, fiebre reumática, fiebre escarlata, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (por ejemplo, celulitis, dermatomycosis), toxemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas.

Además, los glicolípidos modificados, los complejos de glicolípidos/proteínas modificados, las composiciones o las composiciones de vacunas de la presente invención se pueden usar para tratar o impedir enfermedades causadas por agentes parásitos. Aquellos que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias: amebiasis, babesiosis, coccidiosis, criptosporidiosis, dientamoebiasis, dourina, ectoparasitosis, giardiasis, helmintosis, leishmaniasis, teiliasis, toxoplasmosis, toxoplasmosis, tripanosomiasis, y trichomonas.

Según los procedimientos descritos, los glicolípidos modificados, los complejos de glicolípidos/proteínas modificados, las composiciones o las composiciones de vacunas para su uso en los procedimientos pueden

administrarse, por ejemplo, por vía intramuscular (im), intravenosa (iv), subcutánea (sc) o intrapulmonar. Otras vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a la administración intratraqueal, transdérmica, intraocular, intranasal, inhalación, intracavitaria, intraductal (por ejemplo, en el páncreas), e intraparenquimatosa (es decir, en cualquier tejido). El suministro transdérmico incluye, pero no se limita a la administración intradérmica (por ejemplo, en la dermis o epidermis), transdérmica (por ejemplo, percutánea) y transmucosa (es decir, en o a través de la piel o tejido mucoso). La administración intracavitaria incluye, pero no se limita a la administración en cavidades orales, vaginales, rectales, nasales, peritoneales o intestinales, así como, la administración intratecal (es decir, en el canal espinal), intraventricular (es decir, en los ventrículos cerebrales o ventrículos del corazón), intraauricular (es decir, en la aurícula del corazón) y subaracnoideas (es decir, en los espacios subaracnoideo del cerebro).

10

Las composiciones de la presente invención comprenden además un vehículo adecuado. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del glicolípido modificado o el complejo de glicolípido/proteína modificado y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo incluye, pero no se limita a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

15

La expresión «farmacéuticamente aceptable» se refiere a las composiciones que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad u otras complicaciones proporcionales con una relación razonable de riesgo/beneficio. En algunas realizaciones, las composiciones y vacunas de la presente invención son farmacéuticamente aceptables.

20

Los glicolípidos modificados o los complejos de glicolípidos/proteínas modificados de la presente invención (los complejos de glicolípidos/CD1d de tipo ceramida modificados) pueden administrarse en composiciones farmacéuticas, por ejemplo, composiciones de vacunas, en combinación con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas, por ejemplo, las composiciones de vacunas de la invención comprenden además un antígeno heterólogo o una molécula de direccionamiento. Se entenderá que, cuando se administre a un paciente humano, el médico tratante decidirá el uso total, único o diario de las composiciones farmacéuticas de la presente invención dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente efectivo específico para cualquier paciente en particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el tipo y el grado de la respuesta que debe lograrse; la composición específica de otro agente, si lo hubiera, empleado; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción de la composición; la duración del tratamiento; los fármacos (tales como un agente quimioterapéutico) usados en combinación o coincidentes con la composición específica; y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Las formulaciones adecuadas, conocidas en la técnica, se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences (última edición), Mack Publishing Company, Easton, PA.

30

35

Una composición que se usará en un tratamiento preventivo o terapéutico dado se formulará y administrará de manera compatible con las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual (especialmente los efectos secundarios de la prevención o el tratamiento con los compuestos solos), el lugar de suministro del compuesto, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los profesionales. La «cantidad efectiva» de los compuestos de la invención para los objetivos de este documento se determina así por dichas consideraciones.

40

La dosificación adecuada de las composiciones, por ejemplo, las composiciones de vacuna de la invención que se administrarán a un paciente serán determinadas por un médico. Sin embargo, como guía, una cantidad adecuada de una composición de la invención puede estar entre aproximadamente 10^1 a 10^{12} UFC por dosis, por ejemplo, 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , o 10^{12} UFC suspendidas en 0,05 a 0,1 ml de un vehículo inmunológicamente inerte, por ejemplo, un vehículo farmacéutico. En una realización, una cantidad efectiva de una vacuna de la invención para inducir inmunidad suficiente para impedir o tratar, es decir, curar, mejorar, disminuir la gravedad, o impedir o reducir una enfermedad descrita en este documento es de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/kg de peso corporal. Una composición de la invención se puede administrar como una dosis única o dosis múltiples. Las formulaciones de vacuna de la presente invención pueden emplearse en formas de dosificación tales como cápsulas, soluciones líquidas, suspensiones o elixires, para la administración oral, o líquido estéril para formulaciones tales como soluciones o suspensiones para, por ejemplo, la administración parenteral, intranasal o tópica.

50

55

Las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral, intravenosa, rectal, parenteral, intracisternal, intradérmica, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como por polvos, pomadas, geles, cremas, gotas o parches transdérmicos), bucal, o como una pulverización oral o nasal. El término «parenteral» como se usa en este

60

documento se refiere a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

Las composiciones, por ejemplo, las composiciones de vacuna de la invención se pueden formular según procedimientos conocidos. Los procedimientos de preparación adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, A. Osol, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980), y Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, AR Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995). Aunque la composición se puede administrar como una solución acuosa, también se puede formular como una emulsión, gel, solución, suspensión, forma liofilizada o cualquier otra forma conocida en la técnica. Además, la composición puede contener aditivos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes y conservantes. Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, los sujetos humanos pueden ser tratados.

Las composiciones de la invención habitualmente se almacenarán en recipientes unitarios o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas o viales sellados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para la reconstitución. Las composiciones micobacterianas con adyuvante glicolípido directamente incorporado pueden ser liofilizadas y la actividad adyuvante se recuperará intacta cuando la composición se rehidrate y se suspenda para la inyección. Como ejemplo de una formulación liofilizada, se llenan viales de 10-ml con 5 ml de solución acuosa al 1 % (p/v) esterilizada por filtración, y la mezcla resultante se liofiliza. Se prepara una solución para infusión reconstituyendo la composición liofilizada con agua, por ejemplo, agua bacteriostática para la inyección.

La descripción también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Puede haber un aviso asociado a dichos recipientes en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana. Además, las composiciones de la presente invención se pueden emplear junto con otras composiciones terapéuticas.

Las preparaciones adecuadas de dichas composiciones incluyen, pero no se limitan a inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución o la suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o los polipéptidos encapsularse en liposomas. Los principios activos a menudo se mezclan con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la preparación también puede incluir cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH y/o adyuvantes que mejoran la eficacia del principio activo.

La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª ed., Sambrook y col., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook y col., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1992); DNA Cloning, DN Glover ed., volúmenes I y II (1985); Oligonucleotide Synthesis, MJ Gait ed., (1984); Mullis y col. La Pat. de EE. UU. n.º: 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization, BD Hames y SJ Higgins eds. (1984); Transcription and Translation, BD Hames & SJ Higgins eds. (1984); Culture Of Animal Cells, RI Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, (1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., NY.; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, JH Miller y MP Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); Methods in Enzymology vols. 154 y 155 (Wu y col. eds.); Immunochemical Methods In Cells And Molecular Biology, Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres (1987); Handbook Of Experimental Immunology, volúmenes I-IV, DM Weir y CC Blackwell, eds. (1986); Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1986); y en Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

60

Los principios generales de la ingeniería de anticuerpos se exponen en *Antibody Engineering*, 2ª edición, CAK. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995). Los principios generales de la ingeniería de proteínas se exponen en *Protein Engineering, A Practical Approach*, Rickwood, D., y col., Eds., IRL Press en Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995). Los principios generales de los anticuerpos y la unión del anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff, A., *Molecular Immunology*, 2ª ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); y Steward, MW, *Antibodies, Their Structure and Function*, Chapman and Hall, Nueva York, NY (1984). Además, los procedimientos convencionales en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente se siguen generalmente como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites y col. (eds), *Basic and Clinical Immunology* (8ª ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) y Mishell y Shiigi (eds), *Selected Methods in Cellular Immunology*, WH. Freeman and Co., Nueva York (1980).

Los trabajos de referencia convencionales que exponen los principios generales de inmunología incluyen *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein, J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, Nueva York (1982); Kennett, R., y col., eds., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Nueva York (1980); Campbell, A., «Monoclonal Antibody Technology» en Burden, R., y col., eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984); Kubly *Immunology*, 4ª ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt y Barbara A. Osborne, H. Freeman & Co. (2000); Roitt, I., Brostoff, J. y Male D., *Immunology*, 6ª ed. Londres: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. y Lichtman, A., *Cellular and Molecular Immunology* Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); Kontermann y Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Verlag (2001); Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press (2001); Lewin, *Genes VIII*, Prentice Hall (2003); Harlow y Lane, *Antibodies: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); Dieffenbach y Dveksler, *PCR Primer* Cold Spring Harbor Press (2003).

25 Todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Cabe señalar que el término «un» o «una» entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que «una proteína» representa una o más proteínas. Como tal, los términos «un» (o «una»), «uno o más» y «al menos uno» se pueden usar de manera intercambiable en este documento.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras «comprender», «comprende» y «que comprende» se usan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto requiera lo contrario.

35 Como se usa en este documento, el término «aproximadamente», cuando se refiere a un valor, pretende abarcar variaciones de, en algunas realizaciones $\pm 50\%$, en algunas realizaciones $\pm 20\%$, en algunas realizaciones $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones, $\pm 1\%$, en algunas realizaciones, $\pm 0,5\%$, y en algunas realizaciones, $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son adecuadas para realizar los procedimientos descritos o emplear las composiciones descritas.

40 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior del intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos pequeños intervalos que pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños también se abarcan dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

EXPERIMENTACIÓN

50

EJEMPLO 1

Síntesis de derivados de α GalCer-benzofenona

55 El esquema básico para la síntesis de derivados de α -GalCer-benzofenona se muestra en la figura 1.

Etapa a: Procedimiento general para el procedimiento de monoalquilación.

A una solución fría del diol (10 mmol, 4,0 eq) en DMF anhidra (40 ml) se le añadió hidruro de sodio (10 mmol, 4,0 eq) en pequeñas porciones a 0 °C y la mezcla se dejó agitar durante 30 minutos. Luego se añadió gota a gota una

60

solución de 3-bromometil-fenil-metanona 1 (2,5 mmol, 1,0 eq) en DMF (20 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente y luego se recogió en agua (100 ml). A continuación, la mezcla resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío. El residuo se purificó luego por cromatografía ultrarrápida usando hexanos: EtOAc (5:1) como eluyente.

Etapa B: Procedimiento general para la oxidación de los derivados alcohólicos de benzofenona monoalquilados a los correspondientes ácidos carboxílicos.

10 Los derivados de benzofenona monoalquilados (1 mmol) anteriores se disolvieron en THF (20 ml) y se añadió dicromato de piridinio (PDC) (3 mmol, 3 eq). La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 48 horas y luego se recogió en agua (20 ml). A continuación, la mezcla resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío. El residuo se purificó luego por cromatografía ultrarrápida usando metanol al 10 % en cloroformo como eluyente.

Etapa a': 3-(hidroximetil)benzofenona

20 La 3-(hidroximetil)benzofenona (10 mmol) se obtuvo a partir de 3-(bromometil)benzofenona (12 mmol) mediante reflujo de esta última en una mezcla de THF:H₂O (1:1) en presencia de CaCO₃ como se describe en la bibliografía indicada.

Etapa b': Reacción con bromoácidos.

25 A una solución fría de 3-(hidroximetil)benzofenona (1 mmol, 1 eq) en una mezcla de DMF (10 ml) y hexametilfosforamida (HMPA) (1 ml) se le añadió hidruro de sodio (NaH) (60 % en aceite mineral) (1,2 mmol, 1,2 eq) a 0 °C en pequeñas cantidades. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 20 minutos antes de la adición gota a gota de los bromoácidos respectivos [n = 5, 6, 9] (1,2 mmol, 1,2 eq) disueltos en DMF (5 ml). La reacción se dejó a temperatura ambiente durante la noche y el exceso de NaH se detuvo usando metanol. La reacción se recogió en agua (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 40 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío. El residuo se purificó luego por cromatografía ultrarrápida usando metanol al 10 % en cloroformo como eluyente.

Etapa c: Formación de cloruro de ácido

35 Los derivados del ácido benzofenona carboxílico obtenidos de las etapas b y b' (0,5 mmol) se añadieron a cloruro de oxalilo puro (1 ml) y se agitaron a 70 °C durante 2 h, después de lo cual la solución se enfrió a temperatura ambiente y el cloruro de oxalilo sin reaccionar se eliminó bajo una corriente de argón. Los compuestos volátiles residuales se eliminaron a presión reducida.

