



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 740**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7032 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05810863 .0**
96 Fecha de presentación : **02.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1786439**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Métodos para activar células NKT.**

30 Prioridad: **03.09.2004 US 606941 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.09.2010

73 Titular/es: **The University of Chicago**
5801 South Ellis Avenue
Chicago, Illinois 60637, US
The Scripps Research Institute y
Brigham Young University

72 Inventor/es: **Bendelac, Albert;**
Zhou, Dapeng;
Teyton, Luc y
Savage, Paul

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Métodos para activar células NKT.

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud Provisional U.S. Serie No. 60/606,941, presentadas en septiembre 3, 2004, incorporada aquí como referencia.

10 Declaración con relación a investigación federalmente patrocinada

Esta invención fue hecha con soporte del gobierno de los Estados Unidos otorgado por Institutos Nacionales de Salud, bajo los otorgamientos P01 AL053725, RO1 AL38339 y AL50487. Los Estados Unidos tienen ciertos derechos en esta invención.

15 Introducción

La molécula CD1d es un miembro de la familia CD1 de las moléculas asociadas a microglobulina $\beta 2$. El contraste con las moléculas del complejo de histocompatibilidad principal clase I y clase II (MHC) que presentan los antígenos de péptido presentes a las células T CD8+ y CD4+, respectivamente, las moléculas CD1 han evolucionado para capturar y procesar tanto los antígenos extraños como auto lípido para desplegar un subconjunto particular de células ya conocidos de manera validas con células NKT, células T restringidas con CD1d, células NKT invariantes o iNKT. Las células NKT se caracterizan por reactividad de auto lípido y una respuesta efectuatoras rápidas. Las células NKT expresan tanto marcadores de superficie de célula cecinas naturales (NK) como un receptor de célula T semi-invariante conservado (TCR), específicamente, $V\alpha 14$ - $j\alpha 18$ pareado con $V\beta 8$ en ratones y $V\alpha 24$ - $j\alpha 18$ pareado con $V\beta 11$ en humanos.

La células NKT juegan un papel importante en un numero de funciones inmunes, que incluyen las respuestas antimicrobianas, la inmunidad antitumoral.

Y regular el balance entre la tolerancia y el auto inmunidad. Ellas expresan un fenotipo de memoria natural típicamente asociado con el reconocimiento auto reactivo y los ligandos endógenos conservados.

Un número de agonistas naturales y sintéticos para las células NKT se han reportado. El compuesto prototípico utilizado para estudiar la activación de la célula NKT *in vitro* e *in vivo* es KRN 7000, un α -galactosilceramida (α GalCer) originalmente aislada de la esponja marina *Agelas mauritianus* (Kawano, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 278, 1626-29 (1997); see also U.S. Patent No. 6,531, 453 to Taniguchi *et al.*). El trabajo previo también a establecido el requisito para el tráfico Lisosómico de las moléculas CD1d (Chiu, YH *et al.*, Nat. Immunol. 3,55-60(2002)), y los papeles de la propiedad lisosómica (Honey, K *et al.*, Nat. Immunol. 3, 1069-74 (2002)) y las proteínas spingolipidas o saposinas (Zhou, D *et al.*, Science 303, 523-27(2004); Kang SJ *et al.*, Nat Immunol. 5, 175-81 (2004); Winau F *et al.*, Nat. Immunol. 5, 169-74 (2004)). Sin embargo, el ligando natural del receptor de la célula NKT no ha sido previamente identificado.

Ogiso *et al.*, Exp. Eye Res., Academia Press Ltd., 60(2), 193-198, 1995 describe la identificación caracterización de glicoespingolípidos neutros aislado de lentes de rata y analiza las relaciones estructurales entre seis de los glicoespingolípidos neutros identificados. Sin embargo Ogiso *et al.* no relaciona al iGb3 o su precursor.

La EP 0 988 860, de Van Dommelen *et al.* J. of Virology 2003, 77(3). 1877 y Smyth *et al.* Current opinion in Immunology 2002, 14, 165 describe el uso de células NKT activas α GalCer en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, infecciones y cáncer. Sin embargo, estos documentos no se relacionan con el iGb3 o su precursor.

Resumen de la invención

Se describe aquí el descubrimiento de los inventores desligando al receptor de célula NKT natural, isoglobotrihexosilceramida (iGb3), un glicoespingolípidos lisosómicos de la función previamente desconocida. No solamente este descubrimiento suministra una herramienta investigativa para estudiar y elucidar la función de la células NKT en contextos múltiples (por ejemplo, enfermedades cancerosas, infecciosas y autoinmunes), si no también suministra una base para la aproximación terapéutica de estas condiciones también.

