

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 274**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61P 37/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2011 PCT/AU2011/001225**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12037612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2011 E 11826223 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2618842**

54 Título: **Nuevo método inmunoestimulador**

30 Prioridad:

**20.06.2011 AU 2011902408**  
**22.09.2010 AU 2010904284**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.12.2019**

73 Titular/es:

**ENA THERAPEUTICS PTY LTD (100.0%)**  
**Level 9, 31 Queen Street**  
**Melbourne, Victoria 3000, AU**

72 Inventor/es:

**JACKSON, DAVID CHARLES;**  
**TAN, AMABEL y**  
**ZENG, WEIGUANG**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 735 274 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

Nuevo método inmunoestimulador

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere a una nueva composición que comprende un resto TLR2 que comprende un agonista de TLR2 para tratar o prevenir infecciones víricas o bacterianas en el tracto respiratorio de un sujeto.

**Antecedentes**

- 10 La infección por el virus de la gripe A (IAV, por sus siglas en inglés) causa hasta mil millones de infecciones y entre 300,000 y 500,000 muertes anuales, y el brote mundial de la gripe porcina H1N1 en 2009 ha resaltado las limitadas opciones antivirales disponibles para hacer frente a una gripe pandémica. Aunque las vacunas están disponibles contra las epidemias estacionales de IAV, estas vacunas inducen anticuerpos contra las proteínas de superficie de neuraminidasa y hemaglutinina de IAV que están en constante evolución y, por lo tanto, requieren una nueva formulación y administración anual. Además, estas vacunas generalmente no son efectivas contra los brotes pandémicos causados por virus de nueva aparición. Una alternativa es dirigirse a las regiones internas *conservadas* de IAV. Sin embargo, el reciente brote pandémico de un virus de gripe A H1N1 porcina ha llevado a la búsqueda de vacunas de protección amplia y opciones antivirales contra la gripe pandémica.

- 15 El documento WO 2004/014957 describe moléculas de lipopéptidos inmunogénicos sintéticos que comprenden epítomos co-lineales de linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés), métodos para su producción y uso en la generación de respuestas inmunitarias primarias y secundarias y para la vacunación de sujetos animales contra epítomos de CTL particulares.

- 20 La presente invención se refiere al desarrollo de un enfoque alternativo para el tratamiento de la gripe así como de otras enfermedades infecciosas y de cánceres.

**Compendio de la invención**

- 25 La presente invención proporciona una composición que comprende un resto TLR2 soluble para uso para tratar o prevenir una o más infecciones virales o bacterianas en el tracto respiratorio de un sujeto, en donde el resto TLR2 comprende un agonista de TLR2 conjugado con un agente solubilizante, en donde el agonista de TLR2 es un lipopéptido seleccionado del grupo que consiste en Pam2Cys, Pam3Cys, Ste2Cys, Lau2Cys y Oct2Cys, y el agente solubilizante es PEG (polietilenglicol) o un polipéptido polar seleccionado del grupo que consiste en R4, H4, E8, E8 y H8 ramificados, en donde la composición no induce una respuesta inmunitaria humoral o celular específica dirigida contra un agente que causa la infección mencionada anteriormente, y no comprende un antígeno que puede provocar una respuesta inmunitaria contra un agente que causa la infección mencionada anteriormente, y en donde la composición es administrada por vía intranasal.

**Breve descripción de las figuras.**

- 35 La Figura 1 muestra una representación esquemática de las vacunas de lipopéptidos candidatas. Representación esquemática de construcciones basadas en Pam2Cys. (A) Pam2Cys pegilado (Pam2Cys-PEG<sub>11</sub>) consiste en una única molécula de Pam2Cys acoplada a undecaetilenglicol (polietilenglicol, PEG) a través de dos serinas. (B) Las vacunas de lipopéptidos candidatas basadas en Pam2Cys están compuestas por un epítomo de células T CD8<sup>+</sup> diana y un epítomo de T cooperadoras unidos a través de un único resto de lisina (K). La parte lipídica de Pam2Cys se une a través de dos restos de serina (Ser) para formar una estructura peptídica ramificada.

- 40 La Figura 2 muestra que la administración intranasal de lipopéptidos expande las poblaciones de células pulmonares. Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intranasal con 25 nmoles del lipopéptido OT2-P2C-gB<sub>498-505</sub> o 25 nmoles del péptido OT2-gB<sub>498-505</sub> (que carece de Pam2Cys) y la caracterización de las poblaciones de células pulmonares se realizó en los intervalos de tiempo indicados (n=3/grupo/intervalo de tiempo). (A) Se muestra el número total de células pulmonares. Los símbolos representan el conteo celular promedio y las barras de error indican el SEM, #=P<0.01 frente al día 0. (B) Se muestra la composición de las células pulmonares. Cada barra representa el recuento celular promedio (n=3) y las barras de error indican la DE, \*=P<0.05 frente a la población de células en el día 0. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el análisis ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunnett. Un experimento repetido dio resultados similares.

- 50 La Figura 3 muestra que los lipopéptidos basados en Pam2Cys mejoran el aclaramiento de IAV. (A) Los ratones se inocularon con solución salina, IAV-LP (que contiene un epítomo derivado de IAV) o no-IAV-LP y se provocaron al día 3 (panel superior) o al día 7 (panel inferior) después de la inoculación de lipopéptidos con 10<sup>4.5</sup> ufp del virus de la gripe Mem71 (H3N1) (n=3-5/grupo). Los títulos virales en pulmón se evaluaron en el día 5 de la infección y se muestran para ratones BALB/c (◇), C57BL/6 (□) y HHD (O). Los símbolos representan el título obtenido de un ratón individual y la línea indica el título medio de virus del grupo. (B) El porcentaje de aclaramiento viral en relación con la solución salina control se muestra sobre los grupos de lipopéptidos. Se detectaron respuestas de células T CD8<sup>+</sup> específicas de IAV de ratones C57BL/6 expuestos con Mem71 el día 7 después de la inoculación de LP. En el día 5 de la

provocación, se detectaron células T CD8<sup>+</sup> específicas de PA<sub>224-233</sub> del bazo utilizando un ensayo de tinción intracelular para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Las barras indican la respuesta media específica de citoquinas en cada grupo y las barras de error indican la DE. \*= $P < 0.05$ , \*\*= $P < 0.01$  frente a solución salina (análisis ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunnett).

La Figura 4 muestra que los lipopéptidos basados en Pam2Cys reducen el impacto de una infección IAV altamente patógena. Paneles superiores: gráfico de Kaplan-Meier que muestra la supervivencia de ratones C57BL/6 (a mano izquierda) y ratones HHD (a mano derecha) inoculados por vía intranasal con solución salina, IAV-LP o no-IAV-LP (n=5/grupo) y provocados 7 días después con el virus H1N1 PR8. Paneles inferiores: Cambios en el peso corporal tras la infección. Los símbolos indican la media y las barras de error indican la SEM. Estos resultados se reflejaron en una repetición independiente del experimento en ambas cepas de ratón.

La figura 5 muestra Pam2Cys en el entorno de las citoquinas pulmonares. A los ratones C57BL/6 se les administró 20 nmol de Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> (P2C-PEG<sub>11</sub>) o 50  $\mu$ l de solución salina (i.n) y la concentración de citoquinas en el lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés) se determinó en el día 3 (D3) o 7 (D7) posterior a la administración utilizando una matriz citométrica de perlas BD<sup>TM</sup>. Las barras representan la respuesta media de cada grupo (n=3) y las barras de error indican la DE, \*= $P < 0.05$ ; \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$  frente a los grupos de solución salina y sin tratamiento previo (ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple post-hoc de Tukey).

La figura 6 muestra que Pam2Cys media el aclaramiento viral. Los ratones se inocularon con solución salina o 20 nmol de Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> y se provocaron 1 (panel superior), 3 (panel central) o 7 (panel inferior) días después con 10<sup>4.5</sup> ufp de virus Mem71 (H3N1) (n=3-5/grupo). Los títulos víricos se evaluaron el día 5 de la infección en ratones BALB/c ( $\diamond$ ), C57BL/6 ( $\square$ ) y HHD (O). Los símbolos representan el título obtenido de un ratón individual y la línea indica el título medio del virus del grupo, \*= $P < 0.05$  frente a la solución salina (prueba t de Student no pareada). El porcentaje de aclaramiento viral en relación con el grupo de solución salina se indica sobre la respuesta Pam2Cys.

La Figura 7 muestra que la administración intranasal de Pam2Cys expande las subpoblaciones celulares en el pulmón. A los ratones C57BL/6 se les administró 20 nmol de Pam2Cys pegilado (P2C-PEG<sub>11</sub>) o 50  $\mu$ l de solución salina (i.n) y las poblaciones de células pulmonares se caracterizaron 72 horas después de la administración. Las barras representan la respuesta media de cada grupo (n= 3) y las barras de error indican la DE, \*= $P < 0.05$ ; grupo de solución salina (prueba t de Student no pareada).

La Figura 8 muestra que Pam2Cys protege contra la infección virulenta por IAV. Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intranasal con solución salina o 20 nmol de Pam2Cys pegilado (P2C-PEG<sub>11</sub>) (n=5/grupo) y se provocaron 7 días después con 200 ufp de virus H1N1 PR8. Un grupo de ratones recibió 20 nmol de P2C-PEG<sub>11</sub> y se provocó 72 h después. Los cambios en el peso corporal después de la infección se muestran como un porcentaje del peso original. Los símbolos indican la media y las barras de error indican la SEM. Estos resultados se reflejaron en una repetición independiente del experimento.

La Figura 9 muestra que la profilaxis con Pam2Cys reduce las cargas virales y la transmisión de la gripe por contacto. Los ratones BALB/c se inocularon con solución salina (barras blancas) o 20 nmol de Pam2Cys pegilado (P2C-PEG<sub>11</sub>) (barras grises) y se provocaron con los 7 días, 5 días, 72 horas o 24 horas después con 10<sup>4.5</sup> ufp de virus Udm (H3N2) (n=2/grupo). Estos ratones se designaron como los ratones propagadores. Veinticuatro horas después de la provocación, los ratones propagadores se alojaron conjuntamente con ratones receptores sin tratamiento previo. Después de 24 horas de alojamiento conjunto, se retiraron los ratones propagadores y se extrajeron los cornetes nasales, la tráquea y los pulmones y se determinaron los títulos virales (panel superior). Los órganos de los ratones receptores se recolectaron 3.5 días después de la provocación con los ratones propagadores y se evaluaron los títulos virales (panel inferior). Las flechas blancas o grises indican una transmisión exitosa mediada por contacto del grupo de tratamiento respectivo a los receptores alojados conjuntamente.

La Figura 10 muestra que PEG-Pam2Cys protege en una dosis única contra IAV cuando se administra por vía intranasal. A los ratones se les administró de forma profiláctica PEG-Pam2Cys (20 nmol) a través de las vías intranasal (i.n), subcutánea (s.c) o intravenosa (i.v) y 3 días después se provocaron con una dosis letal de virus PR8. Después, los ratones se monitorizaron durante un período de 8 días post-PR8 para determinar el peso corporal y la supervivencia y se sacrificaron en un punto final humanitario.

La Figura 11 muestra que varias variantes de Pam2Cys también confieren protección contra la provocación con IAV. A los ratones se les administró de forma profiláctica 20 nmol de varias construcciones que contienen Pam2Cys a través de la vía intranasal y 3 días después se provocaron con una dosis letal de virus PR8. Después, los ratones se monitorizaron durante un período de 8 días después de la provocación con PR8 para determinar el peso corporal (A) y la supervivencia (B). La reducción en el peso corporal observada en el grupo de *solución salina* fue estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ) en comparación con cada uno de los otros grupos de tratamiento.

La Figura 12 muestra que PEG-Pam2Cys es eficaz cuando se administra en una dosis repetida. A los ratones Balb/c se les administró una dosis única de PEG-Pam2Cys, o dos dosis de PEG-Pam2Cys con tres semanas de diferencia y después se provocaron con PR8 tres días después de la segunda dosis. Después, los ratones se monitorizaron durante un período de 8 días después de la provocación para determinar el peso corporal y la supervivencia y se sacrificaron

el día 7 después de la provocación con PR8 para evaluar la carga viral pulmonar. La reducción en el peso corporal observada en el grupo de *solución salina* fue estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ) en comparación con cada uno de los otros grupos de tratamiento (A). Las cargas virales en ratones tratados con PEG-Pam2Cys fueron sustancialmente más bajas que en ratones que recibieron solo solución salina (B).

La Figura 13 muestra que dosis más bajas de PEG-Pam2Cys también son efectivas. Los ratones se trataron de forma profiláctica con dosis más bajas de PEG-Pam2Cys a 2, 5 y 10 nmoles (c.f. 20 nmoles) y se provocaron 3 días después con una dosis letal de virus PR8. Los ratones se monitorizaron durante un período de 18 días después de la provocación para detectar cambios en el peso corporal y la supervivencia y se sacrificaron en un punto final humanitario. Los ratones dentro del grupo de *solución salina* no sobrevivieron más allá del día 8 después de la provocación con PR8.

La Figura 14 muestra que la protección contra la provocación con IAV no es dependiente de los interferones IFN- $\gamma$  o tipo 1 (es decir, IFN- $\alpha$ ). A los ratones deficientes en IFN- $\gamma$  (B6.IFN- $\gamma$ -/-) (A) o el receptor de interferón Tipo 1 (IFNAR-/-) (B) se les administró de forma profiláctica 20 nmoles de PEG-Pam2Cys (i.n) y 3 días después se provocaron con una dosis letal de virus PR8. Estos ratones estaban protegidos contra la pérdida de peso y la letalidad asociada a la infección por PR8. La cohorte B6.IFN- $\gamma$ -/- se sacrificó el día 5, cuando el grupo de solución salina alcanzó un punto final humanitario.

La Figura 15 muestra que PEG-Pam2Cys es eficaz como agente terapéutico. Los ratones Balb/c se provocaron vía i.n. con  $10^{4.5}$  UFP del virus Udom y 4 horas después se les administró 20 nmol de PEG-Pam2Cys (i.n). Dos días después, los animales se sacrificaron y se determinaron las cargas virales en la nariz, orofaringe, tráquea y pulmón.

La Figura 16 muestra que PEG-Pam2Cys es eficaz como agente antibacteriano. Los ratones C57BL/6 ratones se trataron previamente (i.n) con 20 nmol de PEG Pam2Cys y 3 días después se provocaron con  $1 \times 10^6$  UFC de *L. pneumophila* (cepa JR32  $\Delta$ fla). Los ratones se monitorizaron diariamente después de la provocación intranasal con *L. pneumophila* y la carga bacteriana en los pulmones de los ratones se evaluó 1, 2 y 3 días después de la provocación (A). Cada símbolo representa la carga bacteriana media obtenida en cada punto de tiempo y las barras de error representan la desviación estándar (DE). La significación estadística se denota mediante \* ( $p < 0.05$ ) que se obtuvo mediante la prueba t de Student que compara los grupos de tratamiento con solución salina y PEG-Pam2Cys. El porcentaje medio de reducción bacteriana en relación con el grupo de solución salina se muestra sobre cada símbolo. Para demostrar la ventana de protección de PEG-Pam2Cys, los ratones se trataron previamente con PEG-Pam2Cys 3 días (B) o 7 días (C) antes de la provocación con *L. pneumophila*. La carga bacteriana en el día 3 después de la infección se muestra en las Figuras B y C.