Etapa d: Síntesis de los compuestos DB11-1 (n=4), DB12-6 (n=6), DB12-7 (n=7), DB11-2 (n=8), DB12-8 (n=9), DB12-9 (n=10), DB11-3 (n=14)

45 Los cloruros de acilo brutos resultantes anteriores se disolvieron en THF (1 ml) y se añadieron a una solución de amina (0,5 mmol, 1 eq) en THF/NaOAc (sat) (1:1,1 ml). La reacción se agitó vigorosamente durante la noche, después de lo cual se eliminó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo adicionalmente con THF (2 x 1 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentraron. El residuo se purificó finalmente por cromatografía ultrarrápida (gradiente de CHCl₃ a MeOH al 20 % en CHCl₃) para proporcionar los compuestos diana acilados.

50 EJEMPLO 2

Síntesis del complejo αGalCer-benzofenona/CD1d

El esquema básico para la síntesis de derivados de α-GalCer-benzofenona se muestra en la figura 2.

55 En general, CD1d murino soluble recombinante (mCD1d) se diluyó a 400 µg/ml en PBS pH 7,2. Los glicolípidos (es decir, los derivados de benzofenona de alfa-galactosil ceramida) se disolvieron en DMSO al 100 % para producir una concentración final de 1 mg/ml y luego se diluyeron a 200 µM en PBS que contenía Triton X-100 al 0,1 %. La suspensión de glicolípidos se calentó luego a 80 °C durante 5 minutos, se agitó con formación de vórtice durante 30 segundos, se sometió a ultrasonidos en un baño de agua con ultrasonidos durante 5 minutos y finalmente se agitó

con formación de vórtice durante 30 segundos. Se añadieron volúmenes iguales de CD1d y las soluciones de glicolípidos a continuación, para dar concentraciones finales de 200 µg/ml de CD1d (~4 µM), glicolípido 100 µM y Triton X-100 al 0,05 %, y se dejaron incubar durante la noche (16 horas) a temperatura ambiente. Los complejos de CD1d se transfirieron a placas de 96 pocillos de baja unión (100 µl/pocillo) para unir covalentemente la proteína al glicolípido presente en su sitio de unión al ligando. Se colocó una lámpara UV de onda larga (Schleider y Schuell) que emitía a λ 365 fija 1 pulgada por encima del nivel de la muestra y los complejos se irradiaron durante 1 h en hielo. El resultado final es que la proteína CD1d está unida covalentemente al glicolípido α GalCer-benzofenona.

EJEMPLO 3

10

Espectros de fluorescencia de triptófano de mCD1d con y sin ligandos glicolípidos

Se probó el efecto de la unión de glicolípidos a CD1d de ratón. La extinción de fluorescencia de mCD1d debido a la unión a glicolípidos se midió con un espectrofotómetro fluorescente Horiba Jobin Yvon Fluoromax-3 y los datos se analizaron usando el software FluorEssence. La proteína (0,1 µM) se mezcló con antígenos glicolípidos (a 4 µM) o el vehículo ligando en una cubeta de cuarzo de 1 cm de ancho, hasta un volumen final de 100 µl y se colocó en el espectrómetro ya ajustado a 25 °C. Las muestras se excitaron a λ_{295} y la emisión se midió desde λ_{290} a λ_{400} . No se observó ningún cambio en la longitud de onda para la emisión de fluorescencia máxima, pero todos los glicolípidos causaron la extinción de la fluorescencia a diversos niveles, lo que indica que la unión del ligando conduce a alteraciones estructurales observables en CD1d.

Los resultados se muestran en la figura 3. Estos resultados muestran que DB12-7 indujo la mayor extinción en comparación con los otros glicolípidos modificados con benzofenona (BPGC), lo que sugiere una mayor afinidad de unión para este glicolípido en comparación con los otros probados. Aunque esto indica que DB12-7 es el ligando de unión más ávido de este grupo, este análisis no proporciona información sobre si los complejos formados por la unión de estos glicolípidos dan como resultado la estructura adecuada para el reconocimiento por los receptores de antígenos de células iNKT y la actividad biológica.

EJEMPLO 4

30

Activación de células NKT (con DC que expresan mCD1d)

Las células citotóxicas naturales activadas se calcularon sobre la base de las que secretan IL-2. Específicamente, las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) a partir de ratones C57BL/6 (10.000 células en 100 µl de medio de cultivo) se sembraron en pocillos de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos y se dejaron adherir a las placas durante 30 minutos a 37 °C. Los cultivos se expusieron luego a concentraciones variables de BPGC que variaban entre 5 y 0,01 µg/ml en 100 µl durante 3 h a 37 °C. Los glicolípidos no absorbidos por BMDC se eliminaron lavando con medio de cultivo. Para detectar la presentación BPGC por CD1d, se añadió hibridoma iNKT DN3A4-1.2 (5000 células en 100 µl de volumen) y la estimulación se detectó por el nivel de IL-2 secretado en el sobrenadante después de 18 h de incubación a 37 °C.

Los resultados se muestran en la figura 4. Estos resultados muestran que DB11-2 estimuló los iNKT de manera más eficiente a una concentración baja de 0,1 µg/ml y fue el más potente en términos de actividad biológica en este ensayo entre este grupo de glicolípidos. DB12-7 indujo una secreción de IL-2 más baja pero aún significativa.

45

EJEMPLO 5

Activación de células NKT (con células HeLa que expresan hCD1d)

Las células citotóxicas naturales activadas se calcularon de nuevo sobre la base de las que secretan IL-2. Específicamente, las células HeLa transfectadas con CD1d humanas unidas a la placa (10.000 células en 100 µl de medio) se sembraron en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se dejaron adherir a las placas durante 30 minutos a 37 °C. Las células HeLa adherentes se trataron con concentraciones variables de BPGC que variaban entre 5 y 0,01 µg/ml en 100 µl durante 3 h a 37 °C. El glicolípido no absorbido por las células se eliminó lavando con medio. Para detectar la presentación de BPGC por CD1d, se añadió hibridoma iNKT DN3A4-1.2 (5000 células en 100 µl de volumen) y la estimulación se detectó por el nivel de IL-2 secretado en el sobrenadante después de la incubación a 37 °C durante 18 horas.

Los resultados se muestran en la figura 5. Estos resultados confirmaron que DB11-2 y DB12-8 eran estimulantes hacia células iNKT cuando se presentaban en CD1d humana, y estas se presentaban de manera eficiente a una

60

concentración baja de 0,1 µg/ml.

EJEMPLO 6

5 **Detección de la afinidad de unión al ligando de la mCD1d unida a la placa con y sin activación UV (mediante ELISA usando mAb L363)**

La afinidad de unión al ligando de la mCD1d unida a la placa se midió mediante ELISA usando mAb L363 para detectar complejos de CD1d/aGalCer murinos. Las placas de ELISA se recubrieron con mCD1d (10 µg/ml, 30 µl/pocillo) durante la noche a 4 °C en PBS pH 8,2. El sobrenadante se eliminó luego junto con cualquier proteína no unida. Se cargaron glicolípidos (5 µM, 30 µl/pocillo) y se dejaron incubar durante la noche a 25 °C. El sobrenadante se eliminó de nuevo y los complejos se lavaron tres veces con PBS para eliminar cualquier glicolípido no unido. Para aquellos complejos que se sometieron a activación UV, el entrecruzamiento UV se realizó en solución (30 µl/pocillo PBS) y a una longitud de onda fija de 365 nm desde una lámpara UV (lámpara UV de onda larga LIBRE DE RAD, Schleicher y Schuell). La lámpara UV se colocó a una pulgada de la muestra y la muestra se dejó reposar en hielo durante 1 h. Tanto los complejos que se sometieron a activación UV como los que no se dejaron luego disociar durante tres días (i. eliminar el sobrenadante y añadir 200 µl de PBS + Triton X-100 al 0,05 % (PBS-Tx), ii. incubar durante un día a 25 °C, iii. repetir las etapas i y ii dos veces más) antes de realizar el ELISA para cuantificar la unión de mAb L363.

Los resultados se muestran en las figuras 6A-6B. Todos los glicolípidos que muestran afinidad por CD1d y los complejos podrían detectarse usando el ELISA L363. Como resultado de la incubación de los complejos CD1d:GC unidos a la placa en PBS-Tx durante 3 días, los ligandos de glicolípidos entrecruzados sin UV se disociaron significativamente (figura 6A), mientras que los BPGC entrecruzados con UV no lo hicieron (figura 6B). KRN7000 y 7DW8-5 no tienen un grupo activable por UV y, por lo tanto, ambos se disocian después de 3 días independientemente de la exposición a UV. Estos resultados muestran que DB12-8, DB11-2 y DB12-9 tuvieron los niveles más altos de formación de complejos inmunoreactivos en este ensayo y que estos complejos no mostraron una disociación significativa después de la exposición a UV.

30 EJEMPLO 7

Detección de la afinidad de unión al ligando de la mCD1d unida a la placa con y sin activación UV (ensayo de estimulación de hibridomas iNKT DN3A4-1.2)

La afinidad de unión al ligando de la mCD1d unida a la placa se detectó mediante el ensayo de estimulación de hibridomas iNKT DN3A4-1.2. mCD1d (10 µg/ml) se cargó con glicolípidos (5 µM) durante la noche a 25 °C. Las placas de ELISA se recubrieron con complejos mCD1d:GC (2,5 µg/ml, 30 µl/pocillo) durante 12-18 horas a 4 °C en PBS, pH 8,2. Luego se eliminó el sobrenadante y los complejos se lavaron tres veces con PBS para eliminar cualquier glicolípido y proteína no unidos. Para aquellos complejos que se sometieron a activación UV, el entrecruzamiento UV se realizó en solución (30 µl/pocillo PBS) y a una longitud de onda fija de 365 nm desde una lámpara UV (lámpara UV de onda larga LIBRE DE RAD, Schleicher y Schuell). La lámpara UV se colocó a una pulgada de la muestra y la muestra se dejó reposar en hielo durante 1 h. Luego se eliminó el sobrenadante y los complejos se lavaron tres veces con PBS para eliminar cualquier glicolípido y proteína no unidos. Tanto los complejos que se sometieron a activación UV como los que no se dejaron luego disociar durante tres días (i. eliminar cualquier líquido residual de los pocillos y añadir 200 µl por pocillo de PBS + Triton X-100 al 0,05 %, ii. incubar durante 24 horas a 25 °C, iii. repetir las etapas i y ii dos veces más). Luego se añadieron células de hibridoma iNKT DN3A4-1.2 (aproximadamente 30.000 células) y se dejaron incubar durante 24 horas a 37 °C. La actividad estimuladora de iNKT de los complejos se determinó mediante ELISA IL-2 de la secreción de iNKT.

7DW8-5 no estimuló iNKT después de la disociación como se esperaba, pero los complejos mCD1d no entrecruzados con DB12-7, DB11-2, DB12-8 y DB12-9 mostraron alguna estimulación, aunque reducida, de iNKT incluso después de la disociación, tal vez porque la disociación no fue absoluta debido a las altas afinidades de unión de estos glicolípidos.

Los resultados se muestran en las figuras 7A-7B. Los resultados del ensayo de estimulación iNKT después de la reticulación UV muestran que DB12-8 no solo se unió de manera eficiente a CD1d, sino que también estimuló el hibridoma iNKT mejor que otros glicolípidos. DB11-2 también se confirma en este caso como el segundo mejor estimulador del hibridoma iNKT DN3A4-1.2.

60 EJEMPLO 8

Comparación directa de los complejos DB12-8 y 7DW8-5 con mCD1d (detección por ELISA L363)

Una proteína mCD1d recombinante soluble (10 µg/ml) se cargó con glicolípidos (5 µM) durante la noche a 25 °C en 5 PBS pH 8,2 con tiloxapol al 0,05 %. Los complejos mCD1d:GC (10 µg/ml, 30 µl/pocillo) se recubrieron en las placas de ELISA de alta unión, durante la noche a 4 °C. La exposición a UV y la incubación para permitir la disociación durante 3 días se realizó como se describe en los Ejemplos 6 y 7.

Los resultados se muestran en las figuras 8A-8B. Tanto DB12-8 como 7DW8-5 mostraron afinidad con CD1d y los 10 complejos se pudieron detectar usando el ELISA L363. Permitir una disociación prolongada durante 3 días llevó a una pérdida casi completa de la señal para 7DW8-5 independientemente de la exposición a UV. DB12-8 también se disoció casi por completo, pero solo en estado no entrecruzado por UV, la exposición a UV a 365 nm acopló de forma covalente el complejo mCD1d:DB12-8 y, por lo tanto, no se observó disociación en este caso.

15 EJEMPLO 9**Comparación directa de los complejos DB12-8 y 7DW8-5 con la proteína de fusión mCD1d.CEA (detección por ELISA L363)**

20 mCD1d.CEA (10 µg/ml), una proteína mCD1d recombinante fusionada genéticamente con un fragmento de anticuerpo Fv de cadena única específico para el antígeno asociado a tumor CEA, se cargó con glicolípidos (5 µM) durante la noche a 25 °C en PBS pH 8,2 con tiloxapol al 0,05 %. Los complejos mCD1d.CEA:GC (10 µg/ml, 30 µl/pocillo) se recubrieron en pocillos de placas de 96 pocillos ELISA de alta unión durante la noche a 4 °C. La 25 exposición a UV y la incubación para permitir la disociación durante 3 días se realizaron como se describe en los Ejemplos 6 y 7.