De acuerdo con esto, se describen aquí métodos para activar la célula NKT que incluye la etapa de poner en contacto la célula NKT con un cantidad suficiente de iGb3 para inducir la secreción de una citoquina proveniente de una célula NKT, estimular la proliferación de las células NKT o la expresión de la regulación hacia arriba de un marcador de superficie celular de la célula NKT.

En otro aspecto, la invención suministra iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciones o autoinmunes al activar la célula NKT que comprende poder en contacto la célula NKT con una cantidad suficiente de iGb3 para inducir la secreción de citoquina proveniente de la célula NKT, estimular la proliferación de célula NKT o la expresión de la regulación hacia arriba de el marcador de superficie celular de la célula NKT.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A presenta los perfiles FACS representativos que demuestran la selección tímica deficiente de las células V α 14 NKT en los ratones Hexb^{-/-}. Los porcentajes indican en los cuadrantes superiores. Los datos son representativos de cinco pares de compañeros de camada examinados en tres experimentos separados.

La Figura 1B representa los perfiles FACS de los esplenocitos y timocitos teñidos para CD4/CD8 y CD4/CD44 en el ratón es Hexb^{-/-}.

La Figura 2A describe las respuestas alternativas del V α 14 ND32.D3 y los hibridomas TCBII-no V α 14 contra los timocitos de CD1d- de los compañeros de camada Hexb^{-/-} y Hexb^{-/-}.

La Figura 2B describe las respuestas al estímulo del hibridoma de V α 14 DN32.D3 a las células de baso del Hexb^{-/-} (○) los compañeros de camada Hexb^{-/-} (●), α GalAl-(■) y ratones CD1-TD knock-in (▲). Las células de baso fueron pulsadas con variantes de α GalCer indicadas antes de la estimulación del hibridoma. Los datos son representativos de 2 experimentos separados.

La Figura 3A es un esquema de la síntesis de iGb3in de Golgi (flechas punteadas, derecha,) y su regredación en el lisosoma (flechas continuas, izquierda). De la puerta superior a la inferior, el iGb4, iGb3 y la Lactosil ceramida.

La Figura 3B describe la frecuencia del hV α 24 NKT PBL, doblemente teñido mediante anti-V α 24 y CD1d- α GalCer de tetrámeros, en PBMC cultivado durante 4 días en la presencia de 100 ng/ml α GalCer, iGb3, o medio solo como se indicó.

La Figura 3C el panel izquierdo describe la producción IFN- γ mediante la línea V α 24 NKT humana estimulada con un rango de concertación de iGb3 y α GalCer en la presencia de PBMC como las células que presentan antígeno que expresan CD1d. El panel de la derecha describe la producción de IFN- γ vs. IL-4 por la línea de V α 24 NKT humana en respuesta al PBMC radiado y 100 ng/ml de iGb3 de origen sintético, purificado y enzimático vs 100/ml de α GalCer, Gb3 o LacCer, como se indicó.

La figura 4A describe la estimulación de ratón de V α 14 hibridoma DN32.D3 mediante iGb3 e iGb4 con este derivado de médula ósea DC como CD1d- que expresa antígeno-que presenta células de Hexb^{-/-}, Hexb^{-/-} y ratón CD1-TD como se indicó.

La Figura 4B describe el estímulo de hibridoma V α 14 de ratón DN32.D3 mediante iGb3 con células dendríticas derivadas de médula ósea provenientes de compañeros de camada deficientes en (Sap^{-/-}) y insuficientes (Sap^{-/-}), como se indicó.

Figura 4C el panel de la izquierda describe la carga *in vitro* de iGb3 e iGb4 sobre el CD1d recombinante en la presencia de saposina B, visualizado mediante isoelectroenfoque. El cambio de electro movilidad indica el reemplazo parcial del GTI b mediante iGb3 y iGb4, como se indicó. El panel de la derecha muestra la presentación libre de célula DN32.D3 de iGb3 y iGb4 mediante el CD1d unido aplaca en la presencia saposinas B, como se indicó.

La Figura 5A panel de la izquierda describe la inhibición específica mediante el IB4 de la estimulación de la línea V α 24 NKT humana mediante el iGb3 pero no en PBMC pulsado con α GalCer. El panel de la derecha muestra la inhibición del CD1 d anti-humano de mAb tanto de la estimulación iGb3 como α GalCer.

La figura 5B describe la inhibición específica de la respuesta autoreactiva del CD1d del V α 14+DN32.D3 pero no de los hibridomas no-V α 14 TCB 11 y TBA7 al RBL.CD1d mediante isolectina. B4 Los resultados se expresaron como control % sin lectina, y son representativos de 4 experimentos separados.