### Descripción detallada

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un elemento o entero o grupo de elementos o enteros indicado o indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

En esta especificación, el término "TLR2" pretende significar proteína del receptor 2 tipo Toll. TLR2 es una familia de proteínas receptoras de membrana de receptores tipo Toll (es decir, "TLRs", por sus siglas en inglés) que incluyen TLR1, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 y TLR9. En los seres humanos, TLR2 está codificado por el gen *TLR2*. TLR2 se expresa en la superficie de ciertas células y desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata.

Un agonista de TLR2 es un agente que se une al receptor tipo Toll 2. El agonista de TLR2 se puede unir a TLR2 como homodímero o heterodímero. En la presente invención, los agonistas de TLR2 son lipopéptidos seleccionados del grupo que consiste en Pam2Cys, Pam3Cys, Ste2Cys, Lan2Cys y Oct2Cys.

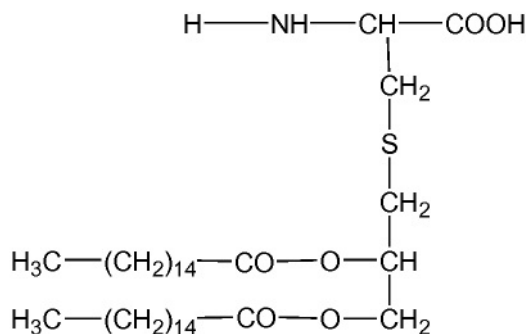
La presente invención se basa en la observación de que un agonista de TLR2, tal como se definió anteriormente, tal como S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína (Pam2Cys) demuestra la capacidad de generar una respuesta inmunitaria innata en un sujeto y provocar un efecto profiláctico y terapéutico contra un agente infeccioso seleccionado de un virus (p. ej., Influenza A) y bacterias (p. ej., *L. pneumophila*) de una manera no antígeno específica.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición que comprende un resto TLR2 soluble para uso para tratar o prevenir una o más infecciones virales o bacterianas en el tracto respiratorio de un sujeto, en donde el resto TLR2 comprende un agonista de TLR2 conjugado con un agente solubilizante, en donde el agonista de TLR2 es un lipopéptido seleccionado del grupo que consiste en Pam2Cys, Pam3Cys, Ste2Cys, Lau2Cys y Oct2Cys, y el agente solubilizante es PEG (polietilenglicol) o un polipéptido polar seleccionado del grupo que consiste en R4, H4, E8, E8 y H8 ramificados, en donde la composición no induce una respuesta inmunitaria humoral o celular específica dirigida contra un agente infeccioso que causa la infección mencionada anteriormente, y no comprende un antígeno que puede provocar una respuesta inmunitaria contra un agente infeccioso que causa la infección mencionada anteriormente, y en donde la composición se administra por vía intranasal.

Un lipopéptido ilustrativo de acuerdo con la presente invención es el lipopéptido "Pam<sub>2</sub>Cys". "Pam<sub>2</sub>Cys" (también conocido como dipalmitoil-S-gliceril-cisteína o S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína se ha sintetizado y corresponde al resto lipídico de MALP-2, un lipopéptido activador de macrófagos aislado de *Mycoplasma fermentans*. Pam<sub>2</sub>Cys es conocido por ser un ligando de TLR2.

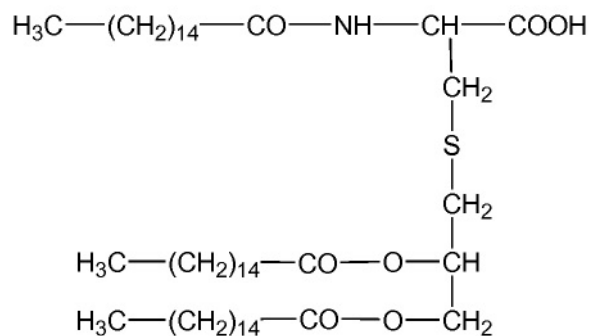
5

Pam<sub>2</sub>Cys tiene la estructura:



Otro lipopéptido ilustrativo es el lipoaminoácido N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína, también conocido como Pam<sub>3</sub>Cys o Pam<sub>3</sub>Cys-OH, es una versión sintética del resto N-terminal de la lipoproteína de Braun que abarca las membranas internas y externas de las bacterias gramnegativas. Pam<sub>3</sub>Cys tiene la siguiente estructura:

10



La patente de Estados Unidos No. 5,700,910 describe varias N-acil-S-(2-hidroalquil)cisteínas para uso como productos intermedios en la preparación de lipopéptidos que se utilizan como adyuvantes sintéticos, estimulantes de linfocitos B, estimulantes de macrófagos o vacunas sintéticas. La patente de EE.UU. 5,700,910 también enseña el uso de tales compuestos como productos intermedios en la síntesis de Pam<sub>3</sub>Cys-OH y de lipopéptidos que comprenden este lipoaminoácido o un análogo del mismo en el extremo N-terminal.

15

Además de Pam<sub>2</sub>Cys y Pam<sub>3</sub>Cys, la presente invención también contempla el uso de Set<sub>2</sub>Cys, Lau<sub>2</sub>Cys y Oct<sub>2</sub>Cys según la presente invención. Los expertos en la técnica serán conscientes de que Ste<sub>2</sub>Cys también se conoce como S-[2,3-bis(estearoiloxi)propil]cisteína o distearoil-S-gliceril-cisteína; que Lau<sub>2</sub>Cys también se conoce como S-[2,3-bis(lauroiloxi)propil]cisteína o dilauoil-S-gliceril-cisteína; y que Oct<sub>2</sub>Cys también se conoce como S-[2,3-bis(octanoiloxi)propil]cisteína o dioctanoil-S-gliceril-cisteína).

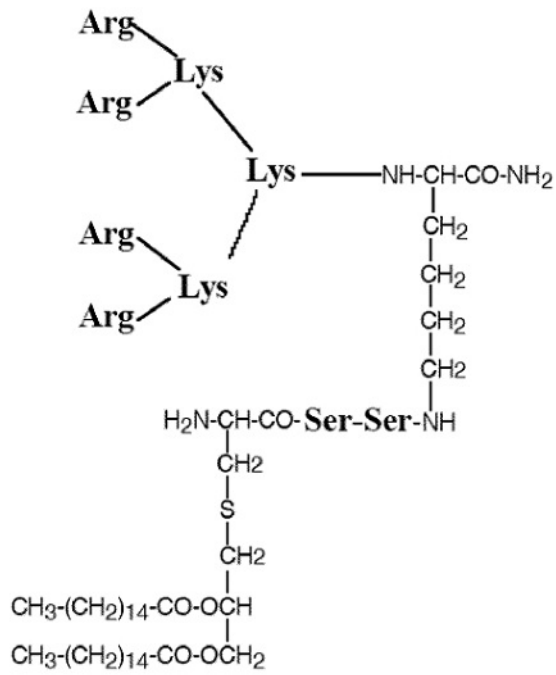
20

Como entenderán los expertos en la técnica, los agonistas de TLR2 son típicamente no polares y, por consiguiente, aunque son solubles en disolventes no polares, son solo solubles con moderación en disolventes polares y acuosos. Cuando se desea utilizar el agonista de TLR2 en un disolvente polar o acuoso, el agonista de TLR2 se puede conjugar con un agente solubilizante.

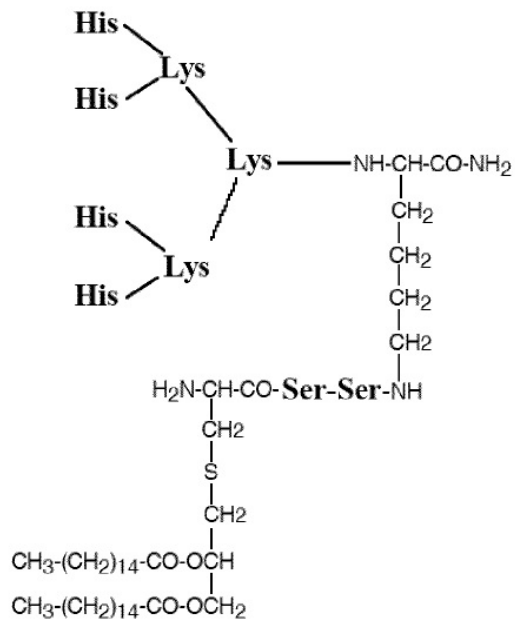
25

Según la presente invención, el agonista de TLR2 se conjuga con un agente solubilizante seleccionado de "PEG" (o polietilenglicol) y un polipéptido polar seleccionado del grupo que consiste en "R4", un complejo tetra arginina hiperramificado; "H4", un complejo tetra histidina hiperramificado; "H8", un péptido lineal que contiene restos de histidina; "E8", un péptido lineal que contiene restos de glutamato, "H8 ramificado" y "E8 ramificado", un péptido hiperramificado que contiene restos de glutamato. En una realización adicional más de la presente invención, el agente solubilizante incluye PEG y uno o más del grupo que consiste en R4, H4, H8 y E8 (lineal o ramificado). R4, H4, H8 y E8 se han descrito anteriormente en PCT/AU2009/000469 (WO/2010/115230) y tienen las siguientes estructuras:

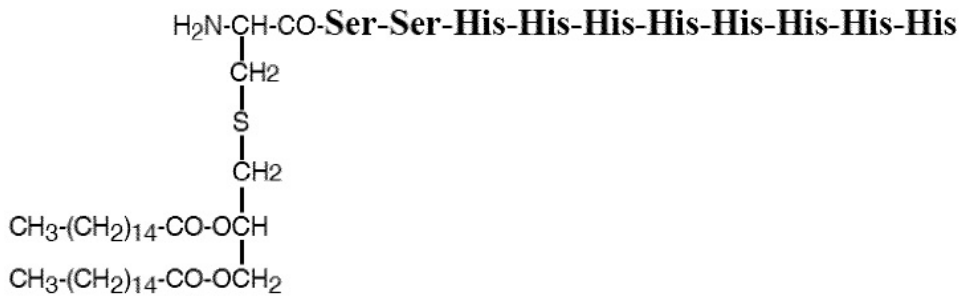
30



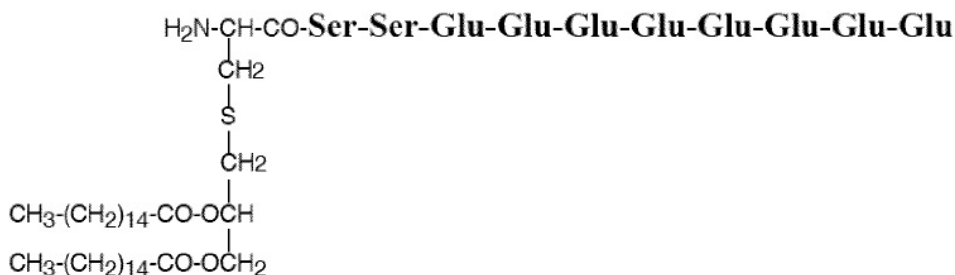
"R4"



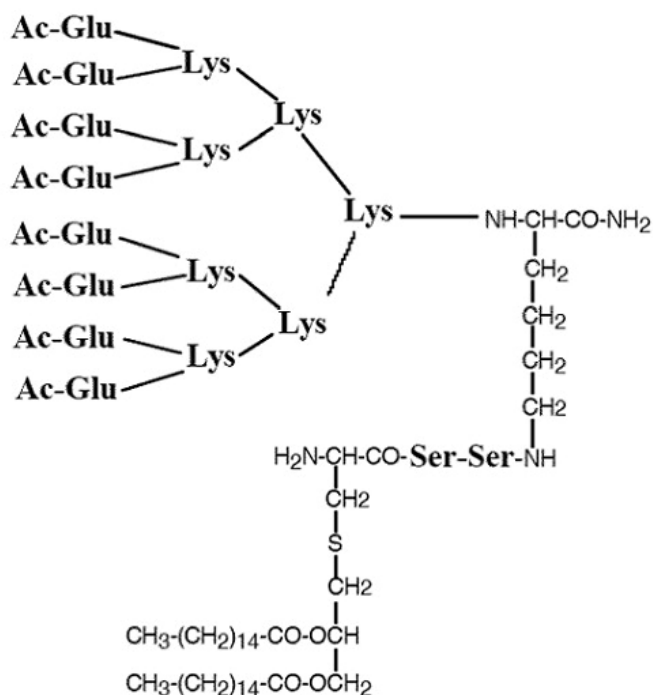
"H4"



"H8"



"E8"



"E8 ramificado"

- 5 La forma en la que el uno o más agentes solubilizantes se pueden conjugar con un lipopéptido según la presente invención sería bien conocida por un experto en la técnica. Por ejemplo, se contempla la conjugación a través de la química de Fmoc, a través de un disulfuro o un puente tioéter, o a través de la química de oxima. En una realización particular de la presente invención, se preparó una forma soluble de Pam2Cys mediante la adición de O-(N-Fmoc-2-aminoetil)-O'-(2-carboxietil)-undecaetilenglicol (Fmoc-PEG<sub>11</sub>-OH, Merck Ltd.) a Pam2Cys. Esto dio lugar a la formación de una forma pegilada del lípido, Pam2Cys-PEG<sub>11</sub>, que después es adecuada para la administración a un sujeto.
- 10 En una forma particularmente preferida según la presente invención, el resto TLR2 comprende un conjugado que comprende Pam2Cys conjugado con PEG.
- 15 Como se indicó anteriormente, los presentes autores han hecho la observación sorprendente de que Pam2Cys demuestra actividad profiláctica y terapéutica contra la infección por un agente infeccioso seleccionado de un virus (p. ej., Gripe A) y bacterias (p. ej., *L. pneumophila*) de una manera no antígeno específica. Cuando se administró por vía intranasal, una dosis única de Pam2Cys soluble proporcionó protección inmediata y significativa contra los subtipos heterólogos de la infección por gripe A en ratones C57BL/6, BALB/c y HHD, como lo demuestra la reducción de hasta un 99% en las cargas virales después de una infección leve por H3N1, y redujo significativamente la morbilidad y la mortalidad asociadas con la infección por H1N1 altamente patogénico.
- 20 Los autores también han encontrado que una composición para uso según la presente invención provoca una respuesta inmunitaria innata en un sujeto en ausencia de cualquier agonista de TLR coadministrado, que incluye un agonista de TLR9. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición para uso según la presente invención no comprende un agonista de TLR9.
- 25 Los autores han mostrado que la composición para uso según la presente invención puede generar una respuesta inmunitaria innata no específica de antígeno en un sujeto. Esto se ha demostrado mediante experimentos que implican la administración de un resto TLR2 que comprende uno o más antígenos peptídicos, en donde el antígeno peptídico

es "irrelevante" para la enfermedad a tratar o prevenir. El término "irrelevante" como se usa en la presente memoria pretende significar que no es capaz de generar una respuesta humoral o celular frente a un antígeno o antígenos específicos y, en el contexto de la presente invención, no genera una respuesta inmunitaria humoral o celular dirigida contra el resto TLR2.