Los resultados se muestran en las figuras 9A-9B. Tanto DB12-8 como 7DW8-5 mostraron afinidad con CD1d y los complejos se pudieron detectar usando el ELISA L363. Permitir una disociación prolongada durante 3 días llevó a una pérdida casi completa de la señal para 7DW8-5 independientemente de la exposición a UV. DB12-8 también se 30 disoció casi por completo, pero solo en estado no entrecruzado por UV, la exposición a UV a 365 nm acopló de forma covalente el complejo mCD1d.CEA:DB12-8 y, por lo tanto, no se observó disociación en este caso. Los resultados indican que la señal DB12-8 aumenta significativamente después del entrecruzamiento UV.

Se realizó un aumento a escala de la formación del complejo en solución usando una concentración 10 veces mayor 35 de proteína y glicolípidos y los resultados se muestran en las figuras 9C-9D. mCD1d.CEA (100 µg/ml) se cargó con DB12-8 (50 µM respectivamente) durante la noche a 25 °C en PBS pH 8,2 con tiloxapol al 0,05 %. Los complejos DB12-8:mCD1d.CEA se diluyeron hasta 10 µg/ml y se recubrieron en las placas ELISA de alta unión (30 µl/pocillo), durante la noche a 4 °C. La exposición a UV y la incubación para permitir la disociación durante 3 días se realizaron como se describe en los Ejemplos 6 y 7.

40 La incubación de complejos no entrecruzados durante 3 días llevó a una disminución del ~75 % en la DO₄₅₀ mientras que no hubo una reducción detectable en la DO₄₅₀ de las muestras entrecruzadas por UV después de 3 días.

45 EJEMPLO 10**Comparación directa de la liberación de citoquinas *in vivo* después de la inyección de sCD1d-anti-CEA cargada de forma no covalente con αGalCer o entrecruzado por UV con DB12-8**

50 La cinética y la magnitud de la liberación de citoquinas interferón γ (IFNγ) e interleuquina-2 (IL-2) en suero de grupos de 3 ratones se determinó cada uno a las 2, 10 y 24 horas después de la inyección con solución salina o con 30 µg de cualquiera de αGalCer cargada de forma no covalente en sCD1d-anti-CEA o complejos de DB12-8:sCD1d-anti-CEA entrecruzados por UV. El complejo DB12-8 unido covalentemente con sCD1d-anti-CEA es aproximadamente 55 IFNγ e IL-2. Como se muestra en la figura 10, la proteína de fusión covalente conduce a una mayor duración de la liberación de IFNγ.

EJEMPLO 11

60 **Producción sostenida de IFNγ tras la estimulación repetida de células iNKT con DB12-8 unidas**

covalentemente a la proteína de fusión sCD1d-anti-CEA

Una propiedad biológica importante de la estimulación con sCD1d cargada con α GalCer es la producción sostenida de IFN γ después de la estimulación repetida. Esto contrasta con la estimulación con α GalCer libre que, como se describió anteriormente, da como resultado anergia en las células iNKT (publicación de solicitud de EE. UU. n.º 2008/0254045A1; Stirnemann y col., J Clinical Invest. 118:994-1005, 2008; cada uno de los cuales se incorpora en este documento como referencia en su totalidad). Fue importante confirmar que esta propiedad biológica es conservada por los complejos α GalCer-CD1d unidos de forma covalente. Los ratones del experimento descrito en el Ejemplo 10 se volvieron a estimular adicionalmente el día 2 y nuevamente el día 8 con el mismo agente que al inicio del experimento. Los ratones se sacrificaron 1 h después de la tercera inyección y las células iNKT del bazo se tiñeron para determinar el IFN γ intracelular con anti-IFN γ -APC después de la fijación y permeabilización con Cytofix/Cytoperm (BD). Para determinar el porcentaje de células iNKT que producen IFN γ , las células iNKT se clasificaron mediante tinción positiva tanto para CD3-FITC como para un tetrámero de CD1d PE cargado con α GalCer y se evaluó la expresión de IFN γ intracelular mediante citometría de flujo en un FACS Calibur.

Como se muestra en la figura 11 para los ratones representativos, menos del 1 % de las células iNKT de los ratones control tratados con PBS se tiñeron para IFN γ , el 31 % de las células iNKT de ratones estimulados con células sCD1d-anti-CEA cargadas con α GalCer asociadas de forma no covalente, y el 46 % de las células iNKT de ratones estimulados con complejos DB12-8:sCD1d-anti-CEA entrecruzados por UV se tiñeron para IFN γ intracelular. Estos resultados demuestran que la producción de IFN γ por las células iNKT es al menos tan sostenida después de la estimulación repetida con DB12-8:sCD1d-anti-CEA entrecruzados por UV como con los complejos sCD1d-anti-CEA cargados de forma no covalente asociados. Es importante destacar que el aumento de la potencia de la proteína de fusión covalente no se asoció con ninguna toxicidad aparente incluso después de múltiples inyecciones.

25 EJEMPLO 12**Actividad antitumoral *in vivo* de DB12-8 unida covalentemente a la proteína de fusión sCD1d-anti-CEA y la proteína de fusión α GC/sCD1d-anti-CEA cargada de forma no covalente.**

Cuatro grupos de ratones C57BL/6 o ratones C57BL/6 transgénicos para CEA se injertan sc en el flanco con 7×10^5 células tumorales MC38 que se ha transfectado de forma estable con CEA humano (MC38-CEA). Cuando los tumores han crecido a aproximadamente 100 mm³, los ratones se tratan con inyecciones iv de PBS (control) o cantidades equimolares de α GalCer (0,4 μ g), α GalCer cargado de forma no covalente en la proteína de fusión sCD1d-anti-CEA (40 μ g), o DB12-8 unido covalentemente a la proteína de fusión sCD1d-anti-CEA (40 μ g) cada una en un volumen de 200 μ l. El tratamiento se repite cada 4-5 días para un total de 5 inyecciones. El volumen medio del tumor se mide cada dos días usando la fórmula (longitud x anchura x grosor)/2. La cinética del crecimiento del tumor (mm³) se determina como la media de todos los ratones en cada grupo.

EJEMPLO 13

Inhibición *in vivo* del crecimiento del tumor MC38-CEA con α -galactosilceramida unida covalentemente a la proteína de fusión sCD1d-anti-CEA.

Tres grupos de siete ratones C57BL/6 emparejados por edad y sexo se injertaron con células tumorales MC38 que se han transfectado con ADNc que codifica el antígeno carcinoembrionario (CEA). Los ratones se trataron los días 7, 11, 15 y 20 después del injerto con PBS, 3 μ g de α -galactosilceramida libre (α GalCer), o el equivalente molar de α GalCer unida covalentemente a la proteína de fusión sCD1d-anti-CEA (30 μ g). El crecimiento del tumor se midió cada 2 o 3 días mediante calibradores y las mediciones se usaron para calcular el volumen del tumor usando la fórmula (longitud x anchura x grosor)/2. Los animales fueron sacrificados el día 24.

Como se muestra en la figura 12, el tratamiento con α GalCer unida covalentemente a sCD1d-anti-CEA fue significativamente más efectivo para inhibir el crecimiento tumoral que el tratamiento con PBS o α GalCer. Estos resultados fueron significativos conforme lo determinado por el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) ($p = 0,0079$).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Porcelli, Steven A. Zauderer, Maurice

60 <120> Glicolípidos modificados y procedimientos de preparación y uso de los mismos

ES 2 730 649 T3

<130> 50827-441420
 <150> 61/762.591
 5 <151> 08/02/2013
 <150> 13/803.972
 10 <151> 14/03/2013
 <150> 61/842.149
 <151> 02/07/2013
 15 <160> 2
 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
 20 <210> 1
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 1

Met	Gly	Cys	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Ala	Leu	Leu	Gln	Ala	Trp
1				5					10					15	
Gly	Ser	Ala	Glu	Val	Pro	Gln	Arg	Leu	Phe	Pro	Leu	Arg	Cys	Leu	Gln
			20					25					30		
Ile	Ser	Ser	Phe	Ala	Asn	Ser	Ser	Trp	Thr	Arg	Thr	Asp	Gly	Leu	Ala
			35				40					45			
Trp	Leu	Gly	Glu	Leu	Gln	Thr	His	Ser	Trp	Ser	Asn	Asp	Ser	Asp	Thr
			50				55					60			
Val	Arg	Ser	Leu	Lys	Pro	Trp	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Ser	Asp	Gln	Gln
					70						75				80
Trp	Glu	Thr	Leu	Gln	His	Ile	Phe	Arg	Val	Tyr	Arg	Ser	Ser	Phe	Thr
				85					90					95	
Arg	Asp	Val	Lys	Glu	Phe	Ala	Lys	Met	Leu	Arg	Leu	Ser	Tyr	Pro	Leu
			100					105					110		
Glu	Leu	Gln	Val	Ser	Ala	Gly	Cys	Glu	Val	His	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser
			115				120					125			
Asn	Asn	Phe	Phe	His	Val	Ala	Phe	Gln	Gly	Lys	Asp	Ile	Leu	Ser	Phe
						135						140			
Gln	Gly	Thr	Ser	Trp	Glu	Pro	Thr	Gln	Glu	Ala	Pro	Leu	Trp	Val	Asn
					150						155				160
Leu	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asn	Gln	Asp	Lys	Trp	Thr	Arg	Glu	Thr	Val
				165					170					175	
Gln	Trp	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Cys	Pro	Gln	Phe	Val	Ser	Gly	Leu	Leu
			180					185					190		
Glu	Ser	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Gln	Val	Lys	Pro	Lys	Ala	Trp
			195				200					205			
Leu	Ser	Arg	Gly	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Arg	Leu	Leu	Leu	Val	Cys
			210			215					220				
His	Val	Ser	Gly	Phe	Tyr	Pro	Lys	Pro	Val	Trp	Val	Lys	Trp	Met	Arg
					230						235				240
Gly	Glu	Gln	Glu	Gln	Gln	Gly	Thr	Gln	Pro	Gly	Asp	Ile	Leu	Pro	Asn

ES 2 730 649 T3

				245					250					255	
Ala	Asp	Glu	Thr	Trp	Tyr	Leu	Arg	Ala	Thr	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Gly
			260						265				270		
Glu	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Cys	Arg	Val	Lys	His	Ser	Ser	Leu	Glu	Gly
		275					280					285			
Gln	Asp	Ile	Val	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ser	Met	Gly	Leu
	290					295					300				
Ile	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Cys	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Ile	Val	Gly
305					310					315					320
Phe	Thr	Ser	Arg	Phe	Lys	Arg	Gln	Thr	Ser	Tyr	Gln	Gly	Val	Leu	
				325					330					335	

<210> 2

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ser	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser
1				5					10					15	
Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Gln	Arg	Thr	Pro	Lys	Ile	Gln	Val	Tyr	Ser	Arg
			20					25					30		
His	Pro	Ala	Glu	Asn	Gly	Lys	Ser	Asn	Phe	Leu	Asn	Cys	Tyr	Val	Ser
		35				40						45			
Gly	Phe	His	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Glu
	50					55					60				
Arg	Ile	Glu	Lys	Val	Glu	His	Ser	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Lys	Asp	Trp
65					70					75					80
Ser	Phe	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Phe	Thr	Pro	Thr	Glu	Lys	Asp
				85					90					95	
Glu	Tyr	Ala	Cys	Arg	Val	Asn	His	Val	Thr	Leu	Ser	Gln	Pro	Lys	Ile
			100					105					110		
Val	Lys	Trp	Asp	Arg	Asp	Met									
		115													

REIVINDICACIONES

1. Un glicolípido de tipo ceramida que comprende un grupo fotorreactivo, donde:

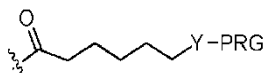
5 - dicho grupo fotorreactivo es un grupo benzofenona unido covalentemente al resto lipófilo N-acilo de dicho glicolípido de tipo ceramida; y
 - dicho glicolípido de tipo ceramida es una α -galactosilceramida;
 donde dicho glicolípido de tipo ceramida es capaz de unirse covalentemente a CD1d y mejorar la actividad de las células citotóxicas naturales (NKT).

10

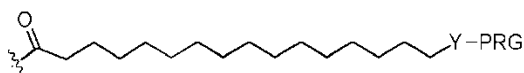
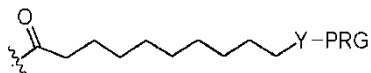
2. El glicolípido de tipo ceramida de la reivindicación 1, donde dicho resto lipófilo N-acilo es una cadena de acilo lineal, y donde dicha cadena de acilo lineal tiene opcionalmente al menos 11 átomos, opcionalmente entre 11 y 14 átomos, donde la numeración de los átomos excluye los hidrógenos.