La figura 5C describe los resultados en ELISA (medidos como una liberación GM-CSF en el sobrenadante) que demuestra la inhibición específica mediante IB4 de la respuesta auto reactiva CD1d de la línea hV α 24 NKT a las células dendríticas derivadas de PBMC solas, pero no a las respuestas de las células dendríticas derivadas de PBMC más el α GalCer. Los resultados se expresan como % del control sin lactina (es decir, 939 pg/ml para liberar exógeno y 294 pg/ml para liberar endógeno) y son representativas de 3 experimentos separados.

La figura 6A describe la enzima iGb3 marcada con FLAG-recombinante detectada mediante Western blot como se indicó mediante la flecha:

La figura 6B describe el iGb3 sintetizado detectado mediante el análisis HPTLC. Carril 1, lactosilceramida; carril 2, 48% de lactosilceramida se convirtió en iGb3 (indicado mediante la flecha) después de la incubación con enzima.

La figura 6C suministra un espectro RMN de iGb3 enzimáticamente sintetizado. El panel superior, región de campo bajo 500-MHz espectro ¹H-RMN (DMSO-d₆/2%D₂O, 35°C) de producto Gal α 1,3 Gal β 1,4 Glc β 1,1 Cer de glucosilación enzimática *in vitro* de Gal α 1,4 Glc β 1,1 Cer; panel inferior, un espectro del iGb3 químicamente sintetizado adquirido bajo condiciones idénticas. Los números Árabigos se refieren a los protones del anillo de los residuos designados mediante numerales romanos en las estructuras correspondientes. El Sph se refiere a los protones de la estructura

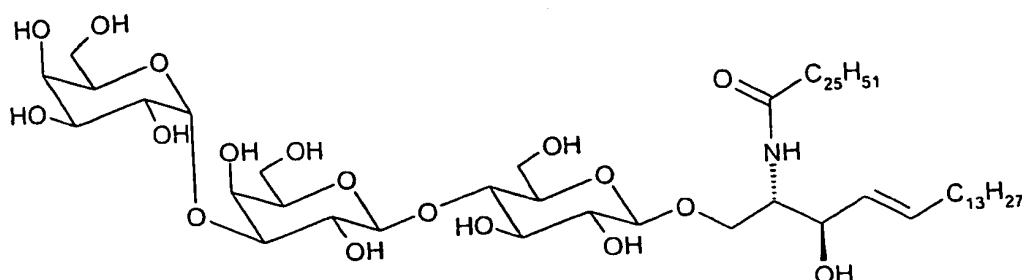
de esfingosina; S, resonancias que corresponden al sulfato residual; P, resonancias que corresponden al producto. Los picos de impureza son marcadas mediante asteriscos.

La figura 7 describe un esquema adecuado para síntesis de iGb3.

Descripción de varias realizaciones

En razón a su papel en regular varias enfermedades de amplia dispersión, la naturaleza y la diversidad de los ligandos reconocidas por las células NKT ha sido el objeto de intensa investigación y especulación. Los presentes inventores han identificado un glucoesfingolípido único, isoglobotrihexosilceramida, denominada aquí como “iGb3”, como el ligando endógeno primario tanto el ratón de V α 14 como de las células V α 24 NKT.

La estructura del iGb3 se representa mediante la siguiente formula química:



“Activar una célula NKT” aquí se refiere a inducir un efecto observable en una célula NKT que es consistente con una respuesta celular al TCR. Que se une mediante un estímulo. Los efectos observables de la activación de las células NKT incluyen secreción de las citoquinas, proliferación clonal de las células NKT y regulación hacia arriba de la expresión de los marcadores de superficie, por ejemplo, moléculas CD69 receptores IL-12 y/o moléculas DC40L.

Para activar una célula NKT de acuerdo con los presentes métodos, la células NKT es puesta en contacto con el iGb3 en una cantidad suficiente para diluir cualquiera de los efectos observables enlistados anteriormente. La activación de la célula NKT *in vivo* y *ex vivo* también se contemplan, como se discutió aquí adelante.

Una “citoquina”, como el término utilizado aquí y en la técnica, es una proteína de señalización extra celular o péptido que actúa como un mediador en la comunicación célula-a-célula. El término “citoquina” comprende cualquiera de tal molécula de señalización, y puede incluir, pero no se limita a, linfoquinas, interleuquinas, factores de necrosis tumoral, factores de activación de colonia de granulocito-macrófago e interferones.