Por consiguiente, la composición para uso según la presente invención puede comprender además uno o más antígenos peptídicos irrelevantes para el tratamiento o la prevención de una enfermedad que incluye, pero no se limita a epítomos de T cooperadores y/o epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL). Es importante tener en cuenta que, dado que el resto TLR2 en la composición para uso según la presente invención puede generar una respuesta inmunitaria innata en el sujeto de una manera no antígeno específica, el experto apreciará que la composición puede comprender una o más antígenos peptídicos que serán irrelevantes para la enfermedad a prevenir o tratar o la composición se puede utilizar en ausencia de uno o más antígenos peptídicos.

A modo de ilustración, la presente invención demuestra que en el tratamiento de IAV, una composición que comprende uno o más antígenos peptídicos "irrelevantes" demostró la misma capacidad para generar una respuesta inmunitaria no específica/innata de antígeno después de la administración del resto como la misma composición, pero sin el antígeno peptídico unido al mismo. En estos experimentos, los autores utilizaron una composición que comprende un resto TLR2, en donde el resto TLR2 comprendía un agonista de TLR2 (p. ej., Pam2Cys), un epítomo de T cooperador (OT2) y el epítomo de linfocitos T citotóxicos o epítomo de células T CD8<sup>+</sup> obtenido a partir del virus del herpes simple 1 (consulte la Tabla 1). Ambos epítomos son irrelevantes para IAV. Los autores han mostrado, por lo tanto, que la composición para uso según la presente invención puede generar una respuesta inmunitaria innata no dependiente de antígeno en un sujeto al que se administra.

En algunas realizaciones, la composición para uso según la presente invención es capaz de provocar una respuesta inmunitaria innata en un sujeto que tiene un efecto antiviral inmediato contra un virus después de la infección. En particular, esto significa que la administración de la composición puede tener un efecto profiláctico tras la infección viral, y en particular la infección por gripe A, en el sujeto. Por consiguiente, la composición puede ser para uso en la profilaxis de la enfermedad causada por un agente infeccioso en el sujeto como se define en las reivindicaciones. De esta manera, la composición se puede utilizar para provocar una respuesta inmunitaria innata en la profilaxis de la infección por agentes infecciosos virales o bacterianos, que incluyen, entre otros, virus de la gripe A (IAV), virus de la hepatitis C (HCV, por sus siglas en inglés), *Mycobacterium tuberculosis*, *L. pneumophila*.

La presente invención también contempla generar una respuesta inmunitaria innata en un sujeto que ya ha sido infectado o colonizado por un agente infeccioso. En particular, esto significa que la administración de la composición puede tener un efecto terapéutico después de la infección o colonización por un agente infeccioso viral o bacteriano en el sujeto. Por consiguiente, la composición puede ser para uso en el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso en el sujeto como se define en las reivindicaciones.

Los autores también han mostrado que un sujeto tratado previamente con una composición como se define en las reivindicaciones puede reducir significativamente las cargas bacterianas en el pulmón y la tráquea después de la provocación intranasal con bacterias, incluso cuando la infección por bacterias ocurre 7 días después de la administración del resto TLR2. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el agente infeccioso es una bacteria. La bacteria puede ser una bacteria intracelular, grampositiva o gramnegativa. En una realización, la bacteria incluye, pero no se limita a, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Francisella*, *Yersinia*, *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium tuberculosis*. En una realización, el agente infeccioso es *Mycobacterium tuberculosis*. En otra realización, el agente infeccioso es *Legionella pneumophila*.

En algunas realizaciones, el agente infeccioso es la causa de una infección secundaria en el sujeto (p. ej., neumonía). Por lo tanto, la composición para el uso según la presente invención también permite tratar o prevenir una infección secundaria en un sujeto generando una respuesta inmunitaria innata, en donde la infección secundaria no se trata o previene mediante una respuesta inmunitaria humoral o celular dirigida contra el resto TLR2 soluble.

Los presentes autores también han demostrado que, cuando se administra de forma profiláctica, una composición para uso según la presente invención es capaz de proporcionar protección inmediata contra una infección leve y patógena por un agente infeccioso tal como Gripe A y que esta protección está asociada con la afluencia de mediadores inmunes innatos en el pulmón. Esta actividad antiviral no es específica de antígeno.

El término "sujeto", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un animal, en particular a un mamífero y más particularmente a un primate que incluye un primate inferior y aún más particularmente, a un ser humano que se puede beneficiar del protocolo médico descrito en la presente memoria. Un sujeto, independientemente de si un animal o embrión humano o no puede ser referido como un individuo, sujeto, animal, paciente, anfitrión o receptor. La presente invención tiene aplicaciones tanto humanas como veterinarias. Por conveniencia, un "animal" incluye específicamente animales de ganado tales como ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos, camélidos, cabras y burros. Con respecto a los caballos, estos incluyen los caballos utilizados en la industria de las carreras, así como los utilizados recreativamente o en la industria ganadera. Ejemplos de animales de prueba de laboratorio incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsteres. Los conejos y los animales roedores, como las ratas y los ratones, proporcionan un



sistema de prueba o modelo animal conveniente, al igual que los primates y los primates inferiores. En algunas realizaciones, el sujeto es humano.

5 La composición para uso según la presente invención se debe administrar en una cantidad eficaz. Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" de un resto TLR2, como se utiliza en la presente memoria, significan una cantidad suficiente para proporcionar en el curso el efecto terapéutico o fisiológico deseado en al menos un número estadísticamente significativo de sujetos. Los efectos indeseables, p. ej., los efectos secundarios, a veces se manifiestan junto con el efecto terapéutico deseado; por lo tanto, un profesional equilibra los beneficios potenciales contra los riesgos potenciales al determinar cuál es una "cantidad eficaz" apropiada. La cantidad exacta requerida 10 variará de un sujeto a otro, según la especie, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración y similares. Por lo tanto, puede que no sea posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una "cantidad eficaz" apropiada en cualquier caso individual se puede determinar por un experto en la técnica utilizando solo la experimentación rutinaria. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz para un sujeto humano se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0.1 nmol/kg de peso corporal/dosis a 1 mol/kg de peso corporal/dosis. En algunas 15 realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 1 nmol a 1 mol, de aproximadamente 1  $\mu$ mol a 1 mol, de 1  $\mu$ mol a 500  $\mu$ mol, de 1  $\mu$ mol a 250  $\mu$ mol, de 1  $\mu$ mol a 50  $\mu$ mol, o de 1 nmol a 1  $\mu$ mol/kg de peso corporal/dosis. En algunas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 0.08  $\mu$ mol a 0.11  $\mu$ mol/kg de peso corporal/dosis del resto TLR2. Los regímenes de dosificación se ajustan para adaptarse a las exigencias de la situación y se pueden ajustar para producir la dosis terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden proporcionar varias dosis diarias, semanales, mensuales u otros intervalos de tiempo apropiados. 20

Los términos "tratamiento" o "que trata" incluyen pero no se limitan a, (i) ralentizar o detener la progresión de la enfermedad, (ii) revertir parcialmente la progresión de la enfermedad y (iii) revertir completamente la progresión de la enfermedad (es decir, curando la enfermedad). Los términos "prevenir" o "que previene" no se deben interpretar como 25 que se limitan a la prevención completa de la enfermedad (es decir, hacer que la enfermedad no se desarrolle), sino que pueden incluir minimizar la progresión de la enfermedad, por ejemplo, cuando la enfermedad ocurre con menos intensidad o progresa a un ritmo más lento en un sujeto como resultado de la administración profiláctica de la composición.

La composición para uso según la invención se puede administrar en una dosis única o en una serie de dosis. La formulación de tales composiciones, preferiblemente composiciones farmacéuticas, es bien conocida por los expertos en la técnica. La composición puede contener cualquier vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. 30 Las cantidades de dosis adecuadas y los regímenes de dosificación pueden ser determinados por el médico a cargo y pueden depender del trastorno particular que se esté tratando, la gravedad del trastorno, así como la edad general, la salud y el peso del sujeto.

Por vehículo, excipiente o diluyente "farmacéuticamente aceptable" se entiende un vehículo farmacéutico que comprende un material que no es biológicamente o de otra manera no deseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto junto con el conjugado seleccionado sin causar ninguna reacción adversa o una reacción adversa sustancial. Los vehículos pueden incluir excipientes y otros aditivos tales como diluyentes, detergentes, 35 agentes colorantes, agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH, conservantes y similares. Los vehículos también pueden incluir todos los disolventes convencionales, medios de dispersión, rellenos, vehículos sólidos, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes de penetración dérmica, agentes tensioactivos, agentes isotónicos y de absorción y similares. Se entenderá que las composiciones para uso de acuerdo con la invención también pueden incluir otros agentes complementarios fisiológicamente activos. 40

Por consiguiente, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica para uso según la invención que comprende una cantidad eficaz de un resto TLR2 en solución junto con un vehículo o excipiente 45 farmacéuticamente aceptable.

La composición para uso según la presente invención se debe administrar por vía intranasal. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía intranasal.

## Ejemplos

### Materiales y Métodos

50 Síntesis, purificación y autenticación de péptidos y lipopéptidos. La síntesis de lipopéptidos y péptidos se llevó a cabo mediante síntesis en fase sólida convencional utilizando la química de Fmoc (9-fluorenilmetoxi carbonilo). Los péptidos se ensamblaron automáticamente utilizando un sintetizador Symphony Multiplex (Protein Technologies Inc, Arizona, EE.UU.) o un sintetizador Liberty (CEM, Carolina del Norte, EE.UU.) que utiliza tecnología de microondas para facilitar la producción de secuencias peptídicas de alta fidelidad. Los péptidos y lipopéptidos se purificaron mediante 55 cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa y la autenticidad de los productos se determinó mediante espectrometría de masas. Los procedimientos utilizados para el ensamblaje, purificación y caracterización de péptidos se han descrito en detalle en otra parte (1, 2, 3). Se preparó una forma soluble de Pam2Cys mediante la adición de O-(N-Fmoc-2-aminoetil)-O'-(2-carboxietil)-undecaetilenglicol (Fmoc-PEG<sub>11</sub>-OH, Merck Ltd) a Pam2Cys. Esto dio lugar

a la formación de una forma pegilada del lípido, Pam2Cys-PEG<sub>11</sub>. Los epítomos incluidos en las construcciones de lipopéptidos y las composiciones de lipopéptidos individuales se muestran en la Tabla 1.

5 Animales. Se utilizaron ratones macho y hembra C57BL/6, BALB/c, B6.IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, B6.IFNAR<sup>-/-</sup> y HHD de 6-8 semanas de edad. Los ratones "knock out" HHD expresan una monocadena quimérica de los dominios  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 de HLA-A2.1 y  $\alpha$ 3 y los dominios citoplásmicos y transmembrana de H-2D<sup>b</sup>. Estos ratones se desarrollaron en un doble ratón knock out H-2D<sup>b</sup><sup>-/-</sup>  $\beta$ 2m<sup>-/-</sup>, que no expresa moléculas de H-2D<sup>b</sup> murinas detectables serológicamente (4, 5). Los ratones HHD se desarrollaron en el Institut Pasteur, París, y fueron amablemente suministrados por el Queensland Institute for Medical Research. Los ratones fueron criados y mantenidos en la instalación Animal House del departamento de microbiología. Los ratones B6.IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> son deficientes en interferón- $\gamma$  y los ratones B6.IFNAR<sup>-/-</sup> no poseen el receptor de interferón tipo 1. El Dr. Shizuo Akira, de la Universidad de Osaka, proporcionó amablemente ratones deficientes en TLR2. Todos los procedimientos con ratones fueron aprobados por el Comité de Ética de experimentación animal de la Universidad de Melbourne.

15 Procedimiento de inoculación. Los ratones se anestesiaron mediante inhalación de Penthrane™ o isoflurano y se inocularon con 25 nmol de lipopéptido, 25 nmol del péptido no lipidado o 2-20 nmol de construcciones que contienen Pam2Cys por vía intranasal. Las construcciones que contenían Pam2Cys y los lipopéptidos y péptidos se disolvieron en solución salina y se administraron en un volumen de 50  $\mu$ l, mientras que los grupos control de solución salina recibieron 50  $\mu$ l de solución salina solamente.

20 Provocación con el virus de la gripe A. El día 1, 3 o 7 después de la inoculación con ratones lipopéptidos se provocaron por vía intranasal con IAV vivos. Para una infección leve por IAV, a los ratones se le administró 10<sup>4.5</sup> UFP del virus H3N1, Mem71, un reordenador genético de A/Memphis/1/71 [H3N2] x A/Bellamy/42 [H1N1]. En el día 5 de la provocación, se recolectaron los pulmones para determinar los títulos víricos y se recolectaron los bazos para caracterizar las respuestas de las células T CD8<sup>+</sup>. La provocación con IAV altamente patógeno se llevó a cabo utilizando 50UFP (ratones HHD), 200UFP (ratones C57BL/6) o 500UFP (ratones BALB/c) del virus A/Puerto Rico/8/34 (PR8) H1N1 a través de la vía intranasal. Este virus altamente patógeno induce una infección sintomática caracterizada por pérdida de peso y deshidratación. Los ratones se monitorizaron diariamente para detectar signos de morbilidad y se sacrificaron cuando fue necesario en un punto final humanitario que se determinó utilizando una combinación de síntomas clínicos y el grado de pérdida de peso aprobado por Comité de Ética de experimentación animal de la Universidad de Melbourne.

30 Provocación con la bacteria *Legionella pneumophila*. Los ratones C57BL/6 se trataron previamente por vía intranasal con 20 nmol de PEG-Pam2Cys 3 días antes de la provocación intranasal con 1x10<sup>6</sup> UFC de *L. pneumophila* (cepa JR32  $\Delta$ fla). La carga bacteriana en los pulmones de los ratones se evaluó 1, 2 y 3 días después de la infección.

35 Estudio de transmisión por contacto. Para evaluar la transmisión viral en ratones BALB/c, los ratones "donantes" (n=2) recibieron 10<sup>4.5</sup> ufp de los virus H3N2 Udorn (A/Udorn/72) en 50  $\mu$ l de solución salina por vía intranasal. Un día después de la provocación, los ratones donantes se alojaron conjuntamente con ratones "receptores" sin tratamiento previo (n=3) durante 24 horas, después de lo cual se recolectaron los ratones donantes y se extrajeron los cornetes, la tráquea y los pulmones y se evaluaron para determinar los títulos víricos. Tres días y medio después de la provocación con ratones donantes, se recolectaron los cornetes nasales, la tráquea y los pulmones de los ratones receptores para evaluar los títulos víricos. Este protocolo se basa en un modelo de transmisión por contacto desarrollado por Edensorborough *et al.* (en preparación).