15

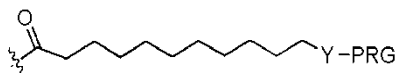
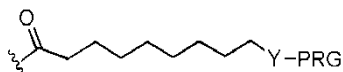
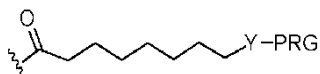
3. El glicolípido de tipo ceramida de la reivindicación 2, donde dicha cadena de acilo se selecciona de entre el grupo que consiste en:



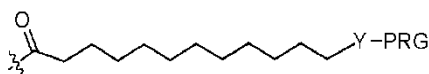
20



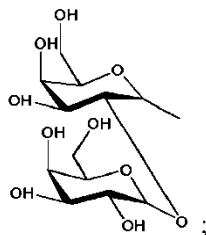
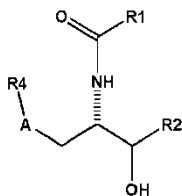
25



30



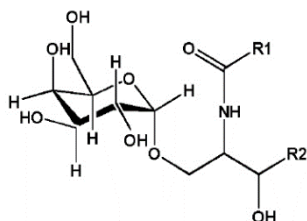
donde Y es -O-, -CH₂-, -S-, -OCH₂-, -SCH₂-, -CH₂CH₂-; o un enlace, y PRG es dicho grupo fotorreactivo.



35

4. El glicolípido de tipo ceramida de la reivindicación 1, donde dicha α -galactosilceramida se selecciona de entre el grupo que consiste en:

a) Fórmula II:



(Fórmula II)

5

donde

R1 es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; R1 es -C(OH)-R3; o donde R1 se selecciona de entre el grupo que consiste en: (CH₂)₉CH=CH-CH₂-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₈CH=CH-CH₂-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₇CH=CH-CH₂-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₃CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂CH₃,

10 (CH₂)₃CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂CH₃, (CH₂)₇CH=CH-CH₂-CH=CH=(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₇CH=CH-CH₂-CH=CH=(CH₂)₅CH₃, (CH₂)₈CH=CH-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₉CH=CH-CH=CH(CH₂)₅CH₃, (CH₂)₆CH=CH-CH=CH-CH=CH(CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH=CH-CH=CH-CH=CH(CH₂)₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH-CH=CH-CH=CH(CH₂)₃CH₃;

donde R3 es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; y

15 R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

(a) -CH₂(CH₂)_xCH₃,

(b) -CH(OH)(CH₂)_xCH₃,

(c) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)₂,

20 (d) -CH=CH(CH₂)_xCH₃,

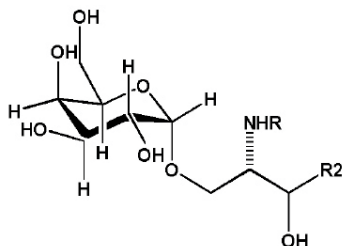
(e) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)CH₂CH₃,

donde X es un número entero que varía de 4-17,

donde R2 es opcionalmente -CH(OH)(CH₂)_xCH₃, donde X es un número entero que varía de 4-13,

25 donde R2 es opcionalmente -CH(OH)-(CH₂)₁₃CH₃;

b) Fórmula III:

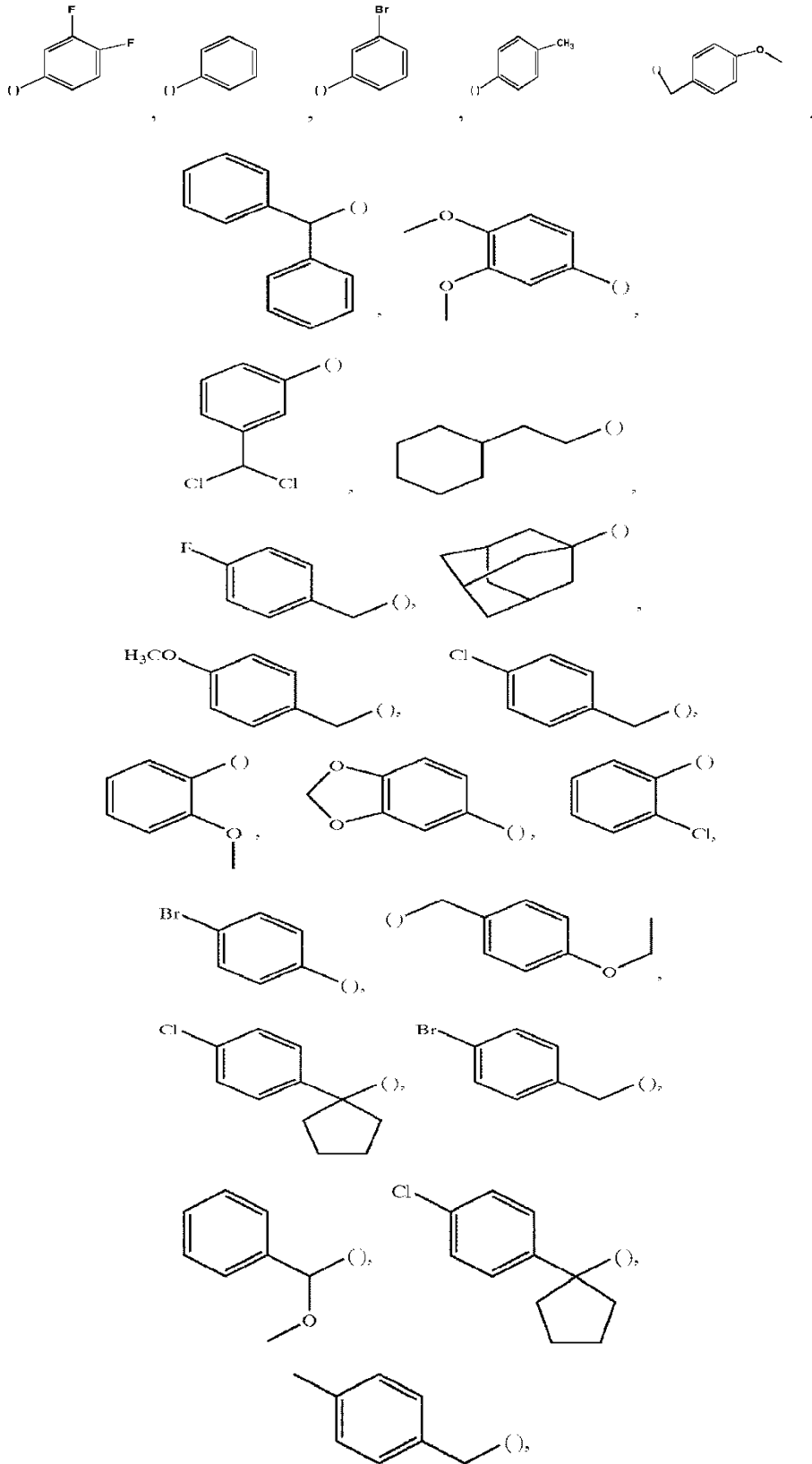


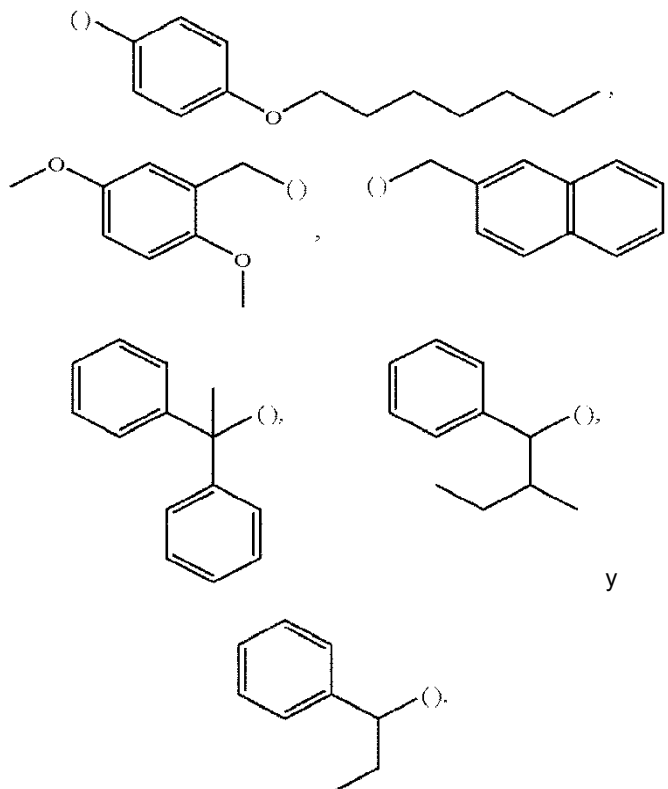
(Fórmula III)

30

donde R es -C(O)R1, donde R1 es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; o R1 es -C(OH)-R3 donde R3 es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; o R1 es un alcano o alqueno C₆-C₂₇ donde (i) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ está sustituido con un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático o

35 (ii) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo C₆-C₂₇, un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático; o R1 es un anillo aromático opcionalmente sustituido, o un aralquilo, o R1 se selecciona de entre el grupo que consiste en:





5

y

donde () representa el punto de unión de R1 al compuesto de Fórmula III; y
 10 R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- (a) $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
- (b) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
- (c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
- 15 (d) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$,
- (e) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$,

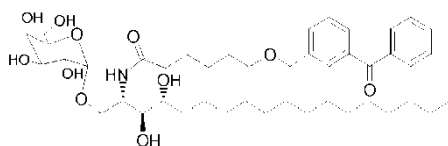
donde X es un número entero que varía de 4-17,

donde opcionalmente R1 está sustituido con oxo; hidroxilo; halógeno; fenilo; $-\text{OC}(\text{O})\text{R}_6$; $-\text{OR}_6$; $-\text{C}(\text{O})\text{R}_6$; o $\text{N}(\text{R}_6)_2$,
 20 donde cada R6 es independientemente un alquilo sustituido con $\text{C}_1\text{-C}_6$, o un anillo aromático sustituido
 opcionalmente sustituido con halógeno; hidroxilo; $-\text{OC}(\text{O})\text{R}_7$; $-\text{OR}_7$; $-\text{C}(\text{O})\text{R}_7$ o $\text{N}(\text{R}_7)_2$, y
 donde cada R7 es un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ sustituido; y

c) (2S, 3S, 4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol (KRN7000), (2S,3S)-1-O-
 25 (α -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3-octadecanodiol), o (2S, 3S, 4R)-1- CH_2 -(α -galactopiranosil)-N-
 hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol (α -C-GalCer).

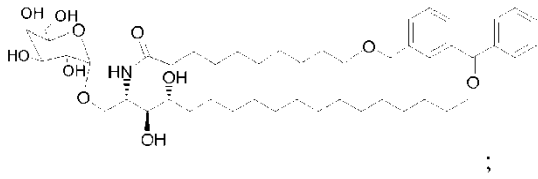
5. El glicolípido de tipo ceramida de la reivindicación 1, donde dicho glicolípido de tipo ceramida tiene la
 estructura seleccionada de entre el grupo que consiste en:

30 a)

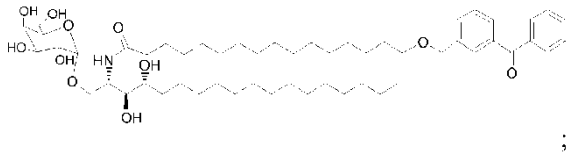


;

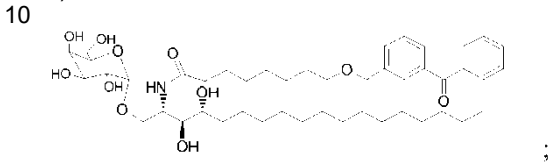
b)



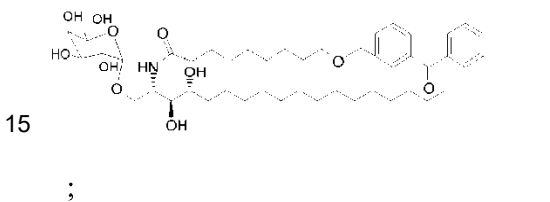
5 c)



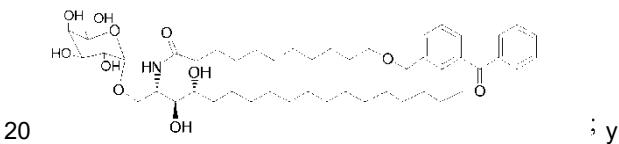
d)



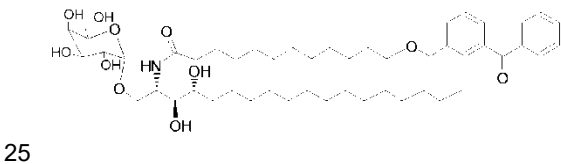
e)



f)



g)



6. Un complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida que comprende una proteína CD1d y el glicolípido de tipo ceramida de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho glicolípido de tipo ceramida está unido covalentemente a dicha proteína mediante la fotoactivación del grupo benzofenona.