Las citoquinas concretas por las células NKT pueden regular hacia abajo o regular las reacciones inflamatorias mediadas por célula o exhibir otras propiedades inmunosupresoras e inmunomoduladoras. Ejemplos de las citoquinas inmonosupresoras o inmunomoduladoras pueden incluir pero no están limitadas a, IL-10, IL-4, y IL-12, IL-13 y GM-CSF. Alternativamente, la citoquina secretada mediante las células NKT se pueden involucrar en la amplificación de las reacciones inflamatorias. Las citoquinas inflamatorias pueden inducir pero no están limitadas al IFN γ , IL-2, IL-1, y IL-6, IL-8, TNF, y TGF- β . Se aprecia que las respuestas de los huéspedes a las citoquinas son grandemente multifactoriales, y de acuerdo con esto, la citoquina particular enlistadas anteriormente pueden evocar una respuesta pro-inflamatoria o inmunomoduladora, dependiendo del contexto celular. Más aun, las combinaciones de cualquiera de las citoquinas anteriormente anotadas se puede secretar mediante las células NKT luego de activación.

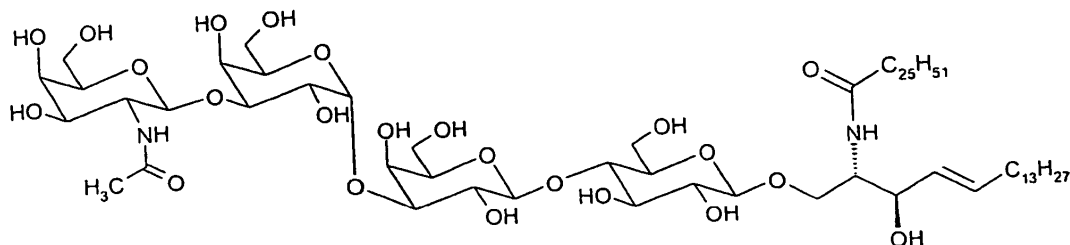
Los métodos para detectar y medir los niveles de citoquina secretados también conocidos en la técnica, incluyen, por ejemplo, ELISA, Western blotting, FACS, etc.

La proliferación de célula NKT también se puede inducir luego de la activación mediante contacto por iGb3. La proliferación es medida adecuadamente *in vitro* mediante métodos estándar, por ejemplo, ^3H -timidina o incorporación de BrdU o tñido de azul tripan.

La regulación hacia arriba de los marcadores de superficie celular también es adecuadamente observada luego de la activación de las células NKT. Por ejemplo, CD69, CD25, CD40L y los receptores IL-12 son regulados hacia arriba luego de la privación de las células NKT. Los métodos inmunológicos, tales como los FACS, se pueden utilizar para detectar la regulación hacia arriba de los marcadores de superficie celular, así como también otros métodos comúnmente empleados en la técnica.

En los presentes métodos, la activación de las células NKT se inicia típicamente al poner en contacto el TCR de la célula NKT con el iGb3. El iGb3 se puede representar mediante las moléculas CD1d sobre la superficie de las células que presentan antígeno, tales como las células dendríticas, sin embargo, la estimulación directa, es decir, el contacto del TCR con el iGb3 “libre” también se contempla. El iGb3 se puede suministra en forma purificada o puede ser

sintético. Como se utiliza aquí, “purificado” se refiere a los compuestos que se han separado de fuentes de naturales, aunque no se requiere ningún grado particular de pureza. Como se utiliza aquí “sintético” se refiere a los compuestos que se han producido de acuerdo con el proceso sintético químico o producido mediante la acción libre de enzima o un sustrato. Por ejemplo, el iGb3 se puede producir mediante la acción de síntesis de iGb3 sobre lactosilceramida, o se puede producir mediante la acción de β -hexosaminidasas sobre iGb4, que por la siguiente estructura química:



Alternativamente, el iGb3 es adecuadamente preparado de manera sintética de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, o por ejemplo como se describió en el ejemplo 6 aquí adelante.

El iGb3 es generado como un intermedio transitorio durante la síntesis del iGb4 del aparato de Golgi y durante de la degradación del iGb4 en el lisosoma (ver Figura. 3A). Los inventores han descubierto que el iGb3 lisosoma sirve como la fuente del antígeno para las células NKT restringidas a CD-1d. De acuerdo con esto, los métodos presentes pueden incluir suministrar iGb4 como un “precursor iGb3” a una célula que presenta antígeno, en donde esta se degrada a iGb3 en el lisosoma, asociado con una molécula CD1d y cargada la membrana del plasma para presentación de las células NKT.

Para no estar ligado con la teoría, se tiene la hipótesis de que el iGb3 lisosómico se podría des regular en la diabetes tipo 1 y el cáncer, donde las células NKT ejercen funciones protectoras mediadas por las endocrinas Th2 y Th1, respectivamente. Además, en razón a que los ligandos endógenos en lugar de los exógenos inducen una liberación $\text{IFN-}\gamma$ protectora mediante las células NKT durante la infección con salmonella, el iGb3 puede activar las células con NKT durante la infección así como también. De acuerdo con esto, la presente invención contempla activar una población de célula NKT dentro de un sujeto, o alternatively, activar una población de célula NKT ex vivo y reintroducir la población de célula NKT activada de regreso al sujeto. El sujeto es adecuadamente un mamífero, por ejemplo, un humano o un ratón.