40 Evaluación de títulos virales en cornetes nasales, tráquea y pulmones. Los cornetes nasales, la tráquea y los pulmones de los ratones se homogeneizaron en 3 ml de RPMI y se determinaron los títulos del virus IAV en los sobrenadantes de pulmón utilizando una placa de ensayo Madine Darby Canine Kidney (MDCK) como se describió anteriormente (6).

45 Preparación de suspensiones unicelulares a partir de órganos. Después de la asfixia con CO<sub>2</sub>, los pulmones de los ratones se perfundieron con 10 ml de PBS a través del ventrículo derecho del corazón para eliminar las células circulantes. Los pulmones se cortaron en trozos y se sometieron a digestión enzimática con colagenasa A (2 mg/ml, Roche, Mannheim, Alemania) en RPMI durante 30 minutos. Los fragmentos de pulmón digeridos se filtraron a través de un tamiz y se trataron con 3 ml de solución de cloruro de amonio Tris-tamponada precalentada (ATC) durante 2 minutos a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos. Después, las células pulmonares se lavaron dos veces en RP10 (medio RPMI 1640 [Gibco, EE.UU.] complementado con FCS al 10% [CSL, Parkville, Australia] 7.5 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 76  $\mu$ M 2-mercaptoetanol, 150 U/ml penicilina, 150  $\mu$ g/ml de estreptomina y 150 pM de aminoácidos no esenciales [Gibco]). Los bazos se recogieron en 10 ml de RP10 y se prepararon suspensiones de células individuales mediante ruptura a través de un tamiz y después se trataron con ATC durante 5 minutos a una temperatura de 37°C. Las células se lavaron dos veces con RP10 antes del uso. Para obtener el líquido de lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés), las tráqueas del ratón se canularon con una jeringa y el espacio de aire se lavó con tres lavados de 1 ml de RPMI por separado y un enjuague final de 1 ml de la jeringa. El sobrenadante de los lavados de BAL se almacenó a una temperatura de -70°C para posterior análisis de citoquinas. El sobrenadante de los lavados de BAL se almacenó a una temperatura de -70°C para posterior análisis de citoquinas. Las células viables se contaron con un hemocitómetro y la exclusión de colorante azul de tripano.

5 Caracterización del entorno de citocinas pulmonares. Los niveles de citocinas en el sobrenadante de BAL se determinaron utilizando un kit de inflamación de ratón en una matriz citométrica de perlas (CBA) BD™ (Biosciences) según las instrucciones del fabricante, con la excepción de que solo se utilizaron 2 µl de cada perla de captura para cada muestra de 50 µl de BAL. Se prepararon curvas estándar (20-5000 µg/ml) para las siguientes citoquinas interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés), interferón-γ (IFN-γ), factor de necrosis tumoral α (TNF-α, por sus siglas en inglés) e interleucina-12p70 (IL-12p70). Las concentraciones de citoquinas se determinaron a partir de diluciones puras o 1/10 del sobrenadante de BAL. Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur y el software FlowJo.

10 Caracterización de las células pulmonares. Se tiñeron 5x10<sup>5</sup> células pulmonares con combinaciones de los siguientes anticuerpos anti-ratón; FITC marcado anti-CD11b, PerCP-Cy5.5 anti-GR-1 (Ly-6G y Ly-6GC), PE marcado anti-CD11c, APC anti-F4/80, FITC anti-IA/IE clase 2, PerCP-Cy5.5 anti-CD8, PE anti CD4 (BD Pharmingen). Los subconjuntos de células pulmonares se clasificaron como sigue; Neutrófilos: CD11b<sup>hi</sup>, GR1<sup>hi</sup>, CD11c<sup>-</sup>, F4/80<sup>-</sup>; macrófagos alveolares: CD11c<sup>hi</sup>, F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>int/lo</sup>, GR1<sup>int/lo</sup> y CD11c<sup>hi</sup>, Autofluorescencia<sup>hi</sup>; células dendríticas: CD11c<sup>hi</sup>, y MHC Class 2<sup>hi</sup>, GR1<sup>int</sup>; monocitos y macrófagos intersticiales: CD11b<sup>hi</sup>, GR1<sup>int</sup>, CD11c<sup>int/lo</sup>, F4/80<sup>+</sup>; células CD8<sup>+</sup>T: CD8<sup>+</sup>; células CD4<sup>+</sup>: CD4<sup>+</sup> (7, 8, 9).

20 Ensayo de tinción intracelular de citocinas (ICS, por sus siglas en inglés). Se estimularon suspensiones celulares únicas de células de pulmón o bazo con péptido a 1 µg/ml (C57BL/6 y BALB/c) o 10 µg/ml (HHD) durante 6 horas a una temperatura de 37°C en presencia de 5 µg/ml de GolgiPulg (BD Biosciences Pharmingen) 25 U/ml e IL-2 humana recombinante (Roche, Indianápolis, EE.UU.) en un volumen total de 200 µl RP10. Las células se tiñeron con PerCP (Cy5,5) marcado con anticuerpo CD8α anti-ratón de rata (BD Biosciences Pharmingen) durante 30 minutos en hielo. Las células se fijaron y se permeabilizaron utilizando el kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD) según las instrucciones del fabricante y se tiñeron con anti-IFN-γ marcado con FITC y anti-TNF-α marcado con APC (BD Biosciences Pharmingen) durante 30 min a una temperatura de 4°C. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur y se analizaron con el software FlowJo.

25 Análisis estadístico. Para las comparaciones de intervalos de tiempo, se utilizó un ANOVA de una vía (prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunnett) para determinar las diferencias entre los grupos de antes de la inoculación (día 0) y los de después de la inoculación (día 1, 3, 6, 8). Para otros estudios, se utilizó la prueba t de Student no pareada de dos colas o ANOVA de una vía (prueba de comparación múltiple post-hoc de Tukey) para determinar las diferencias estadísticas entre dos o más de dos grupos, respectivamente. Un valor de P<0,05 fue considerado significativo.

## Resultados

35 La inoculación de lipopéptidos basada en Pam2Cys expande las poblaciones de células pulmonares. El efecto del lipopéptido a base de Pam2Cys en el entorno celular pulmonar se examinó en ratones C57BL/6 que se inocularon por vía intranasal con el lipopéptido OT2-P2C-gB<sub>498-505</sub> que contiene el epítipo de T cooperadoras (Th) OT2 y un virus del herpes simple 1 obtenido a partir del epítipo de células T CD8<sup>+</sup> (gB<sub>498-505</sub>; véase Tabla 1). Las poblaciones de células residentes pulmonares en los pulmones perfundidos con PBS se caracterizaron mediante citometría de flujo celular.

40 La inoculación intranasal con OT2-P2C-gB<sub>498-505</sub> provocó un aumento dramático en el número total de células pulmonares que alcanzaron un máximo en el día 3 y se mantuvieron elevadas hasta el día 8 (Fig. 2A). En contraste, los ratones que recibieron el péptido OT2-gB<sub>498-505</sub> (que carece de Pam2Cys) no mostraron cambios significativos en el número total de células o en la proporción de tipos de células presentes en los pulmones, apuntando hacia Pam2Cys como el mediador de la afluencia celular (Fig. 2A). En ratones inoculados con lipopéptidos, el infiltrado celular en el día 3 después de la inoculación estaba compuesto en gran parte por neutrófilos y macrófagos intersticiales (Fig. 2B). El examen microscópico mediante tinción de Giemsa reveló que los neutrófilos exhibían un fenotipo altamente vacuolar; indicando activación, mientras que se encontró que la población de macrófagos intersticiales/monocitos F480<sup>+</sup> estaba compuesta predominantemente por macrófagos intersticiales con una morfología grande y nucleada con pocas células que poseen el núcleo en forma de donut o de riñón característica de los monocitos (datos no mostrados). Aunque los macrófagos alveolares (AM, por sus siglas en inglés) estaban presentes en niveles muy bajos en el pulmón en estado estacionario (día 0), fue evidente un aumento significativo en esta población después de la inoculación de lipopéptidos. Finalmente, también observamos aumentos en los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y en las células de tipo dendrítico CD11c<sup>hi</sup> entre los días 3-8 posteriores a la inoculación. Un examen de la afluencia de células pulmonares de ratones BALB/c y HHD reveló patrones similares de infiltración de neutrófilos temprana seguida de expansión de las poblaciones de macrófagos intersticiales y macrófagos alveolares CD11b<sup>hi</sup> (datos no mostrados).

55 La administración de Pam2Cys pegilada expande las poblaciones de células pulmonares. La administración intranasal de Pam2Cys pegilado (P2C-PEG<sub>11</sub>) también dio lugar a aumentos significativos en las poblaciones de neutrófilos, macrófagos intersticiales y alveolares y linfocitos de pulmón total (que incluye el intersticio de pulmón y el fluido que contiene BAL) en ratones C57BL/6 (Figura 7) y BALB/c (datos no mostrados). También se observaron niveles aumentados de células NK productoras de IFN-γ activadas y células αδ T (Figura 7).

60 La profilaxis con Pam2Cys es eficaz contra la provocación con IAV altamente patógeno. Para determinar si la actividad antiviral de Pam2Cys es eficaz contra una cepa virulenta de IAV, los ratones que recibieron Pam2Cys pegilado (P2C-

PEG<sub>11</sub>) fueron expuestos 72 horas o 7 días después a una dosis letal del virus H1N1 PR8. Los ratones tratados con solución salina (expuestos 72 horas después) experimentaron una pérdida de peso sustancial, desarrollaron síntomas clínicos de infección y el día 8 todos los ratones habían sucumbido a la infección (Figura 8). En contraste, los ratones tratados previamente con PEG-Pam2Cys experimentaron una pérdida de peso sustancialmente menor y todos los ratones sobrevivieron a la infección (Figura 8).

La profilaxis con Pam2Cys puede reducir las tasas de transmisión. Para determinar si los ratones infectados con el virus de la gripe, tratados previamente con Pam2Cys, tienen una capacidad reducida para transmitir el virus, se utilizó un modelo de ratón de transmisión por contacto (Edenborough *et al.*, en preparación). Los ratones "donantes" que fueron tratados previamente con PEG-Pam2Cys se provocaron en varios intervalos de tiempo posteriores con 10<sup>4.5</sup> ufp de virus Udm H3N2. Los resultados muestran que la profilaxis con Pam2Cys reduce los títulos virales nasales, traqueales y pulmonares (Figura 9). Todos los ratones receptores que fueron alojados conjuntamente con ratones donantes tratados con solución salina se infectaron, lo que confirma la capacidad de los ratones donantes para transmitir el virus. Aunque los ratones que habían recibido Pam2Cys 5 o 7 días antes de la provocación transmitieron el virus a los ratones receptores, los ratones que habían recibido Pam2Cys 24 horas o 72 horas antes de la provocación con el virus no transmitieron la infección a los ratones receptores alojados conjuntamente.

La administración intranasal de lipopéptido proporciona una protección inmediata contra la provocación con IAV. Para determinar si los cambios pulmonares inducidos por la administración intranasal de lipopéptido podrían reducir el impacto de la provocación con IAV, se examinó el efecto protector de la inoculación de lipopéptido contra los virus de IAV leves (H3N1) y altamente virulentos PR8 (H1N1). Se administraron lipopéptidos a tres cepas de ratón que contenían un epítipo de células T CD8<sup>+</sup> (IAV-LP) específico para IAV restringido a la cepa de ratón particular o un epítipo irrelevante de células T CD8<sup>+</sup> no obtenido a partir de IAV (no IAV-LP) (Tabla 1). En todos los lipopéptidos, el epítipo de las células Th CD4<sup>+</sup> no estaba relacionado con el virus de la gripe (Tabla 1). Mientras que el IAV-LP es capaz de inducir respuestas de células T CD8<sup>+</sup> con el epítipo obtenido a partir del IAV administrado, la ausencia de epítipos específicos del IAV (CD8<sup>+</sup> T o CD4<sup>+</sup>) en el no-IAV-LP significa que las respuestas específicas del IAV no serán inducidas en la inoculación.

Los ratones C57BL/6, BALB/c y HHD se provocaron por vía intranasal con 10<sup>4.5</sup> UFP H3N1, Mem71, ya sea 3 o 7 días después de la inoculación con IAV-LP o no-IAV-LP y se evaluaron los títulos virales pulmonares en el día 5 de la infección. Los resultados en la Figura 3a muestran que, en todas las cepas de ratones, la inoculación con el IAV-LP así como el no-IAV-LP resultó en una reducción significativa de los títulos de virus pulmonar cuando se comparó con los animales que no recibieron lipopéptido. En el grupo de LP sin IAV, el aclaramiento viral fue más notable cuando se produjo la provocación 3 días después de la inoculación (Fig. 3A).

La ausencia de epítipos específicos de IAV (CD8<sup>+</sup> T o CD4<sup>+</sup>) en el LP no-IAV sugirió que la actividad antiviral de los LP no-IAV es conferida por el resto Pam2Cys. Para confirmar esta teoría, examinamos la presencia de respuestas de células T CD8<sup>+</sup> específicas de IAV a PA<sub>224-233</sub>, una diana específica de IAV inmunodominante en ratones C57BL/6, y el mismo epítipo incluido en el IAV-LP pero no en el no-IAV-LP. En ratones C57BL/6 inoculados con lipopéptidos, solo los ratones que recibieron IAV-LP mostraron niveles significativos de IFN-γ<sup>+</sup> o IFN-γ<sup>+</sup> TNF-α<sup>+</sup> PA<sub>224-233</sub>- células T CD8<sup>+</sup> específicas, mientras que ni los grupos de solución salina ni de no-IAV-LP provocaron respuestas detectables a estos epítipos (Fig. 3B). Este mismo patrón de respuestas de células T CD8<sup>+</sup> se observó en las cepas de ratones BALB/c y HHD. La ausencia de células específicas de IAV en ratones inoculados con no-IAV-LP demuestra que el efecto antiviral temprano observado se debe a la acción de Pam2Cys y no a una capacidad acelerada para aumentar una respuesta inmunitaria adaptativa específica de IAV.

Cabe señalar que el no-IAV-LP, en contraste con el IAV-LP, no proporciona una protección a largo plazo asociada con la inducción de respuestas de células T CD8<sup>+</sup> específicas del IAV. Solo los ratones BALB/c y C57BL/6 inoculados con IAV-LP exhibieron niveles significativos de aclaramiento viral (98±1% y 65±14% (respectivamente)) si la provocación con H3N1 ocurre 6-8 semanas después de la inoculación (datos no mostrados). Por lo tanto, en ausencia de respuestas específicas de antígeno, la actividad antiviral de los no-IAV-LP se reduce con el tiempo, lo que demuestra que el componente del epítipo de células T CD8<sup>+</sup> del lipopéptido es esencial para la protección a largo plazo con los IAV-LP.