30 7. El complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de la reivindicación 6, donde dicha CD1d:

a) tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

i) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a los aminoácidos 21 a 295 de la SEQ ID NO:1;

- ii) la secuencia de aminoácidos expuesta como los aminoácidos 21 a 295 de la SEQ ID NO:1;
- iii) una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 21 a 295 de la SEQ ID NO:1, a excepción de al menos una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas;
- iv) la secuencia de aminoácidos expuesta como los aminoácidos 1 a 295 de la SEQ ID NO:1;
- 5 v) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a los aminoácidos 1 a 295 de la SEQ ID NO:1;
- vi) una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 21 a 295 de la SEQ ID NO:1, a excepción de al menos una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas;
- vii) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1;
- viii) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO:1; y
- 10 ix) una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:1, a excepción de al menos una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas; o

b) está físicamente asociada con una β 2-microglobulina, donde dicha β 2-microglobulina tiene opcionalmente una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo
15 que consiste en:

- i) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a los aminoácidos 21 a 113 de la SEQ ID NO:2;
- ii) la secuencia de aminoácidos expuesta como los aminoácidos 21 a 113 de la SEQ ID NO:2;
- iii) una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 21 a 113 de la SEQ ID NO:2, a excepción de al menos
20 una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas;
- iv) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2;
- v) una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO:2; y
- vi) una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:2, a excepción de al menos una pero menos de 10 sustituciones de aminoácidos conservativas.

25

8. El complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de la reivindicación 6 o 7, donde dicho complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida:

a) comprende además un anticuerpo o fragmento del mismo específico para un antígeno diana, y donde dicho
30 anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está unido a dicha CD1d, donde dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona opcionalmente de entre el grupo que consiste en un fragmento F(ab), un fragmento F(ab')₂ y un anticuerpo de cadena única, donde dicho antígeno diana es opcionalmente un marcador de superficie celular de células tumorales, donde dicho marcador de superficie celular se selecciona opcionalmente de entre el grupo que consiste en CEA,
35 Her2/neu, EGFR tipo I o tipo II, CD19, CD20, CD22, Muc-1, PSMA o STEAP, donde dicha CD1d está unida opcionalmente a la cadena pesada o cadena ligera de dicho anticuerpo o fragmento de cadena pesada o fragmento de cadena ligera de dicho fragmento de anticuerpo de unión a antígeno; o

b) comprende además un antígeno,
40 donde dicho antígeno es opcionalmente un polipéptido inmunogénico de un virus o una célula seleccionada de entre el grupo que consiste en un virus, bacteria, hongo y célula tumoral.

9. Una composición que comprende el complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, y un vehículo farmacéutico,
45

donde dicho vehículo farmacéutico se selecciona opcionalmente de entre el grupo que consiste en solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, y combinaciones de los mismos.

10. El complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8 o la
50 composición de la reivindicación 9, para su uso en un procedimiento para tratar o impedir una enfermedad en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto que necesita de dicho tratamiento o prevención, el complejo o composición de glicolípido/proteína de tipo ceramida, donde dicho complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida se administra en una cantidad suficiente para alterar la progresión de dicha enfermedad

55 donde opcionalmente se mejora o modifica una respuesta inmunitaria en relación con una respuesta inmunitaria producida por la proteína que no está unida covalentemente al glicolípido,

donde dicha enfermedad se selecciona opcionalmente de entre el grupo que consiste en una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana, una enfermedad fúngica, una enfermedad parasitaria, una enfermedad proliferativa, una
60 enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, tuberculosis, enfermedad pulmonar que se parece a la

tuberculosis, linfadenitis, enfermedad de la piel, enfermedad diseminada, peste bubónica, peste neumónica, tularemia, enfermedad de Legionaire, ántrax, fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea, enfermedad transmitida por los alimentos, listeriosis, malaria, VIH, SIV, VPH, VSR, influenza, hepatitis (VHA, VHB y VHC), esclerosis múltiple, diabetes, síndrome de Sjogren y cáncer;

5 donde dicho sujeto es opcionalmente un mamífero, y donde dicho mamífero es opcionalmente un ser humano.

11. El complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8 o la composición de la reivindicación 9, para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra
10 un antígeno en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración a dicho sujeto del complejo o composición de glicolípido/proteína de tipo ceramida

donde dicho complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida comprende opcionalmente dicho antígeno, donde dicho antígeno está unido opcionalmente covalentemente a dicha proteína,

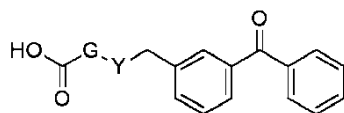
15 donde dicho complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida se administra opcionalmente en una cantidad suficiente para mejorar la actividad de las células T citotóxicas naturales (NKT) en dicho sujeto, donde dicha respuesta inmunitaria comprende opcionalmente una respuesta de anticuerpo, donde dicho sujeto es opcionalmente un mamífero, y donde dicho mamífero es opcionalmente un ser humano.

20 12. Un antígeno heterólogo y el complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8 o la composición de la reivindicación 9 para su uso en un procedimiento para mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto al antígeno heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho sujeto el antígeno heterólogo y el complejo o composición de glicolípido/proteína de tipo ceramida simultáneamente,
25 antes o después de la administración de dicho antígeno heterólogo

donde dicho sujeto es opcionalmente un mamífero, y donde dicho mamífero es opcionalmente un ser humano.

13. Un procedimiento de síntesis de un glicolípido de tipo ceramida de Fórmula (VI) que comprende un grupo benzofenona, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

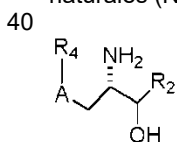
30 activar un derivado de ácido carboxílico de Fórmula (IV) para formar un derivado de acilo activado



(IV)

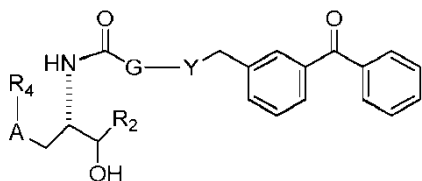
35 ; y

acoplar el derivado de acilo activado con un glicolípido de tipo ceramida de Fórmula (V), donde dicho glicolípido de tipo ceramida es capaz de unirse covalentemente a CD1d y mejorar la actividad de las células T citotóxicas naturales (NKT)



(V),

formando de este modo el glicolípido de tipo ceramida que comprende un grupo benzofenona de Fórmula (VI)



(VI); donde

- G es un alcano C₁-C₂₇ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₇; o G es -C(OH)-R₃ donde R₃ es un alcano C₁-C₂₆ lineal o ramificado o alqueno C₂-C₂₆; o R₁ es un alcano o alqueno C₆-C₂₇ donde (i) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ está
 5 sustituido con un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático o (ii) el alcano o alqueno C₆-C₂₇ incluye, dentro de la cadena de alquilo o alqueno C₆-C₂₇, un cicloalcano C₅-C₁₅, cicloalqueno C₅-C₁₅, heterociclo, o un anillo aromático; o R₁ es un anillo aromático opcionalmente sustituido, o un aralquilo;
 R₄ es un α-galactosilo;
 A es -O-, -CH₂-; o es un enlace simple,
 10 Y es -O-, -CH₂- o -S-, y
 R₂ es una cadena alquilo, alqueno o alquino C₃-C₄₀ sustituida o no sustituida,

donde R₂ de Fórmula (VI) es opcionalmente uno de los siguientes (a)-(e):

- 15 (a) -CH₂(CH₂)_xCH₃,
 (b) -CH(OH)(CH₂)_xCH₃,
 (c) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)₂,
 (d) -CH=CH(CH₂)_xCH₃,
 (e) -CH(OH)(CH₂)_xCH(CH₃)CH₂CH₃, donde x es un número entero que varía de 0-40, o
 20 donde R₂ de Fórmula (VI) es opcionalmente:
 -CH(OH)(CH₂)_xCH₃, donde x es un número entero que varía de 4-17; o
 -CH(OH)(CH₂)₁₃CH₃; o
 donde opcionalmente G es -(CH₂)_n-, donde n es un número entero que varía de 0-20 e Y es O; o
 donde:
 25 G es -(CH₂)_n-, donde n es un número entero que varía de 0-20 e Y es O;
 R₂ es -CH(OH)(CH₂)_xCH₃, donde x es un número entero que varía de 4-17;
 A es O;
 Y es O; y
 30 donde dicho glicolípido de tipo ceramida es capaz de unirse covalentemente a CD1d y mejorar la actividad de las células T citotóxicas naturales (NKT).

14. Un procedimiento de producción de un complejo de glicolípido/proteína de tipo ceramida,
 35 comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) poner en contacto el glicolípido de tipo ceramida de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o un glicolípido de tipo ceramida producido por el procedimiento de la reivindicación 13 con una proteína CD1d; y
 b) irradiar dicho glicolípido de tipo ceramida y dicha proteína CD1d con luz ultravioleta para producir un complejo de
 40 glicolípido/proteína de tipo ceramida,
 donde dicho complejo de glicolípido/proteína modificado mejora la actividad de las células T citotóxicas naturales (NKT).