Los métodos para activar una población de célula NKT en un sujeto incluyen administrar el iGb3 o un precursor iGb3 al sujeto. La administración a un sujeto de acuerdo con algunos métodos de la invención pueden incluir primero formular el iGb3 o el precursor de iGb3 con unos con unos cortadores farmacéuticamente aceptables y/o excipientes para suministrar las dosis deseadas, etc. Las comulaciones adecuadas para los compuestos terapéuticos son conocidas en la técnica. La administración se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado, que incluye una absorción intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutánea, transcutánea, oral, nasofaríngea o transmucósica, entre otras. Sustancialmente, los compuestos se administran en una cantidad efectiva para activar una población de célula NKT de tal manera que el efecto terapéutico se logra en el sujeto, por ejemplo, un efecto antineoplásico o antidiabético.

La administración del iGb3 o un precursor iGb3 a un sujeto de acuerdo con la presente invención padece de exhibir efectos benéficos de una manera dependiente de dosis. Así, dentro de amplios límites, la administración de cantidades mayores de iGb3 o del precursor iGb3 o precursor se espera para activar las células NKT en un mayor grado que lo que lo hace la administración de una cantidad más pequeña. Más aun, la eficacia también se contempla en dosis bajas de nivel en el cual se ve la toxicidad. Además, en la práctica, mayores dosis son utilizadas generalmente en donde el tratamiento terapéutico de un estado de enfermedad es el fin deseado, mientras que las dosis disminuidas son utilizadas generalmente con propósitos profilácticos.

Se apreciará que la dosis específica de administrar un caso dado se ajustará de acuerdo con los compuestos específicos que son administrados (por ejemplo, iGb3 o un precursor iGb3), la enfermedad a ser tratada, la condición del sujeto, y otros factores médicos relevantes que pueden modificar la actividad del fármaco o la respuesta del sujeto o son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la dosis específica para un paciente particular depende de la edad, peso del cuerpo, estado general de salud, de la dieta, del tiempo y del modo de administración, de la tasa excreción, y de los medicamentos utilizados en combinación y la serenidad del trastorno particular al cual se aplica a terapia. Las dosis para un paciente dado se pueden deteriorar utilizando consideraciones convencionales, por ejemplo, mediante comparación de costumbre de las actividades diferenciales de iGb3 (o de un precursor iGb3) y un agente conocido, tal como por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado.

La dosis máxima para un sujeto es la dosis más alta que no origina efectos colaterales indeseables o intolerables. El número de variables con relación al régimen de tratamiento individual es grande, y se esperan rangos considerables de dosis. Se anticipa que las dosis de iGb3 (o el precursor de iGb3) de acuerdo con la presente invención reducirá los síntomas al menos en 50% comparados con síntomas pretratamiento.

Los siguientes ejemplos se suministran para ayudar en el entendimiento adicional de la invención. Los materiales particulares y las condiciones empleadas pretenden ser adicionalmente ilustrativas de la invención y no limitantes luego del alcance razonable de las reivindicaciones finales.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

10 Métodos experimentales

Los siguientes materiales y métodos fueron utilizados en los experimentos descritos en el ejemplo 2-5.

Los ratones $\beta 2M^{-/-}$, de Jackson Labs (Bar Harbor, MA), CD1d $^{-/-}$ y CD1-TD y los ratones “Knock in” pueden llevar la molécula CD1 suprimida de cola, los ratones $\alpha Ga1A^{-/-}$ estuvieron en el trasfondo del C57BL/6; y los ratones Hexb $^{-/-}$, GM2 $^{-/-}$ y GM3 $^{-/-}$ estuvieron en el trasfondo de 129/Sv. En todos los casos, los compañeros de la camada obtenidos de las parejas heterocigotos fue reconocido el genotipo mediante PCR y utilizado para análisis comparativo. Todos los ratones son generados en un ambiente libre de patógeno específico en la Universidad de Chicago de acuerdo al cuidado animal institucional y a las guías de comité de uso.

Preparación de Linfocitos y citometría de flujo. Las preparaciones de linfocito, tetrámeros CD1d- α GalCer, y el teñido de la citometría de flujo fueron hechos acuerdo con los protocolos estándar, por ejemplo, aquellos descritos en Zhou D *et al.*, Science 303, 523-27 (2004), incorporado aquí como referencia en su totalidad.