La profilaxis con lipopéptidos es eficaz contra la provocación con IAV altamente patógeno. Para determinar si la actividad antiviral de Pam2Cys fue eficaz contra la infección altamente patógena, los ratones inoculados con lipopéptidos se provocaron 7 días después con el virus H1N1 altamente patógeno, PR8. La inoculación de lipopéptidos IAV-LP y no-IAV LP aumentó dramáticamente la tasa de supervivencia en ratones expuestos a PR8 (Fig. 4). Mientras que la mayoría de los ratones inoculados con solución salina sucumbieron a la infección, el 100% de los animales inoculados con IAV-LP y el 80% de los animales inoculados con no-IAV-LP sobrevivieron a la infección. Además de mejorar las tasas de supervivencia, el grado de pérdida de peso y la sintomatología clínica que normalmente se asocia con la infección también se redujo en el grupo no-IAV-LP (Fig. 4).

El espectro de citoquinas inducidas por Pam2Cys soluble. Para eliminar la influencia del péptido, o respuestas específicas de epítipo del sistema, construimos una forma soluble de Pam2Cys conjugando el Pam2Cys, normalmente insoluble, con el polietilenglicol (PEG). Para identificar el impacto de Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> en el entorno pulmonar, medimos la concentración de citoquinas asociadas a la inflamación en el fluido de lavado broncoalveolar

(BAL) de ratones C57BL/6 a los que se administró 20 nmol Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> (i.n) por análisis citométrico con matriz de perlas (Fig. 5). El día 3 después de la administración, detectamos aumentos significativos en las concentraciones de IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70 en ratones inoculados con Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> en comparación con ratones inoculados con solución salina o sin tratamiento previo. Para el día 7, las concentraciones de citoquinas en el grupo de Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> se normalizaron a los niveles de administración previa y no difirieron significativamente con respecto al grupo sin tratamiento previo (Fig. 5).

La actividad antiviral de Pam2Cys es independiente del antígeno. Para confirmar que el resto Pam2Cys es principalmente responsable de la actividad antiviral temprana de los lipopéptidos, los ratones se inocularon por vía intranasal con 20 nmol de Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> y se provocaron con 10<sup>4.5</sup> UFP de virus H3N1 1, 3 o 7 días después. Los resultados mostrados en la Figura 6 demuestran que la inoculación con Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> reduce las cargas virales pulmonares en la misma medida que el no-IAV-LP, lo que confirma que la actividad antiviral temprana de los lipopéptidos observada está mediada por Pam2Cys. La profilaxis con Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> redujo la carga viral después de la provocación casi de inmediato, desde el día 1 hasta el día 7 posterior a la administración, lo que revela que la profilaxis de Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> puede proporcionar al menos una ventana de protección de 7 días.

Pam2Cys protege contra IAV cuando se administra por vía intranasal en una sola dosis. Después de la administración profiláctica de Pam2Cys pegilado (PEG-Pam2Cys) (también denominado en la presente memoria Pam2Cys-PEG<sub>11</sub> o P2C-PEG<sub>11</sub>) en ratones a través de las vías intranasal (in), subcutánea (sc) o intravenosa (iv) y una posterior provocación con una dosis letal del virus PR8 3 días después, solo los ratones a los que se administró PEG-Pam2Cys por vía intranasal estaban protegidos contra la muerte y la pérdida de peso asociada con la infección por PR8 (Figura 10).

Tabla 1. Detalles de las cepas de ratón y lipopéptidos utilizados en la presente invención

Cepa de ratón	Fenotipo MHC clase I	Secuencia de epítipo diana de células T CD8 <sup>+</sup>	Origen del epítipo de células T CD8 <sup>+</sup>	Elemento de restricción MHC Clase I	Componentes de IAV-LP	Componentes de no-IAV-LP
C57BL/6	H-2K <sup>b</sup> H-2D <sup>b</sup>	SSLENFRAVYV (10)	Polimerasa IAV A (PA <sub>224-233</sub> )	H2-D <sup>b</sup>	OT2 <sup>ii</sup> -P2C <sup>iii</sup> -PA <sub>224-233</sub>	
		SSIEFARL (11)	glicoproteína B de HSV-1 (gB <sub>498-505</sub> )	H2-K <sup>b</sup>		OT2-P2C-gB <sub>498-505</sub>
<sup>i</sup> HHD	HLA-A2.1	GILGFVFTL (12)	Proteína IAV M1 (M1 <sub>58-66</sub> )	HLA-A2.1	OT2-P2CM1 <sub>58-66</sub> <sup>iv</sup>	OT2-P2C-gB <sub>498-505</sub>
		FMYSDFHFI (13)	Polimerasa IAV A (PA <sub>46-55</sub> )		OT2-P2C-PA <sub>46-55</sub>	
		AIMDKNIIL (14)	Proteína no estructural IAV (NS1 <sub>122-130</sub> )		OT2-P2C-NS1 <sub>122-130</sub>	
BALB/c	H-2K <sup>d</sup> H-2D <sup>d</sup>	TYQRTRALV (15, 16)	Nucleoproteína IAV (NP <sub>147-155</sub> )	H2-K <sup>d</sup>	P25 <sup>v</sup> -P2C-NP <sub>147-155</sub>	P25-P2C-PA <sub>224-233</sub> <sup>vi</sup>

<sup>i</sup> Los ratones HHD son una cepa transgénica que expresan exclusivamente moléculas de clase 1 HLA-A2.1 quiméricas

<sup>ii</sup> OT2 (secuencia de aminoácidos ISQAVHAAHAEINEAGR) es un epítipo de Th de ovoalbúmina.

<sup>iii</sup> P2C: Pam2Cys.

<sup>iv</sup> Se administró una mezcla de los tres IAV-LP a ratones HHD antes de la exposición al H1N1 PR8. Los ratones expuestos a H3N1 Mem71 solo recibieron OTS-P2C-M1<sub>58-66</sub>.

<sup>v</sup> P25 (secuencia de aminoácidos KLIPNASLIENCTKAEL) es un epítipo de Th indiscriminado (16) de virus morbilli.

<sup>vi</sup> El epítipo PA224-233 no es reconocido por las moléculas de restricción de Clase 1 presentes en ratones BALB/c

Varias variantes de Pam2Cys confieren protección contra la provocación con IAV. Los ratones a los que se administró de forma profiláctica 20 nmol de varias construcciones que contenían Pam2Cys a través de la vía intranasal se protegieron contra la pérdida de peso (Figura 11A) y la muerte (Figura 11B) después de una provocación con una dosis letal de PR8. Los ratones también estaban protegidos contra otros síntomas clínicos asociados con la infección por PR8 (datos no mostrados).

5 Pam2Cys es eficaz cuando se administra en una dosis repetida. Los ratones Balb/c a los que se administró una dosis única de PEG-Pam2Cys (o dos dosis de PEG-Pam2Cys con tres semanas de diferencia) se protegieron contra la pérdida de peso (Figura 12B), la muerte y otros síntomas clínicos después de una provocación con una dosis letal de PR8. Las cargas virales en ratones tratados con PEG-Pam2Cys fueron significativamente menores en el momento del sacrificio (Figura 12A).

PEG-Pam2Cys es eficaz a dosis más bajas. Cuando los ratones se trataron de forma profiláctica con dosis más bajas de PEG-Pam2Cys y se provocaron 3 días después a una dosis letal de PR8, aún se logró la protección contra la pérdida de peso y la muerte en todos los ratones en comparación con el grupo de solución salina (Figura 13).

10 La protección contra la provocación con IAV no es dependiente de los interferones IFN- $\gamma$  o tipo 1 (es decir, IFN- $\alpha$ ). Los ratones deficientes en IFN- $\gamma$  (B6.IFN- $\gamma$ -/-) o en la capacidad de respuesta al interferón tipo 1 (tal como el interferón- $\alpha$ ; IFNAR-/-) que fueron tratados con PEG-Pam2Cys estaban protegidos contra la pérdida de peso y la letalidad asociadas a la infección por PR8 (Figura 14).

15 PEG-Pam2Cys es eficaz como agente terapéutico. Cuando los ratones se provocaron con  $10^{4.5}$  UFP de virus Udm (Gripe A) (i.n) y 4 horas después se administraron 20 nmol de PEG-Pam2Cys (i.n), se encontraron cargas virales reducidas en la nariz, orofaringe, tráquea y pulmón. La carga viral en los pulmones, en particular, mostró un  $\text{Log}_{10}4$ , o una reducción de 10000 veces en comparación con el grupo de *solución salina* (Figura 15).

20 Pam2Cys es eficaz como agente antibacteriano. Cuando los ratones se trataron previamente con PEG-Pam2Cys (i.n.) mostraron una carga bacteriana en el pulmón y la tráquea significativamente reducida después de la provocación intranasal con *L. pneumophila* (Figura 16A). La carga bacteriana en los pulmones alcanzó su punto máximo en los días 2 y 3. También se pueden lograr cargas bacterianas reducidas hasta 7 días después de la administración de PEG-Pam2Cys y se muestran las cargas bacterianas el día 3 después de la infección en los ratones que recibieron la profilaxis 3 con PEG-Pam2Cys (Fig. 16B) o 7 días (Fig. 16C) antes de la provocación.

### Discusión

25 El papel crucial que desempeña la respuesta inmunitaria innata en el control de la infección sugiere que la activación temprana del sistema inmunitario innato antes de la infección podría proporcionar una mayor protección contra una provocación con un agente infeccioso, seleccionado de un virus y una bacteria. Los resultados de este estudio demostraron que la administración de un resto TLR2 soluble que comprende un agonista de TLR2 provoca una respuesta inmunitaria innata en un sujeto al que se administra, en donde la respuesta inmunitaria no es específica de antígeno. Además, los cambios pulmonares provocados por la administración profiláctica intranasal de la composición para uso según la presente invención se asociaron con una mayor resistencia a la provocación posterior con virus y bacterias, que sugiere que tales composiciones son adecuadas como agentes profilácticos contra infecciones virales y bacterianas, particularmente cuando hay un alto riesgo de brotes epidémicos o pandémicos. Las composiciones para uso según la presente invención también tienen la ventaja de que no requieren un conocimiento previo del agente infeccioso (o sus componentes antigénicos o cepa particular) y, por lo tanto, podrían ser particularmente útiles, por ejemplo, durante pandemias de gripe. La estabilidad de la composición, que se puede liofilizar y es estable a temperatura ambiente, también significa que es muy adecuada para el almacenamiento en la preparación para una situación pandémica.

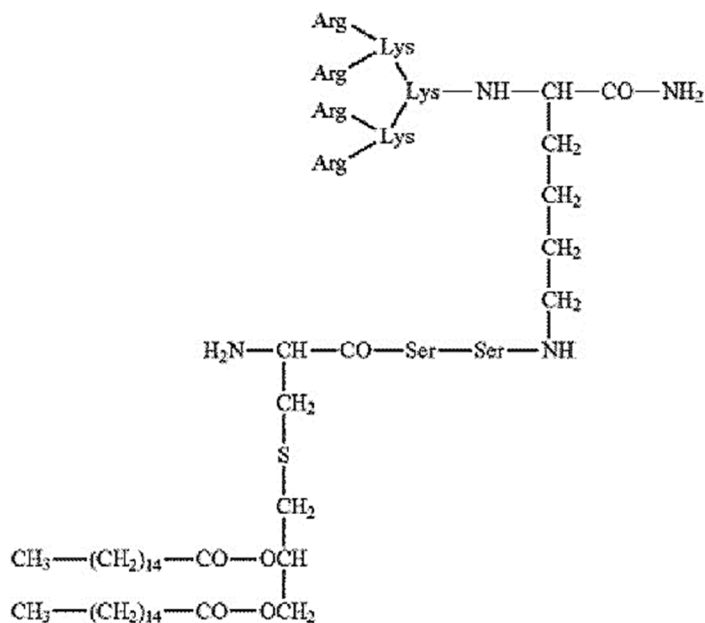
### Referencias

- 40 1. Jackson, D. C., *et al.* 2004. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15440-5.
2. Zeng, W., *et al.* 2005. *Vaccine* 23:4427-35.
3. Zeng, W., *et al.* 2002. *J Immunol* 169:4905-12.
4. Firat, H., *et al.* 1999. *Eur J Immunol* 29:3112-21.
5. Pascolo, S., *et al.* 1997. *J Exp Med* 185:2043-51.
- 45 6. Tannock, G. A., *et al.* 1984. *Infect Immun* 43:457-62.
7. Cleret, A., *et al.* 2007. *J Immunol* 178:7994-8001.
8. Gonzalez-Juarrero, M., *et al.* *J Immunol* 171:3128-35.
9. Fansman, F., and S. Jung. 2007. *J Immunol* 179:3488-94.
10. Belz, G. T., *et al.* 2000. *J Virol* 74:3486-93.
- 50 11. Wallace, M. E., *et al.* 1999. *J Virol* 73:7619-26.
12. Gotch, F., *et al.* 1987. *Nature* 326:881-2.

13. Gianfrani, C., *et al.* 2000. *Hum Immunol* 61:438-52.
14. Jameson, J., *et al.* 1999. *J Immunol* 162:7578-83.
15. Bodmer, H. C. *et al.*, 1988. *Cell* 52:253-8.
- 5 16. Sherman, L. A., *et al.* 1992. *J Exp Med* 175:1221-6.