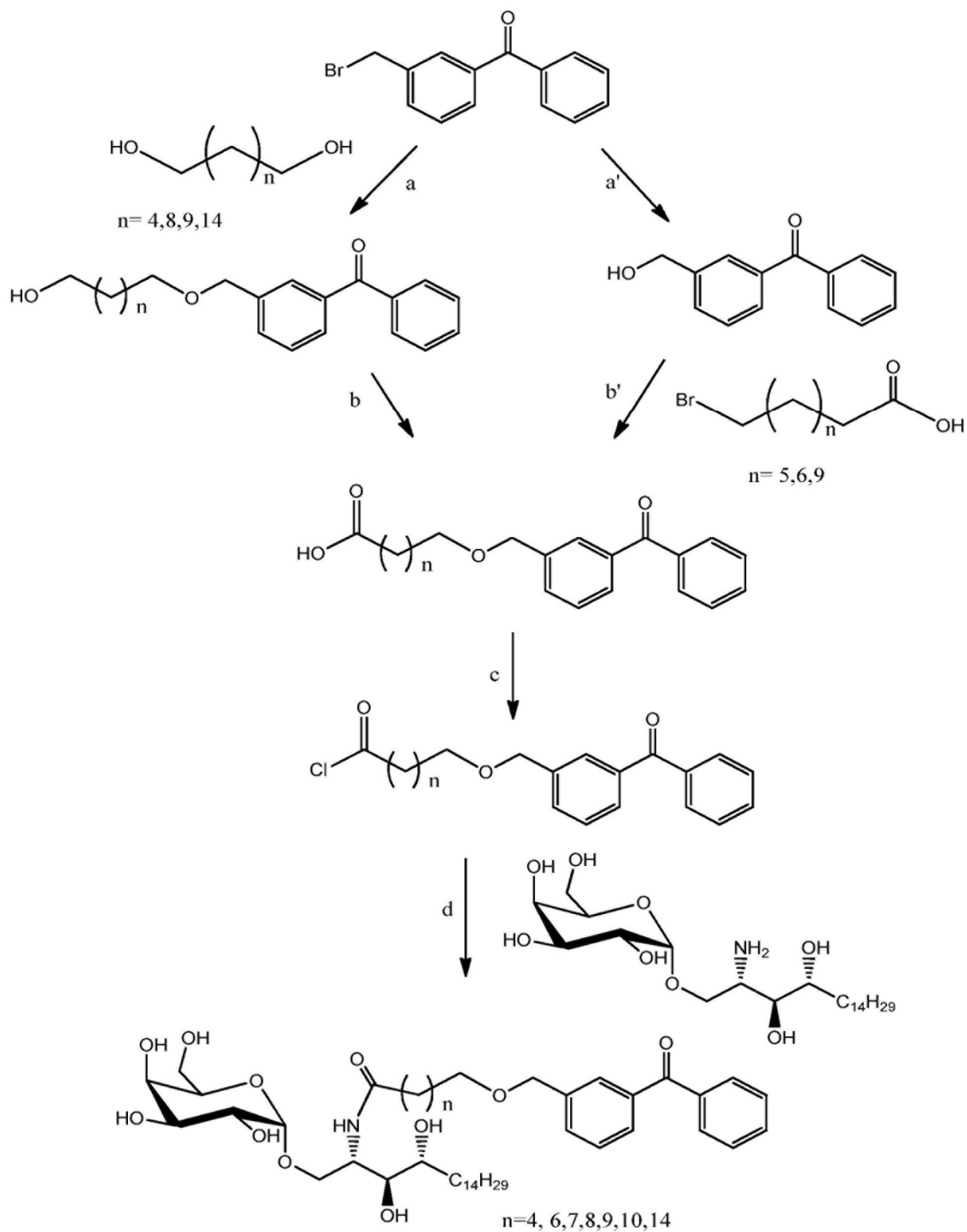


FIG. 1

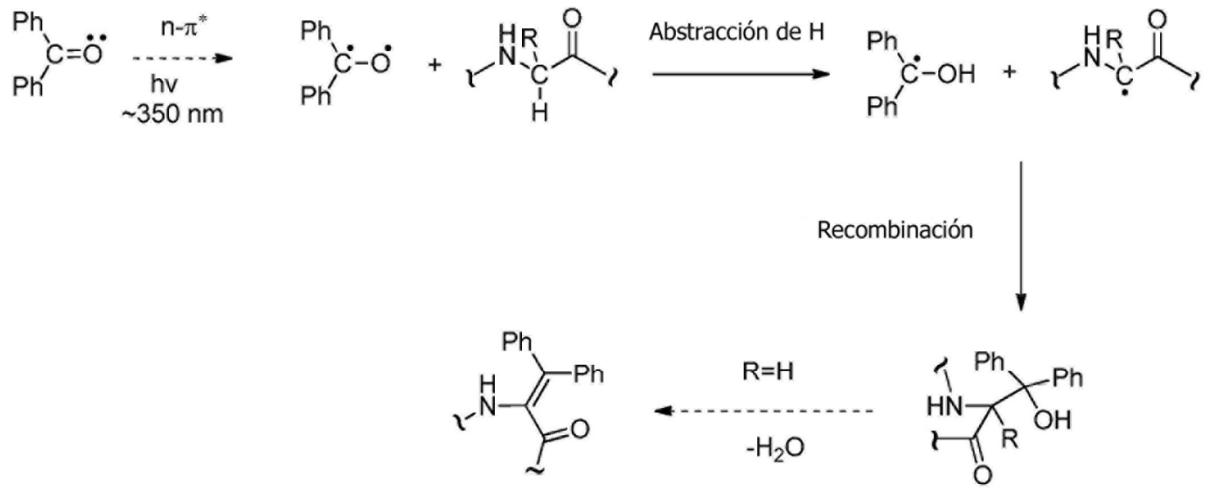


FIG. 2

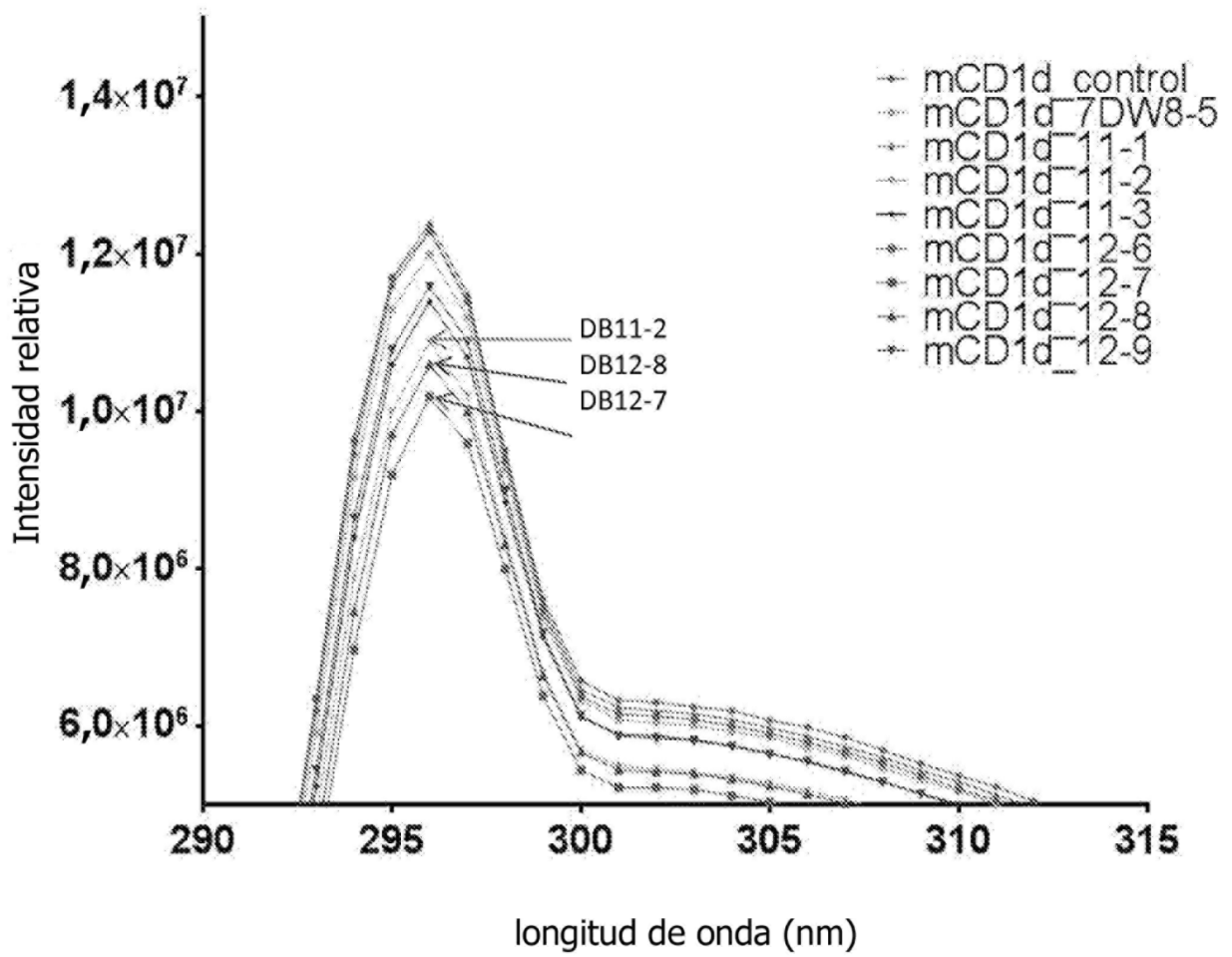


FIG. 3

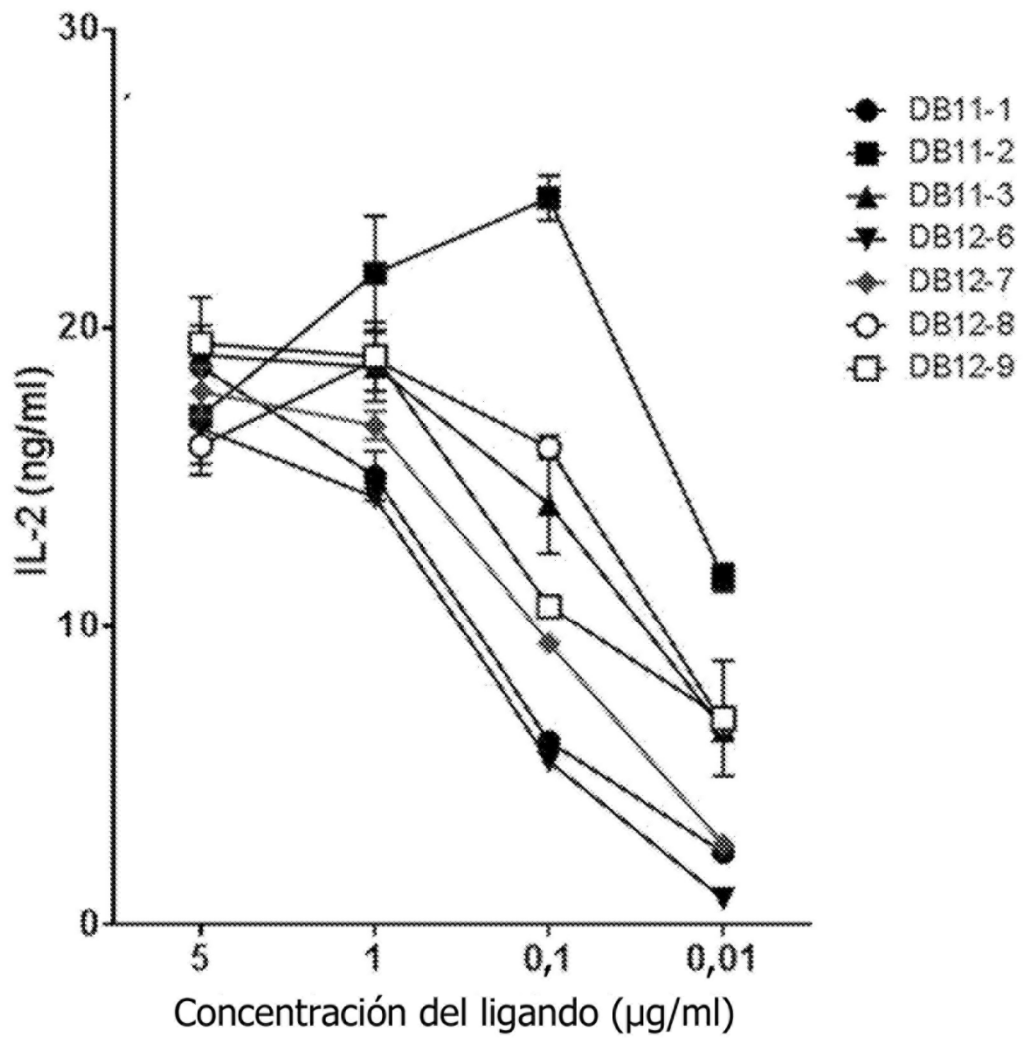


FIG. 4

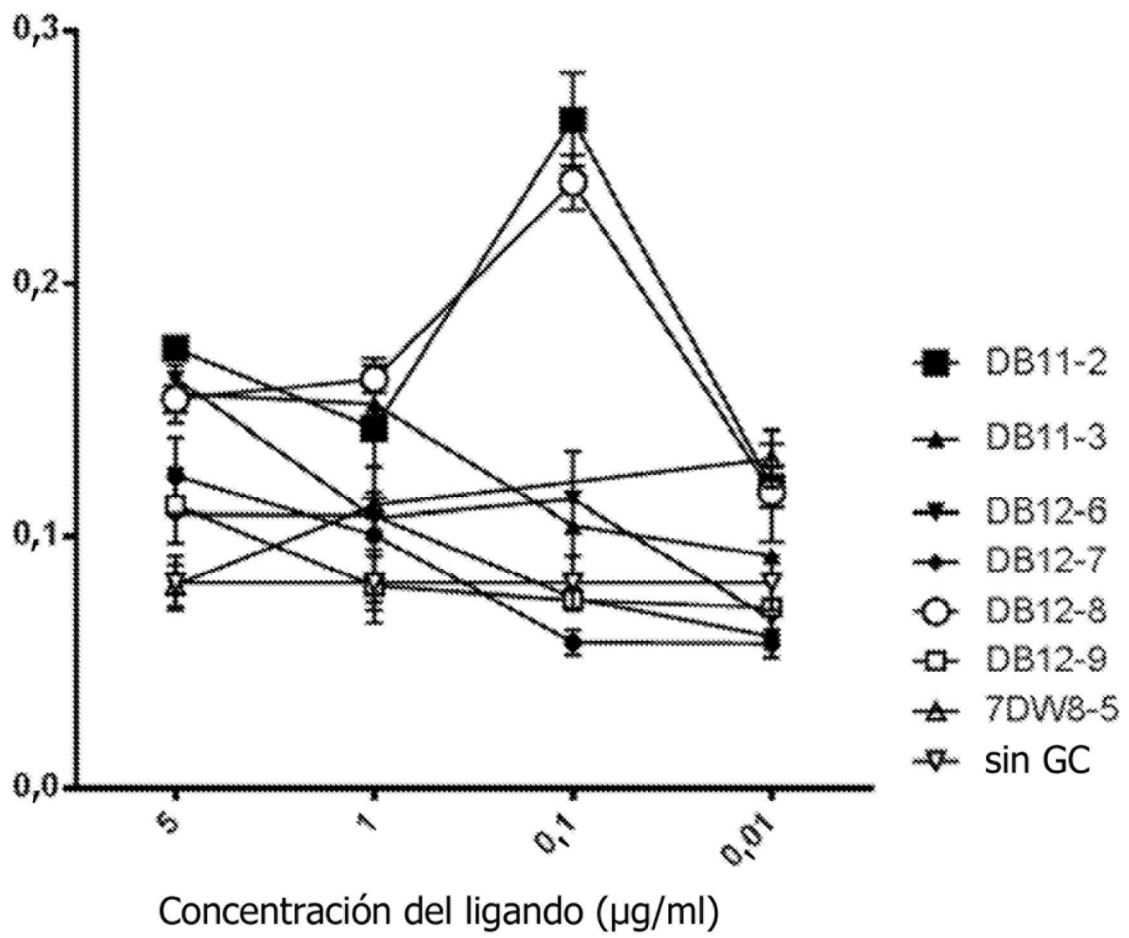


FIG. 5

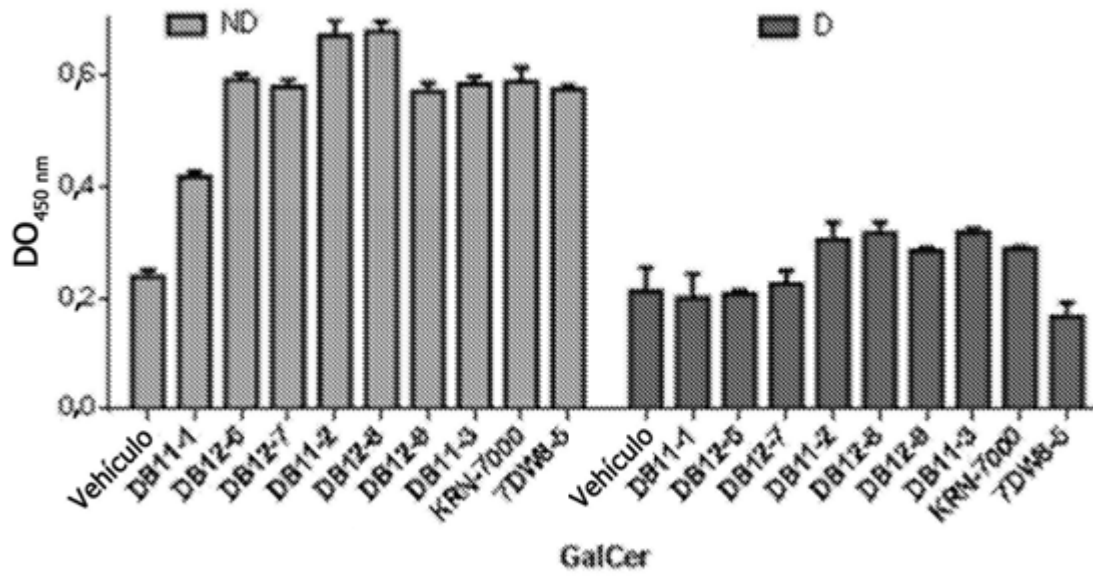


FIG. 6A