Respuestas de células T restringidas a CD1d. Las células que presentan antígeno fueron células de baso de ratón cultivadas en 5×10^5 células/pozo, las células dendríticas derivadas de medula ósea de ratón generadas en la presencia de GMC-SF e IL4, activada durante toda la noche 10 ng/mg de TNF- α y cultivadas a 5×10^4 células/pozo, el PBMC humano o GM-CSF/IL-4 células dendríticas derivadas de PBMC- cultivadas a 2.5×10^5 células/poso. Los hibridomas NKT fueron cultivados a 5×10^4 células/poso y a la línea NKT humana fue cultivada a 2.5×10^5 células/poso. Las citoquinas liberadas en el sobrenadante del cultivo fueron medidas mediante ELISA estándar para el IL-4 y LFN- γ (Pharmingen-Becton Dickinson, CA), y el bioensayo CTLL IL2 indicador para los hibridomas de ratón. Los hibridomas NKT DN32.D3 ($V\alpha 14^+$), TCBII ($V\alpha 14^-$) y el TBA7 de leucemia de basófilo de rata RBL.CD1d línea transectal que fueron utilizadas como describió en Park, S-H *et al.*, J Immunol. 160 3128-34 (1998), incorporada aquí como referencia en su totalidad. En la línea $V\alpha 24V\beta 11$ NKT policlonal humana se derivó mediante estimulación α GalCer repetida de PBL humano saludable *in vitro* mantenida mediante PHA y reestimulación IL2, y dos diferentes subclones, CD4 y ND, como fueron utilizados en experimentos. La isolectina B4 Griffonia Simplicifolia (IB4) fue proveniente de Vector laboratories, y el CD1d mAb 51 anti-humano fue obtenido del Dr. S. Porcelli. Para la estimulación con glucolípidos sintéticos, los APC fueron pulsados durante 6 horas con varias concentraciones de lípidos (proveniente de la solución madre en DMSO), lavada e incubada con hibridoma de célula NKT o líneas celulares durante 18-24 horas.

La carga de lípidos CD1d y ensayo de presentación libre de célula. Se hicieron los complejos purificados de CD1d-GT y de intercambio de lípidos de estos complejos se cuantifico de geles con enfoque isoelectrico como se describió por Cantu C III, *et al.*, J Immunol. 170, 4673-82 (2003), incorporado aquí como referencia en su totalidad. La carga mediada por Saposina del lípido se efectuó con saposina B humana recombinante descrita en Zhou D *et al.*, Science 303, 523-27 (2004), incorporada aquí como referencia en su totalidad, y con saposina de ratón de B. La saposina de ratón recombinante de B se expreso en un sistema de expresión al vuelo y se purifico de la misma manera utilizada para la producción de DC1d de ratón, descrita en Benlagha K, *et al.*, J. Exp. Med 191, 1895-1903 (2000), incorporada aquí como referencia en su totalidad. $2 \mu M$ Mcd1d-GT se incubo con $25 \mu M$ de isoglobosido en la presencia o ausencia de $5 \mu M$ de saposina B. Tanto las saposinas de ratón como humano cargan igualmente iGb3 y el iGb4 sobre el Mcd1D-GT. La estimulación del hibridoma de la célula NKT de DN32.D3 se midió. En resumen, la proteína CD1 de ratón se recubrió durante 24 h a $1 \mu g$ /poso en una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) sobre placas de 96 posos. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS y luego encubadas durante otras 24 h con una concentración de lípido constante de $6 \mu g/ml$ y en varias concentraciones de saposina B de ratón. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS; luego se agregaron 2×10^4 células de hibridoma. Los sobrenadantes se recolectaron después de 24 h para medir la liberación IL-2.

Síntesis de iGb3. De acuerdo con la secuencia mRNA de un homólogo de ratón de enzima de sintasa iGb3 (acceso GenBank No: XM_144044), se diseñaron los cebadores para clonar una forma soluble de la enzima proveniente de el cDNA preparado de timos de ratón.

5' ATTATTATCAGGCTCATAGAAGG 3' (SEQ ID NO: 1)

5' CTAGTTTCGCACCAGCGTATATTC 3' (SEQ ID NO: 2)