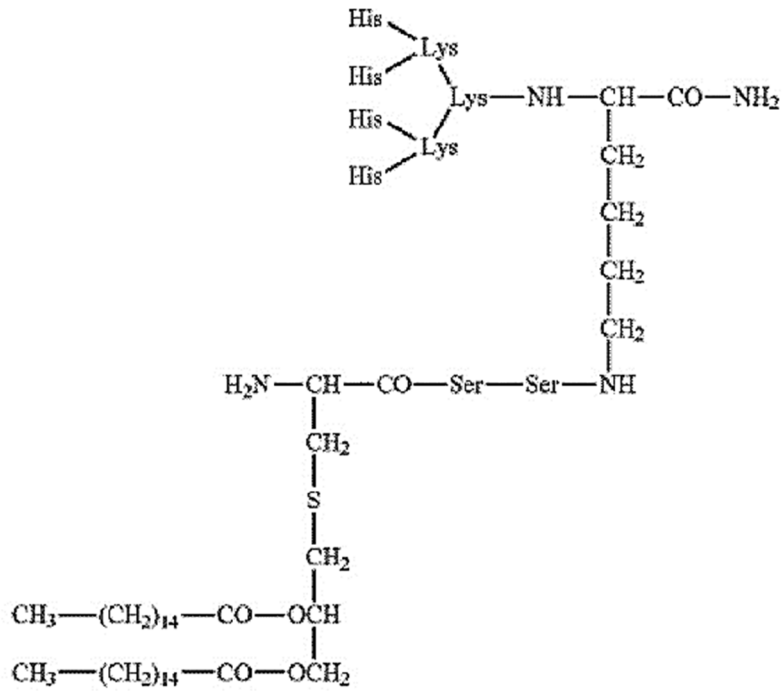
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un resto TLR2 soluble para uso para tratar o prevenir una o más infecciones virales o bacterianas en el tracto respiratorio de un sujeto, en donde el resto TLR2 comprende un agonista de TLR2 conjugado con un agente solubilizante, en donde el agonista de TLR2 es un lipopéptido seleccionado del grupo que consiste en Pam2Cys, Pam3Cys, Ste2Cys, Lau2Cys y Oct2Cys, y el agente solubilizante es PEG (polietilenglicol) o un polipéptido polar seleccionado del grupo que consiste en R4, H4, E8, E8 y H8 ramificados, en donde la composición no induce una respuesta inmunitaria humoral o celular específica dirigida contra un agente que causa la infección mencionada anteriormente, y no comprende un antígeno que puede provocar una respuesta inmunitaria contra un agente que causa la infección mencionada anteriormente, y en donde la composición se administra por vía intranasal.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde el agonista de TLR2 es Pam2Cys.
3. La composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el agente solubilizante es PEG
4. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente solubilizante comprende PEG y uno cualquiera de R4, H4, H8, EB8 y E8.
5. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente que causa la infección es el virus de la gripe A (IVA).
6. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente que causa la infección es *Mycobacterium tuberculosis* o *Legionella pneumophila*.
7. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición no comprende un agonista de TLR9.
8. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto TLR2 soluble no comprende un antígeno peptídico.
9. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto TLR2 soluble no comprende un antígeno.
10. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto TLR2 soluble consiste en un agonista de TLR2 conjugado a un agente solubilizante.
11. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto TLR2 soluble comprende un antígeno que no puede provocar una respuesta inmunitaria específica al agente que causa la infección.
12. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde R4Pam2Cys tiene la estructura:

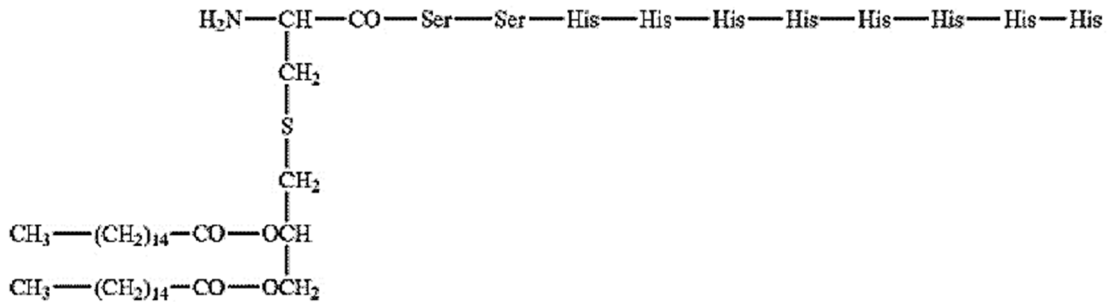


13. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde H4Pam2Cys tiene la estructura:

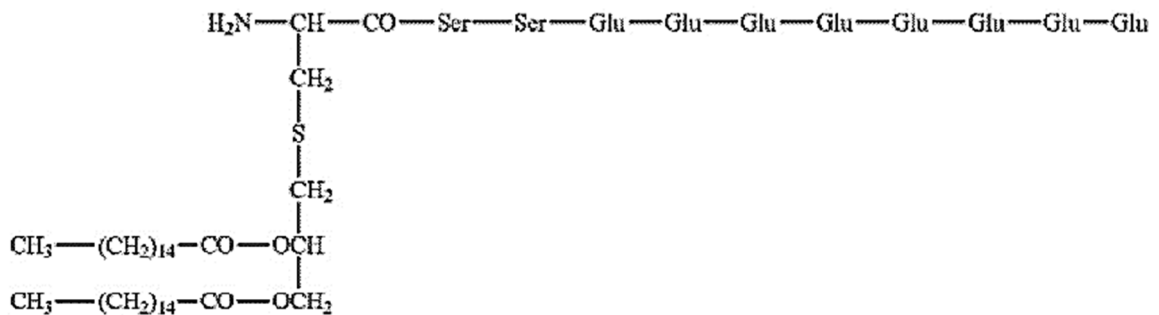




14. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde H8Pam2Cys tiene la estructura:



5 15. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde E8Pam2Cys tiene la estructura:



16. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde la E8Pam2Cys ramificada tiene la estructura:

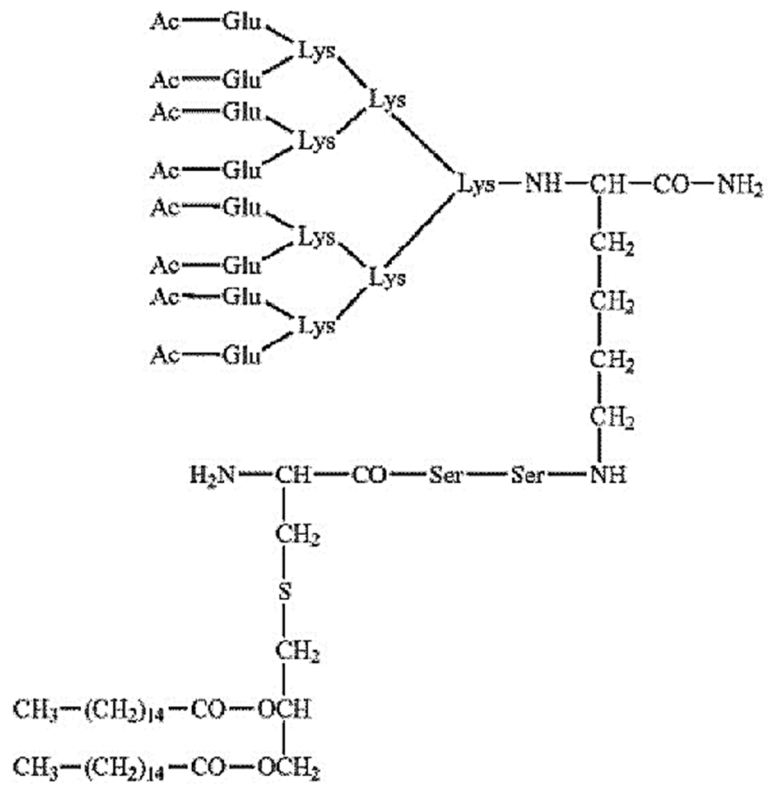
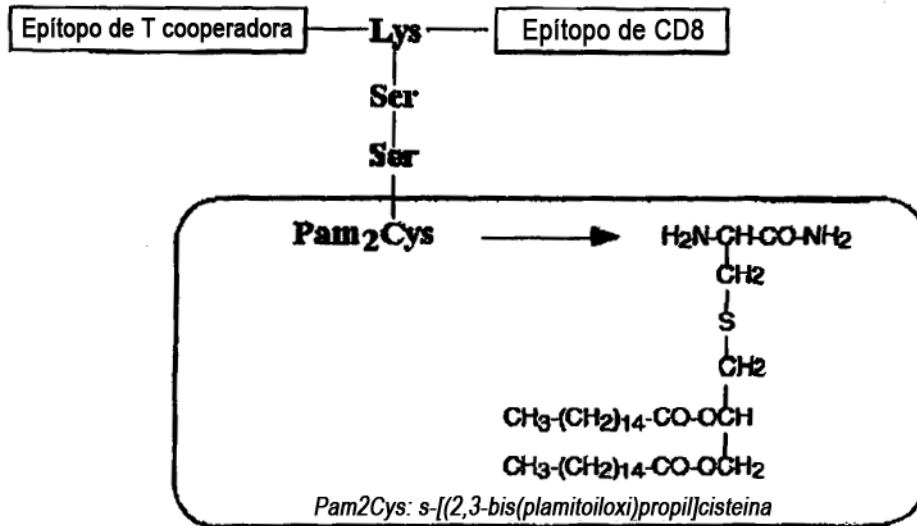


FIGURA 1

**A**



**B**

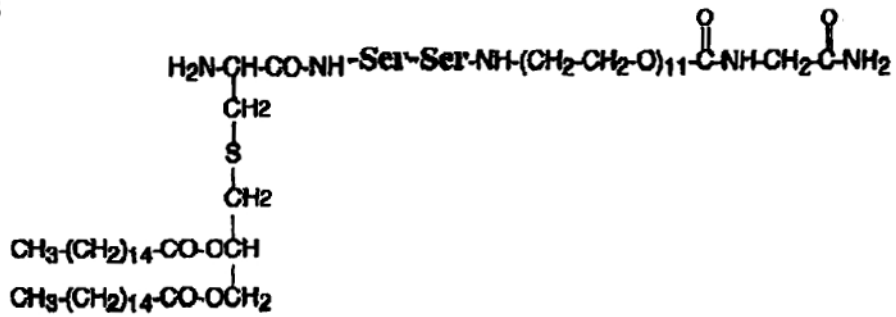


FIGURA 2

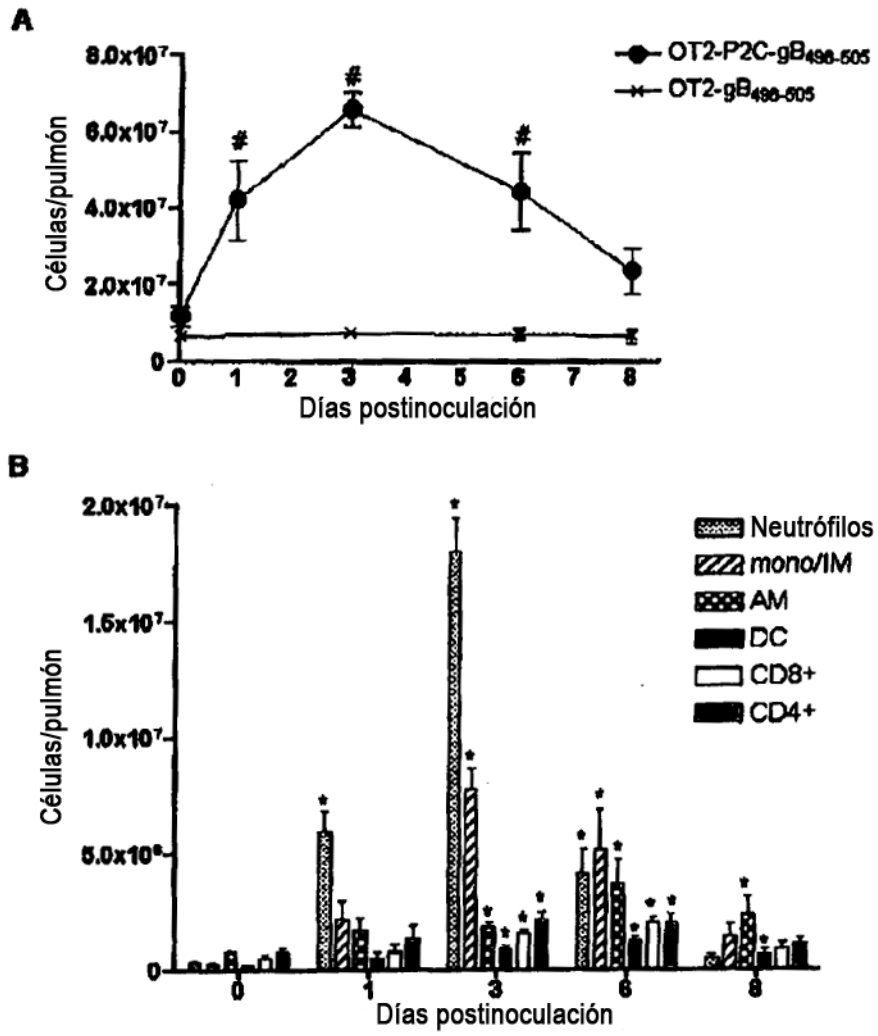


FIGURA 3

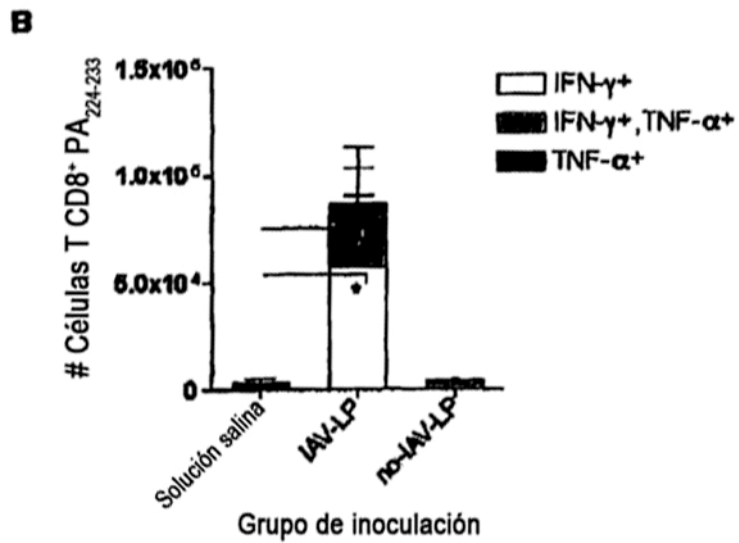
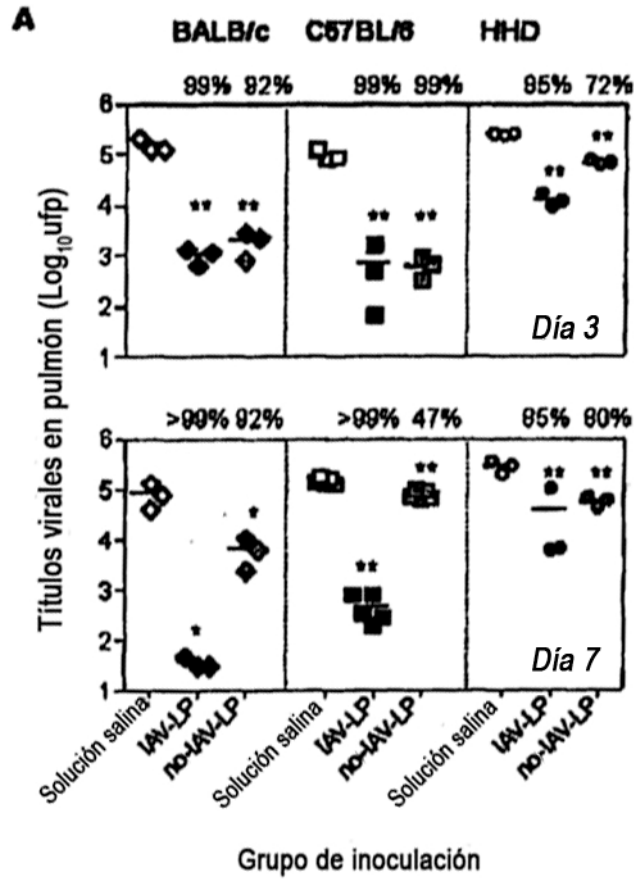