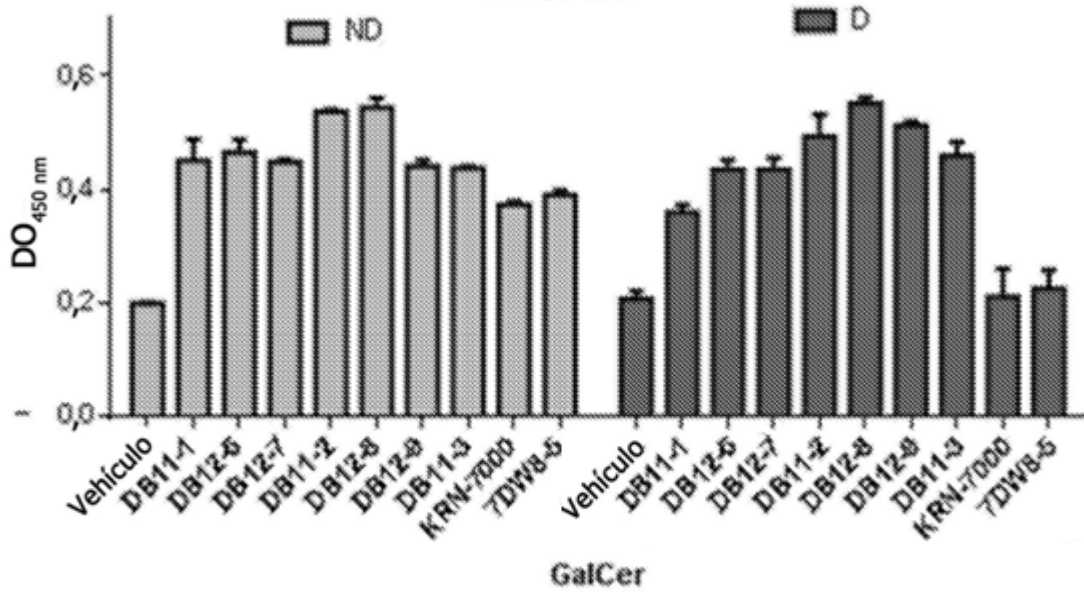


FIG. 6B

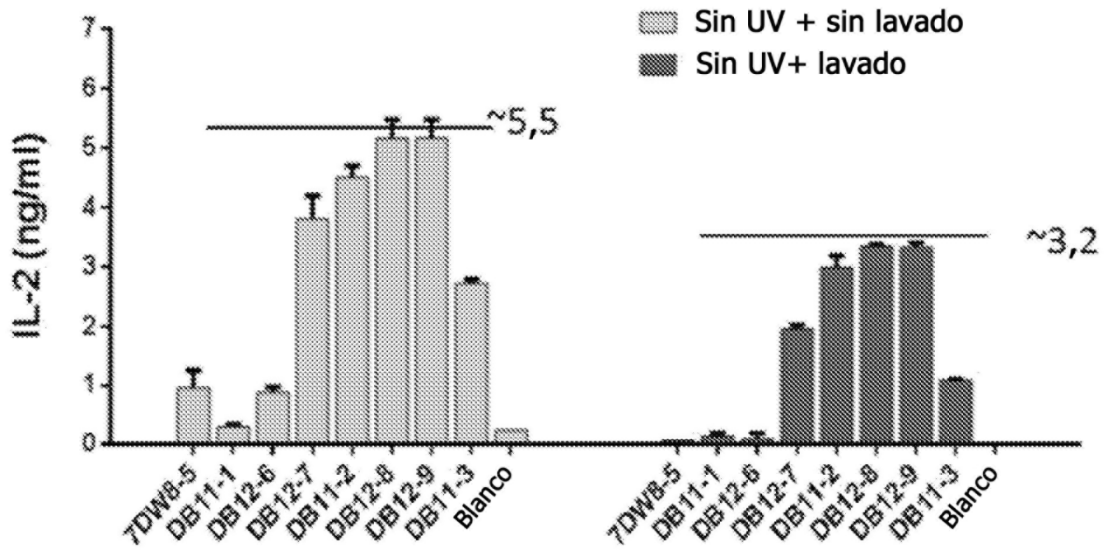


FIG. 7A

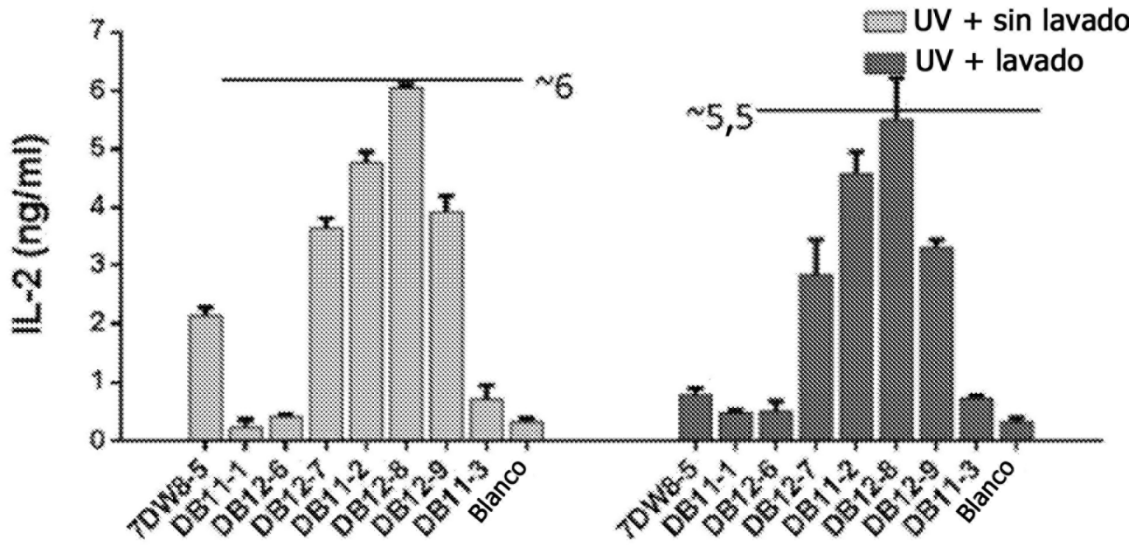


FIG. 7B

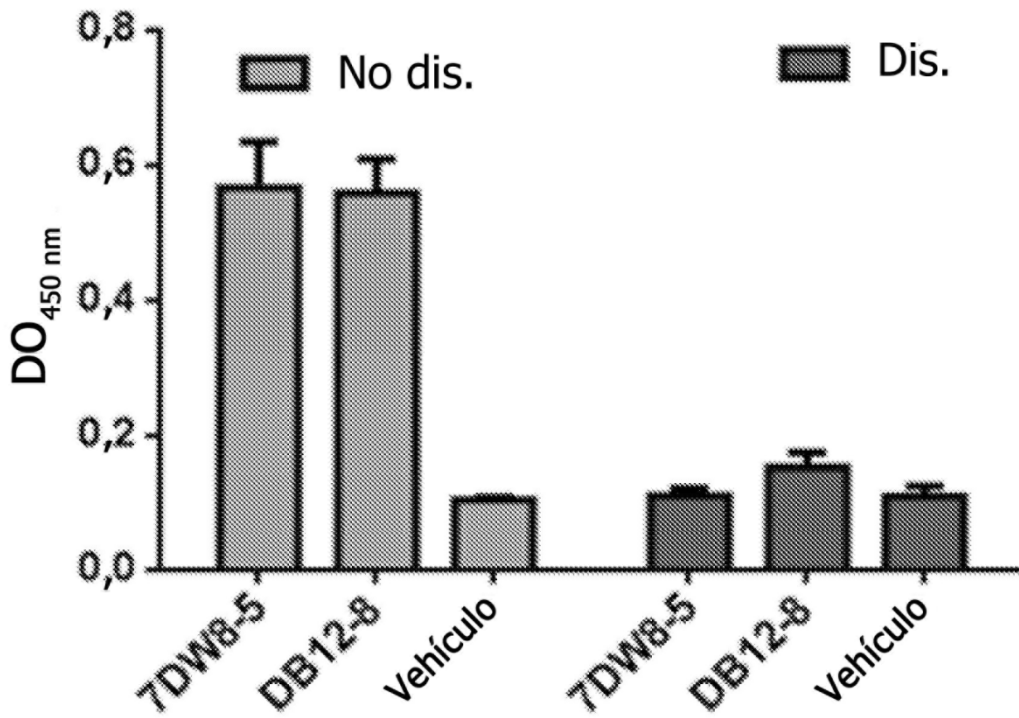


FIG. 8A

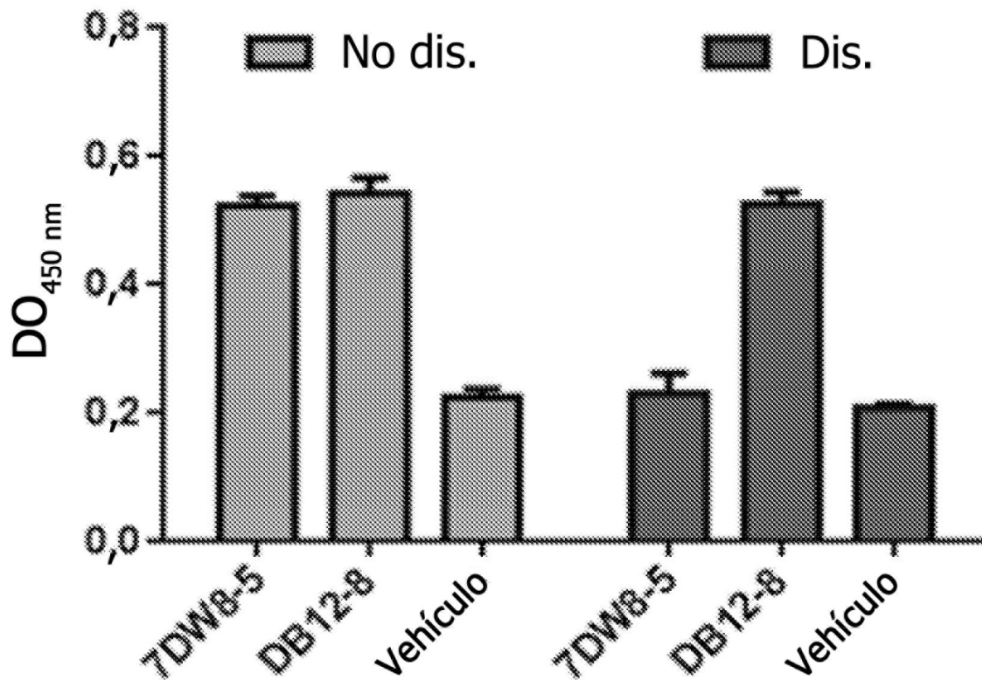


FIG. 8B

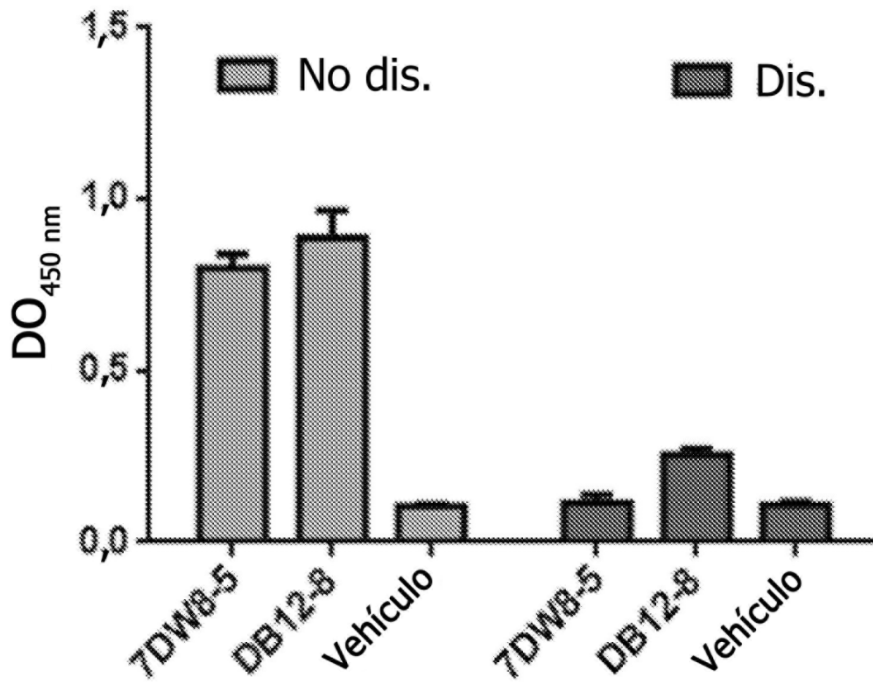


FIG. 9A