Una enzima recombinante se produjo utilizando un sistema de expresión de célula de insecto Sf9, con un péptido de FLAG N-terminal para inmunopurificación mediante glóbulos de agarrosa anti-FLAG M2 (Sigma). El iGb3

etiquetado con FLAG se detectó mediante Western blot, como se mostró en la FIG. 6A. Para sintetizar el iGb3, se agregó sintasa iGb3 recombinante purificada a 1 ml de mezcla de 2 mM de UDP-galactosa (sigma), 0.2% de Triton X-100, 200 μ g lactosilceramida (Matreya) y 20 mM de MnCl₂ en 100 mM de amortiguador Tris (pH 7.4), durante toda la noche a 37°C. Los glucolípidos se purificaron mediante cromatografía de columna C18 de fase inversa y se eluyeron mediante elusión isocrática de 10% a 100% de metanol. Los productos de reacción se analizaron mediante HPTLC, como se muestra en la Figura. 6B. Las muestras de glucoesfingolípido fueron de deuterio intercambiado mediante edición repetida de CDCl₃-CD₃OD 1: 1, sonicación, evaporación bajo nitrógeno seco, y luego disueltas en 0.5 mL DMSO-d₆/29%D₂O, que contenía 0.03% de tretamilsilano como referencia de cambio químico. El espectro RMN-1D ¹H mostrado en la Figura. 6C fue adquirido a 35°C sobre un espectrómetro de Varian Inova de 500 MHz con su presión del HOD residual mediante pulso de restauración durante el retraso de relajación. Los datos espectrales para el producto biosintético se interpreta mediante comparación con aquellos de los estándares de glucoesfingolípido relevantes adquiridos bajo condiciones virtualmente idénticas así como también los datos previamente publicados.

Espectro RMN 1-D¹H de la enzima incorporada al iGb3 como se muestra en la Figura. 6C, el espectro RMN 1-D¹H de la mezcla de reacción purificada claramente exhibió resonancia H-1 consistentes con la presencia de un producto CTH que contiene un residuo de α -galactosa terminado reductor, a niveles de aproximadamente 40-50% de aquellos de sustrato aceptador CDH. La comparación con los datos con ¹H-RMN publicados para varias variantes CTH naturales, y para estándares sintéticos de los variantes CTH isoméricas Gal α 1,4 Gal β 1, 4 Glc β 1,1 Cer (iGb3) y Gal α 1,3 Gal β 1,4 Glc β 1,1 Cer (iGb3), como indicaron que los productos es iGb3. Como se mostró en la Figura. 6, resonancias diagnósticas para H-1 de Gal α 3, Gal β 4, y Glc β 1 del iGb3 se observaron en 4.836 ppm (³J_{1,2}=3.7 Hz), 4.288 ppm (³J_{1,2}=7.8 Hz) y 4.168 (³J_{1,2}=7.8 Hz), respectivamente. En contraste, el H-1 del Gala4, Gal β 4, y Glc β 1 y Gb3 se observaron a 4.798 ppm (³J_{1,2}=3.7 Hz) 4.257 ppm (³J_{1,2}=7.6 Hz), y 4.163 ppm (³J_{1,2}=7.6 Hz), respectivamente (datos no mostrados). El anterior conjunto de resonancia H-1 fue claramente recapitulada en el espectro de los productos parcialmente convertidos; así, en adición a las resonancias H-1 a 4.205 ppm (³J_{1,2}=7.0 Hz) y 4.163 (³J_{1,2}=7.7 Hz), que corresponde al H-1 del Gal β 4 y Glc β 1 del sustrato CDH, las resonancias H-1 se observaron a 4.836 ppm (³J_{1,2}=3.7 Hz) y 4.288 ppm (³J_{1,2}=7.3 Hz), idénticas a aquellas del Gala3 y el Gal β 4 de iGb3 (el cambio químico del Glc β 1 H-1 no se afecta significativamente mediante la adición del residuo Gala 3 terminal, que aparece a 4.166 ppm (³J_{1,2}=8 Hz). Las resonancias diagnósticas adicionales para la estructura iGb3 se puede observar para el H-5 del Gala α 3. H-4 del Gal β 4, y el H-4 del Gala a 3.992, 3.857, y 3.739 ppm, respectivamente, en ambos espectros. Las resonancias comparables para el H-5 del Gala4, H-4 de Gal β 4, y H-4 de Gala4 en la estructura Gb3 se observaron a 4.074, 3.791 y 3.744 ppm, respectivamente (datos no mostrados). Estas diferencias de cambio químico se pueden todas racionalizar sobre la base de influencia de protección/desprotección mutuas de átomos de los dos residuos Gal unidos uno al otro mediante enlaces α 1,3 versus α 1,4 en el iGb3 y el Gb3 respectivamente. Las características de pseudotripleta para el H-5 del Gala4 en Gb3 esta conspicuamente ausente de los espectros de ambos iGb3 y Gb3 sintéticos en la densidad de 4.074 ppm, y es en lugar traslapado con la resonancia Sph-1b observada a -3.98 ppm. Así, la identidad del producto biosintético es solamente demostrada como iGb3.