FIGURA 4

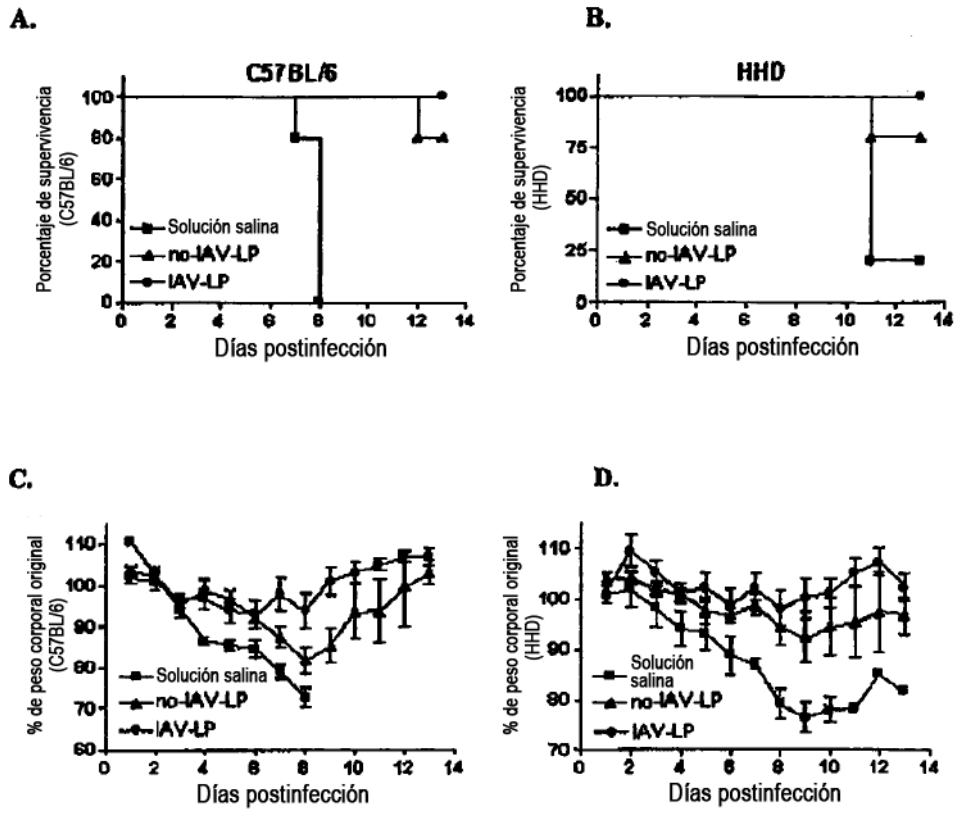


FIGURA 5

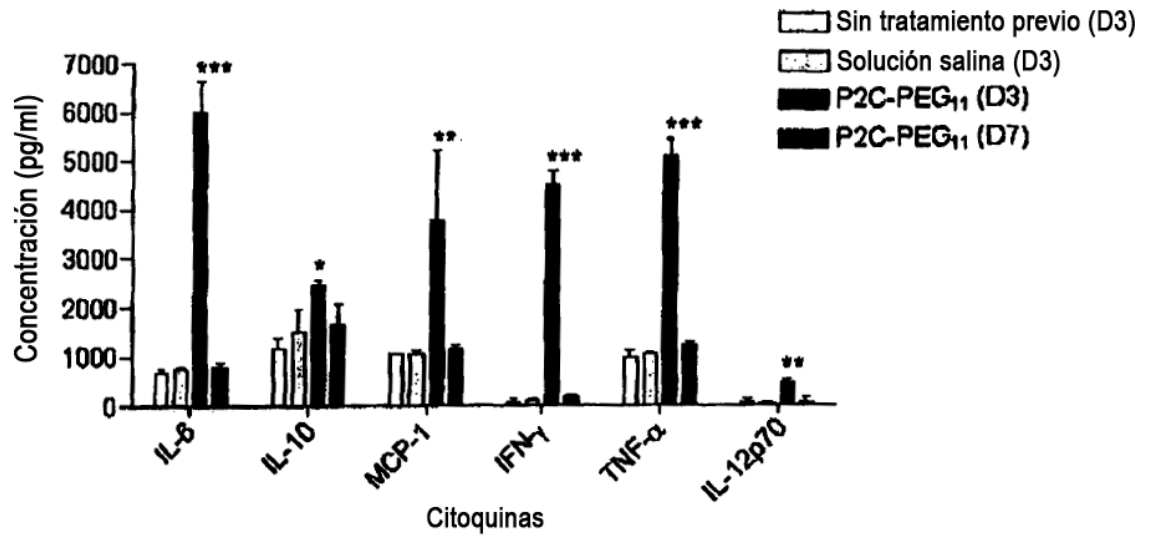


FIGURA 6

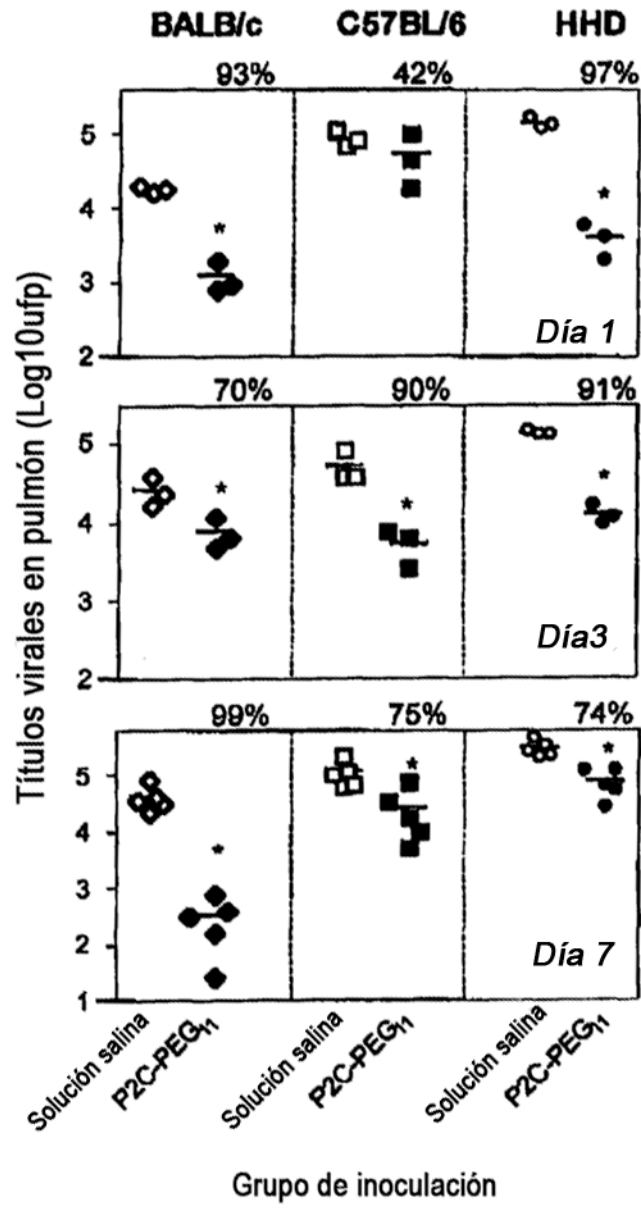




FIGURA 7

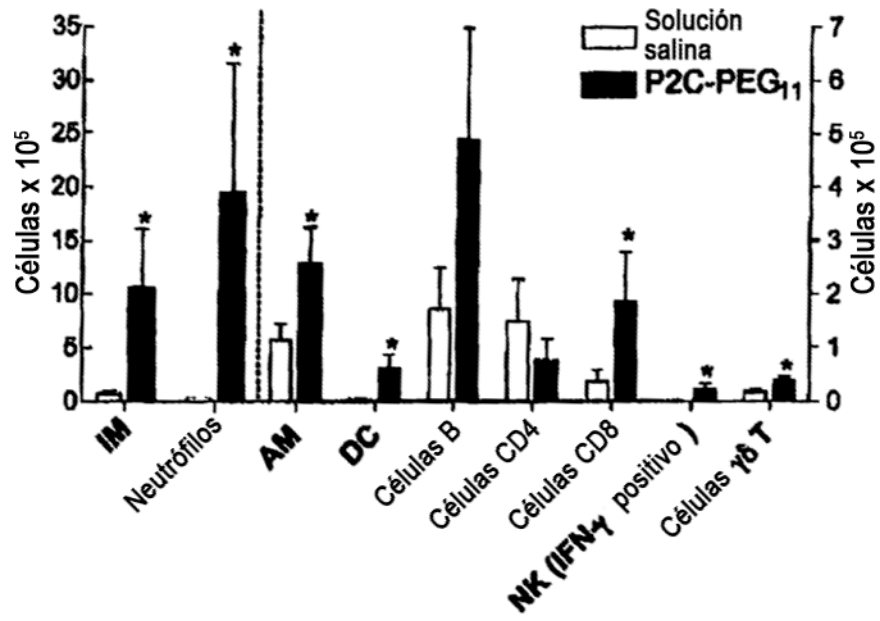


FIGURA 8

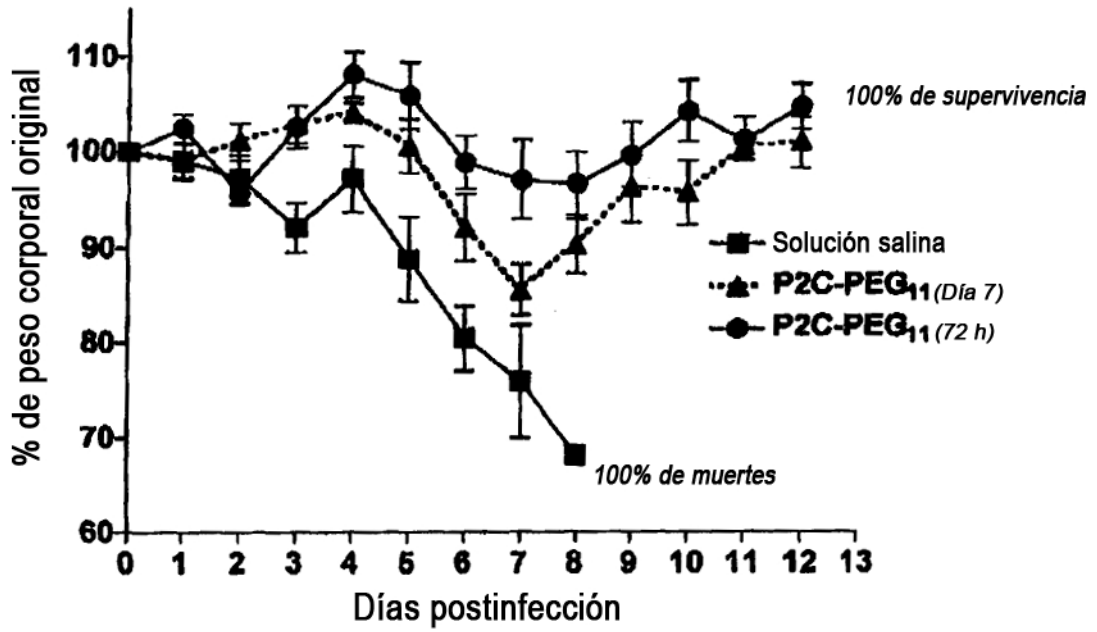


FIGURA 9

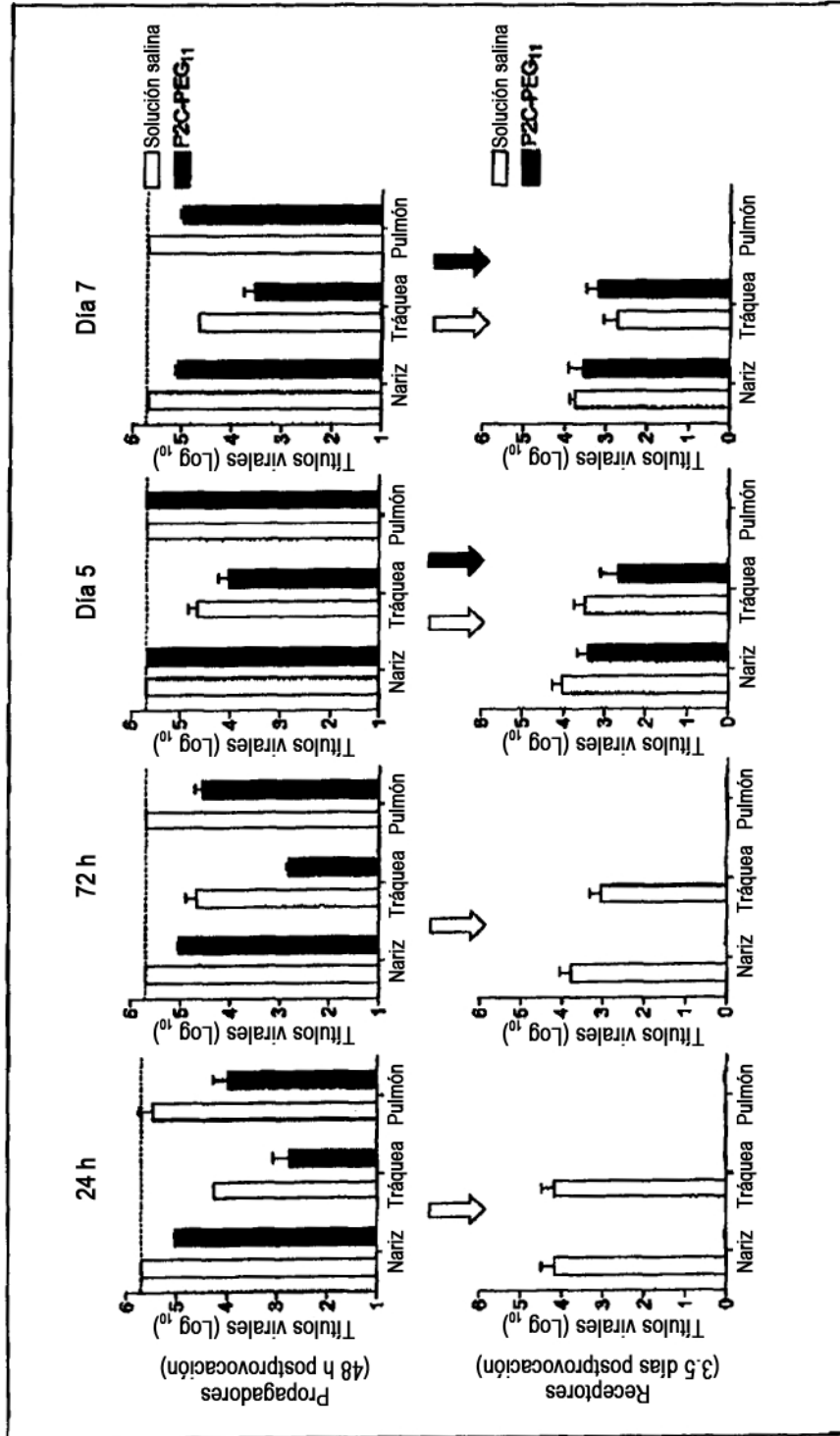


FIGURA 10

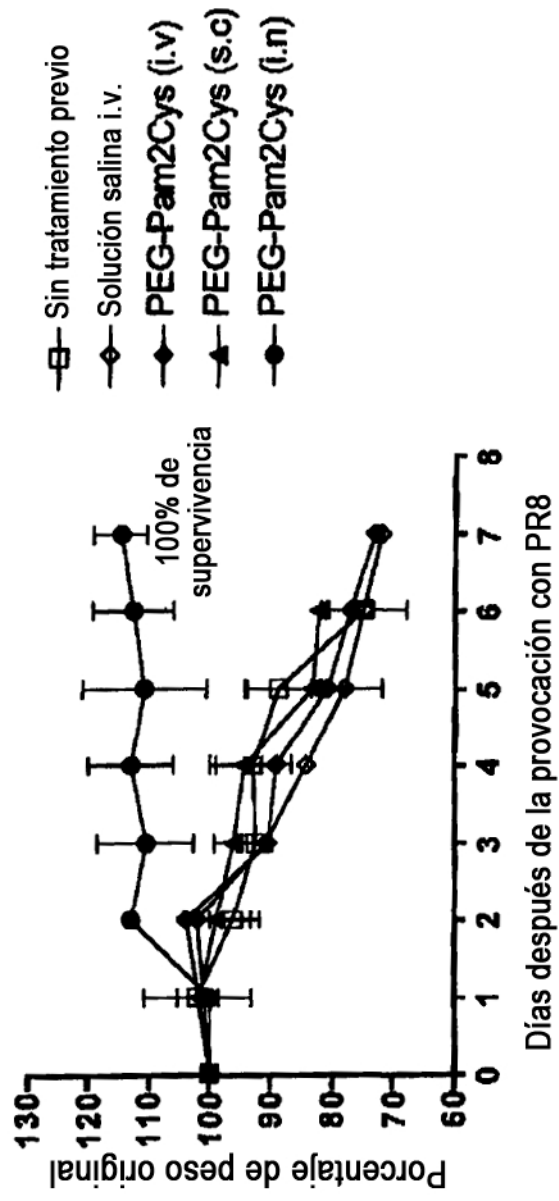
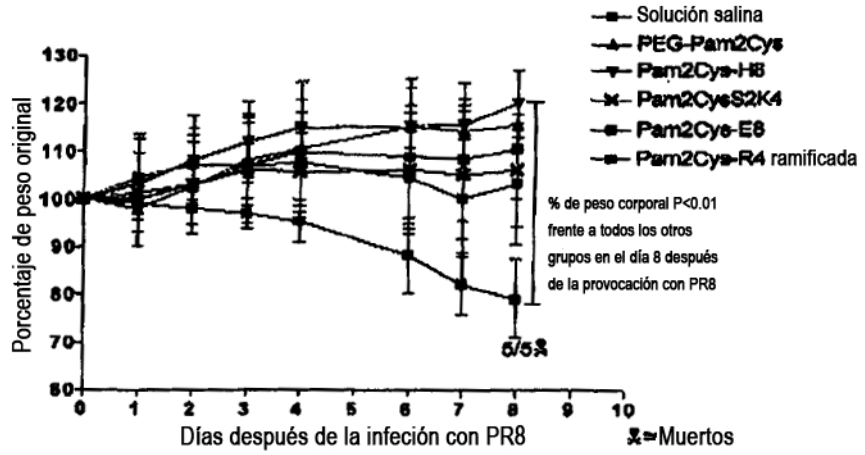