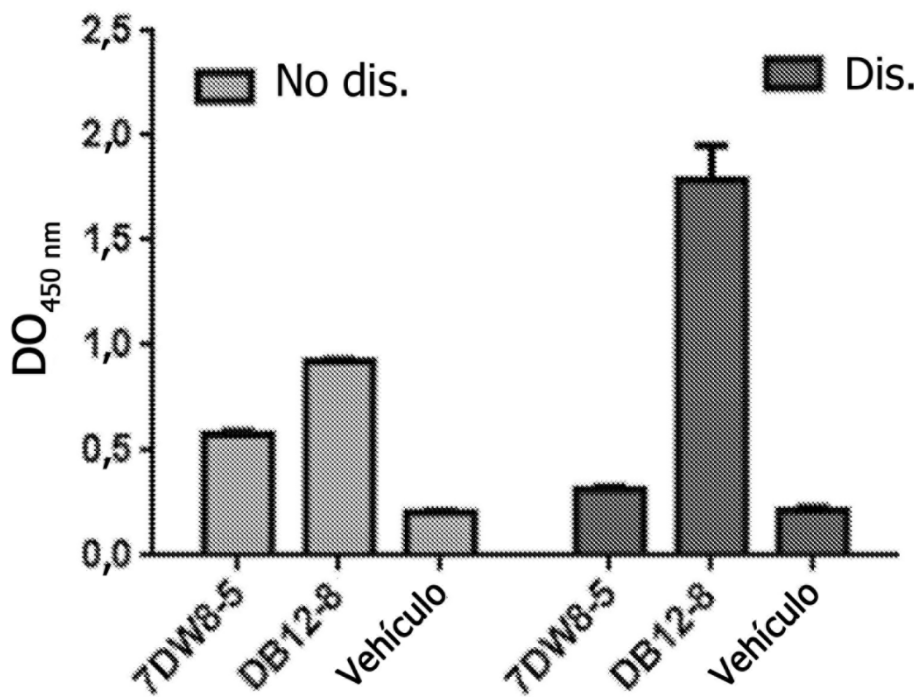


FIG. 9B

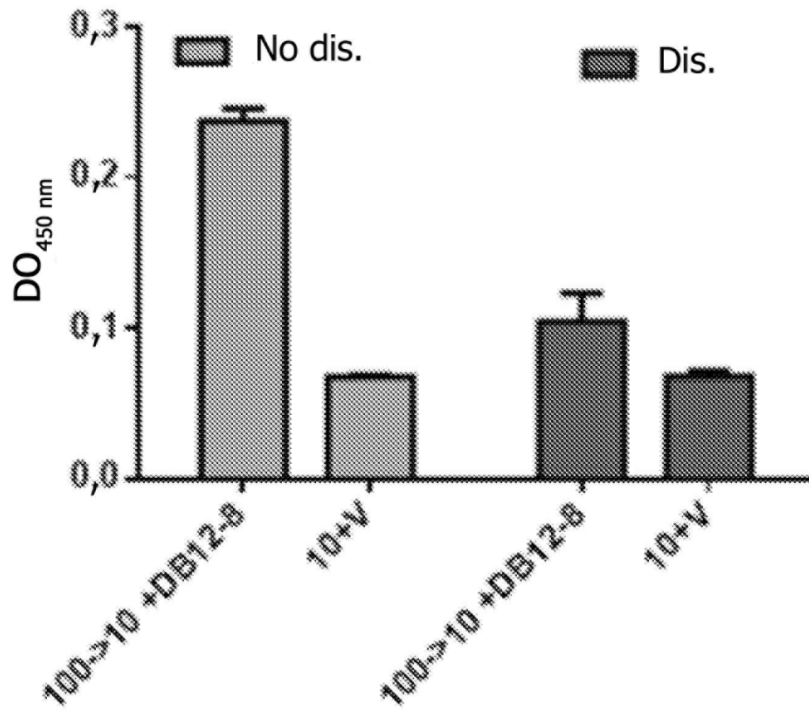


FIG. 9C

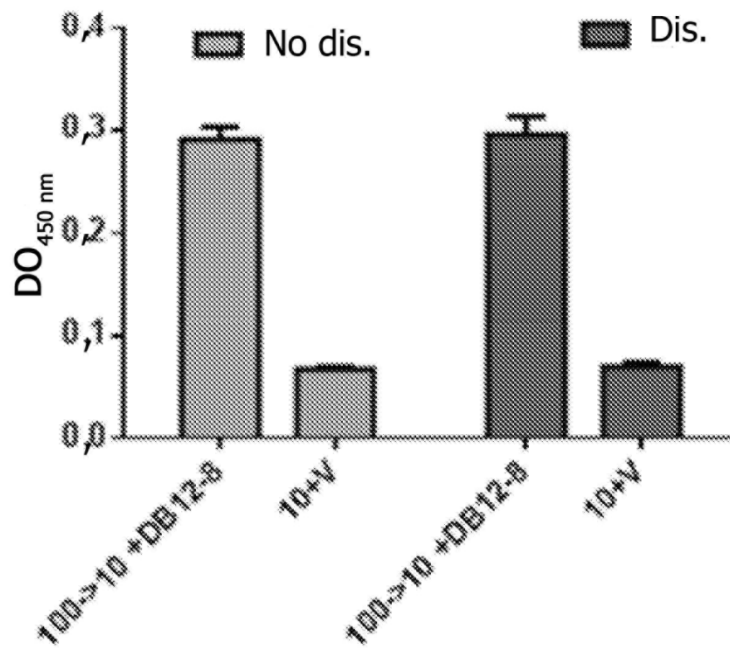


FIG. 9D

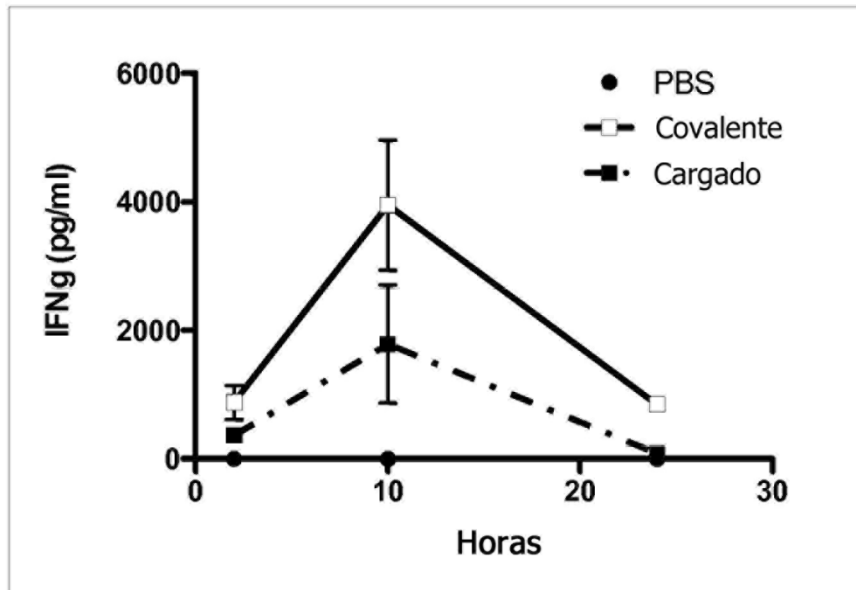


FIG. 10

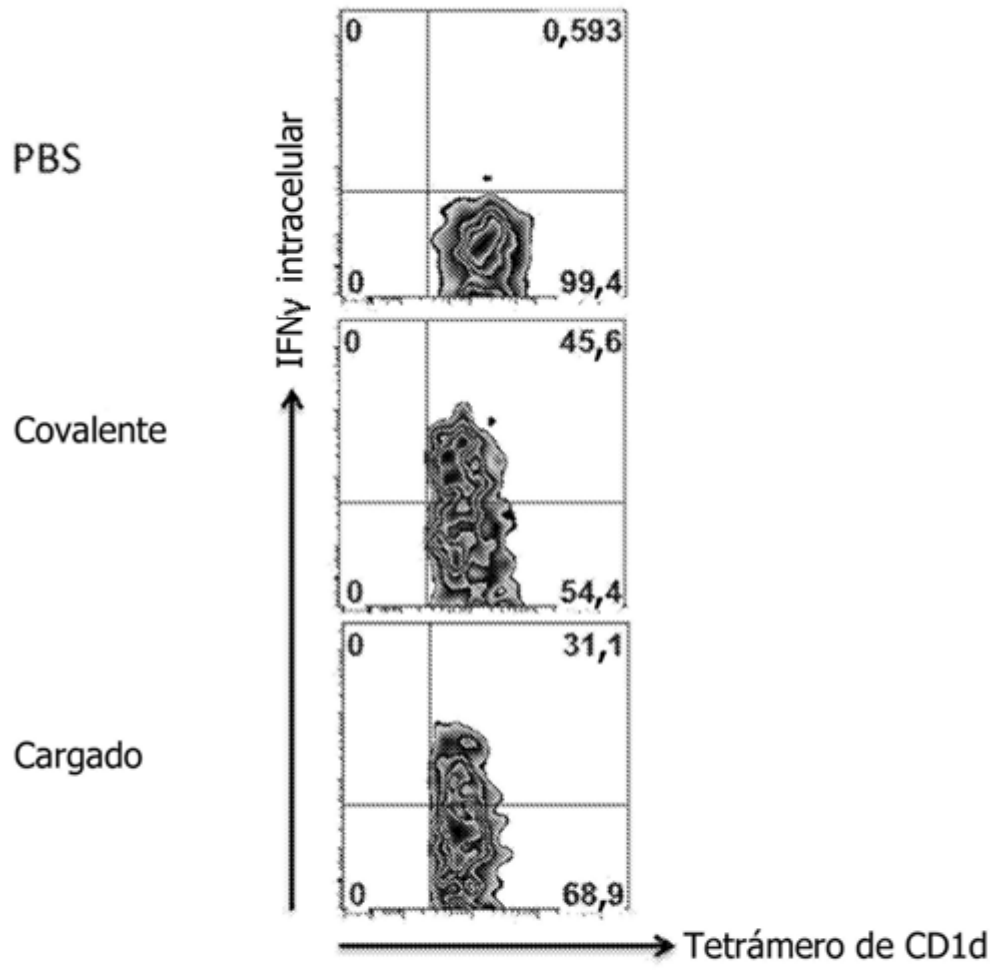


FIG. 11

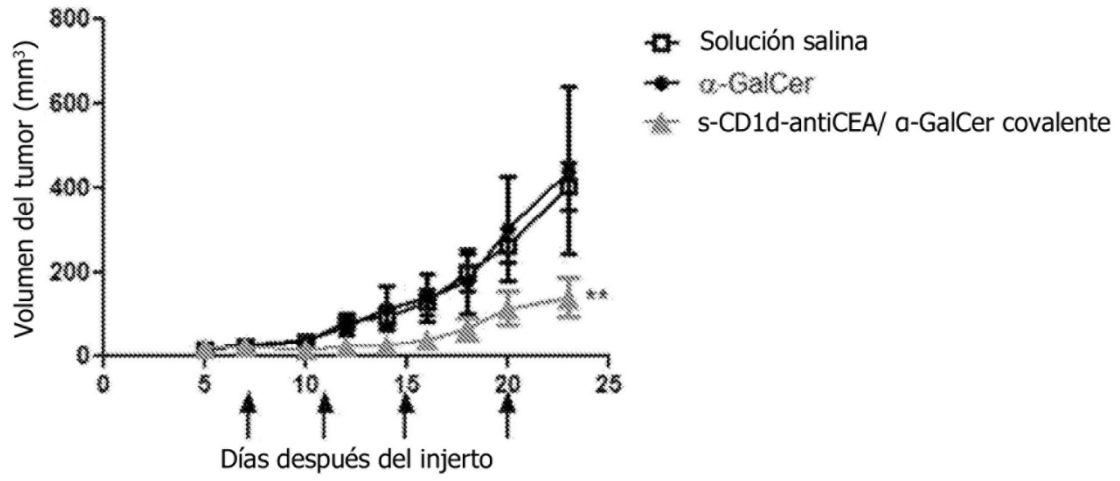


FIG. 12