FIGURA 11

A.



B.



FIGURA 12

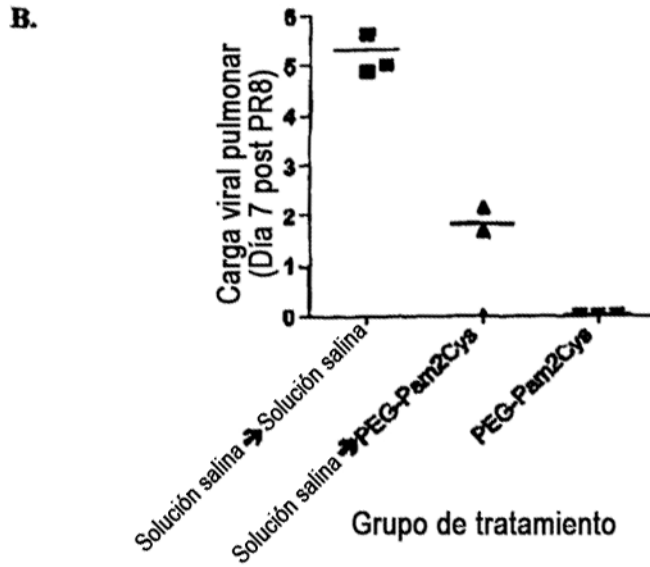
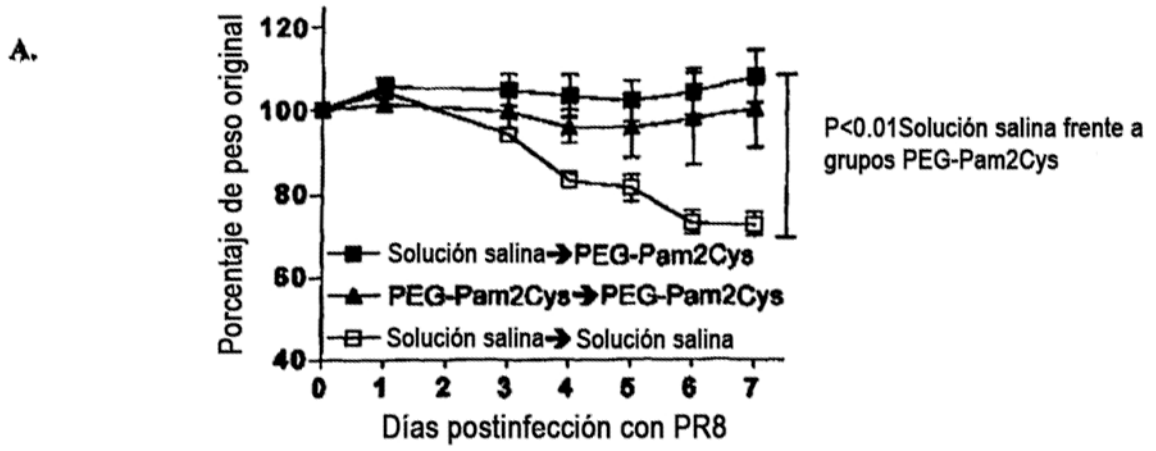


FIGURA 13

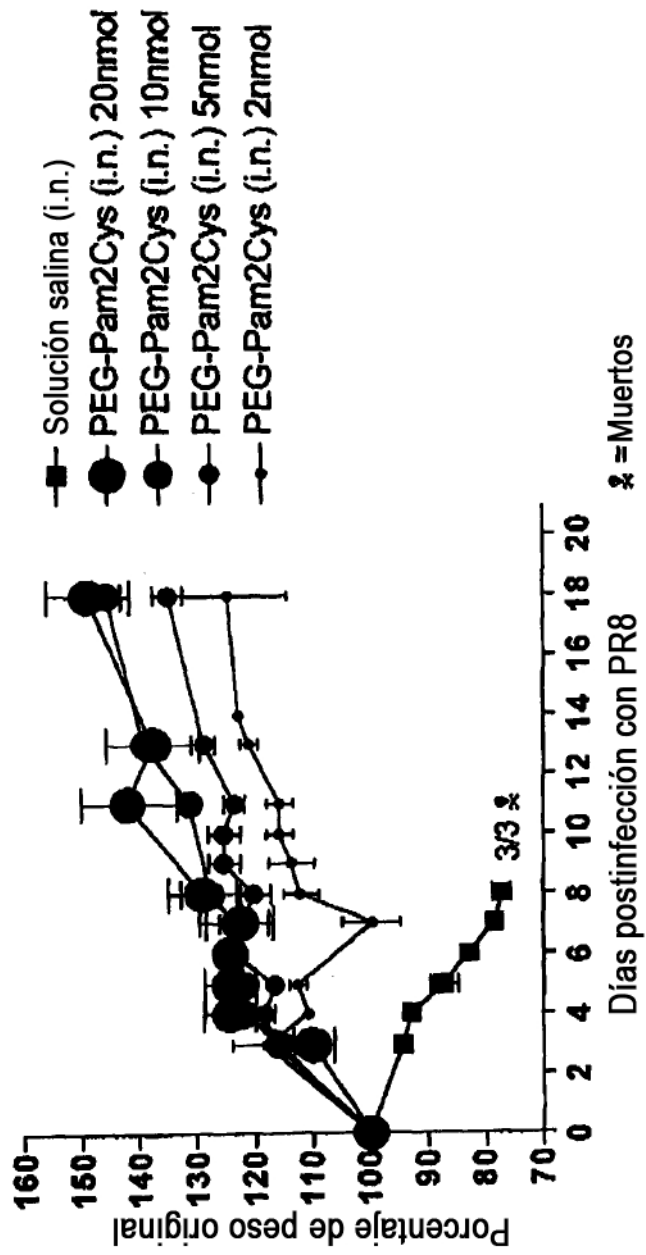
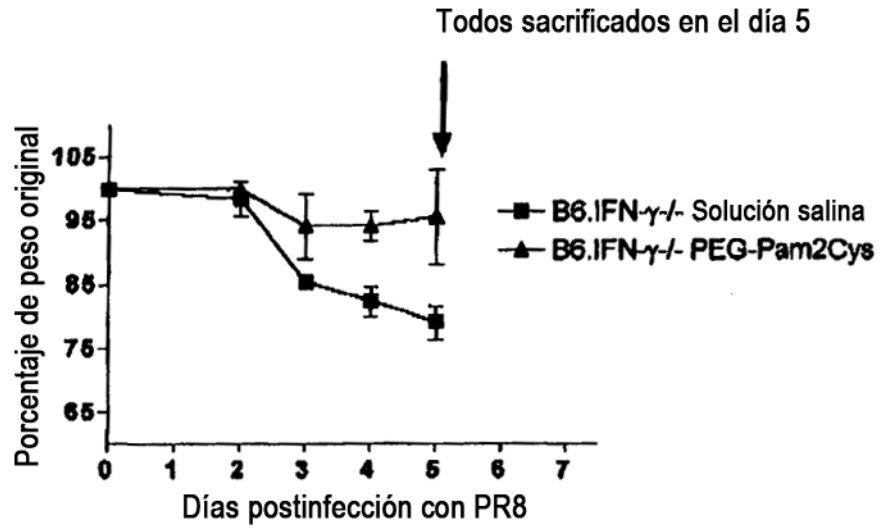


FIGURA 14

A.



B.

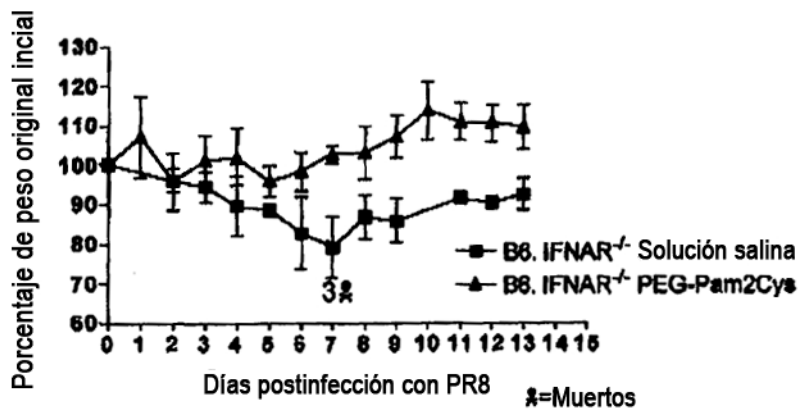




FIGURA 15

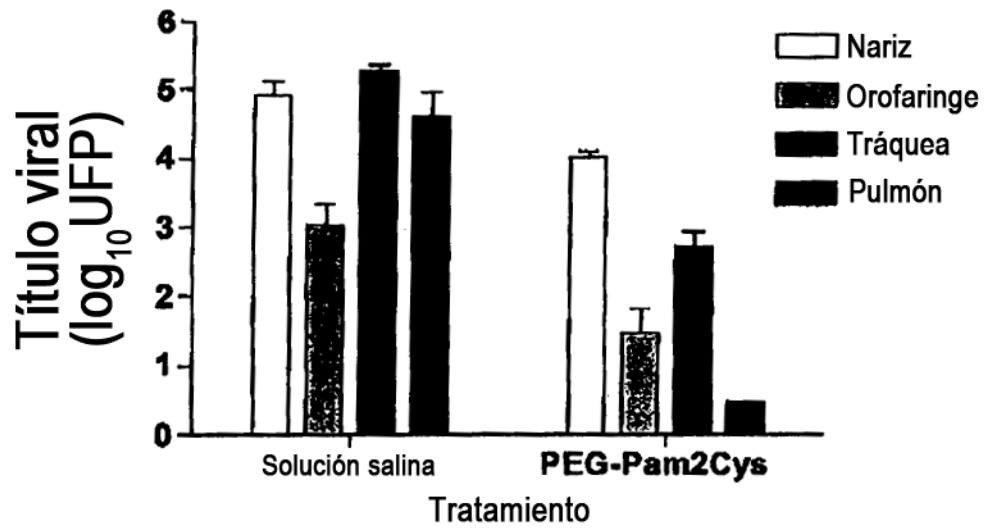
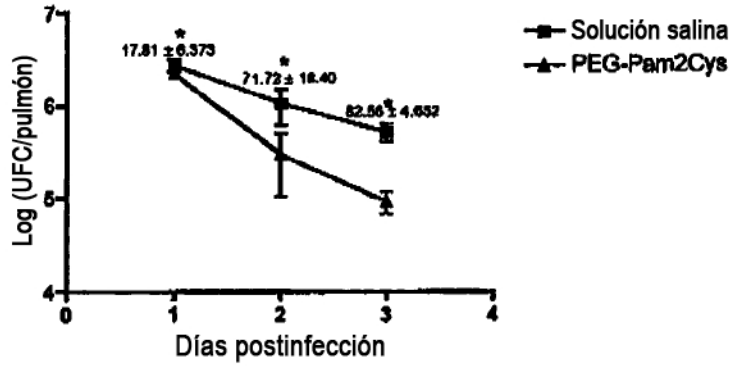


FIGURA 16

A.



B.



C.