Ejemplo 2

Selección química eficiente de las células Va14 NKT y defectos de presentación de antígeno específico en ratones Hexb^{-/-}

Los linfocitos del timo y baso de los Hexb^{-/-} y los compañeros de camada Hexb^{-/-} teñidos con tetrámeros CD1d- α GalCer y anti-CD44. Los números absolutos de los linfocitos en el timo y el baso del mutante y de los ratones tipo silvestre fueron similares. Como se muestra en la Figura. 1A, los ratones Hexb^{-/-} deficientes en glucoesfingolípidos lisosomas que degradan la subunidad de la enzima β -Hexosaminidasa b, exhibió una reducción severa en las células de Va14 NKT. El tetrámero CD1d- α GalCer que tiene en ambos timos y vasos se redujo en un 5% de los compañeros de camada de control, cerca al nivel de trasfondo de los ratones deficientes en la expresión de CD1d tal como ratones β 2-microglobul^{-/-} (β 2M^{-/-}) y ratones CD1d^{-/-} (no mostrado). En contraste, como se muestra en las Figuras. 1B, el desarrollo de las células CD4 y CD8 T clásicas, inalteradas y de memoria, así como también las células B γ dT y células NK (no mostradas), se conservó.

Aunque la expresión de la superficie CD1d estuvo inalterada, como se mostró en la Figura. 2A, las células Hexb^{-/-} fallaron en provocar una respuesta del hibridoma de la célula Va14 dn32.d3. (Los timocitos β 2M^{-/-} a los que les falta la expresión CD1d sirvieron como control negativo). En contraste, la respuesta de los hibridomas NKT auto reactivos CD1d no-Va14, tal como el CD11 se conservaron, sugiriendo un defecto selectivo en la generación de ligandos lisosómicos putativos de las células Va14 NKT.

Utilizando un panel derivado diglicosilados de α GalCer que requieren procesamiento lisosómico en el α GalCer antes del reconocimiento mediante las células Va14 NKT (como se describo en Prigozyet TI *et al.*, Science 291, 664-7 (2001), incorporada aquí mediante referencia en su totalidad) las funciones lisosómicas de las células Hexb^{-/-} fueron sondeadas adicionalmente. Como se muestra en la Figura. 2B, consistentes con las especificidades del sustrato conocido de las enzimas correspondientes, hubo un defecto selectivo en la presentación del GalNAc β 1,4 Gal α Cer por las células Hexb^{-/-} mientras, las células de α -Galactosidasa A (α GalA)^{-/-} mostraron un defecto selectivo para el Gal α 1,4 Gal α Cer y Gal α 1,2 Gal α Cer. Estos resultados demostraron la naturaleza específica de los defectos de presentación del antígeno con estas mutaciones. Como se espero, las células "Knock in" CD1-TD

fueron marcadamente defectuosas en la presentación de todos estos glucolípidos de complejo, debido al reciclamiento lisosómico afectado el CD1d que lleva un truncamiento del motivo del blanco endosómico citoplasmático.

5 Ejemplo 3

El iGb3 es el ligando del mV α 14 y de las células hV α 24 NKT

Los globotrihexosilceramida sintetizados químicamente (Gb3, Gal α 1,4 Gal β 1,4 Glc β 1,1 Cer) y la isoglobotrihexosilceramida (iGb3, Gal α 1,3 gal β 1,4 Glc β 1,1 Cer) se probaron por su capacidad para estimular las células NKT de la presencia de células que presentan antígeno. Como se mostró en las Figuras. 3-4, iGb3 fue un estimulador potente tanto del V α 24 humano como de las células V α 14 NKT de ratón. Como para el α GalCer, el iGb3 estimula selectivamente y expandió las células V α 14 NKT humanas en cultivos de 4 días de PBMC (Figura. 3B). El iGb3 sintético presentado mediante PBMC irradiado estimulo un Th1 potente (IFN γ) y Th2 (IL4) secreción de citoquina mediante líneas NKT humanas policlonales (Figura. 3C, paneles de la izquierda y la derecha) así como también las líneas CD4y DN clonadas 2/2 (no mostradas). El iGb3 derivado de otras fuentes, incluye iGb3 natural purificado del intestino de gato y el iGb3 producido *in vitro* mediante la acción de iGb3 sintasa y lactosilceramida y UDP-galactosa, fueron estimulatorios también, provocando citoquinas Th1 y Th2 a niveles comparables al de α GalCer (Figura. 3C, panel de la derecha). El iGb3 presentado por las células dendríticas derivadas de médula ósea que expresan CD1d-estimularon el hibridoma de la célula mV α 14 NKT DN32.D3 (Figura. 4A) así como también 5/5 de otros hibridomas mV α 14 individuales (no mostrados) y fallaron en estimular los hibridomas 3/3 no-V α 14 (no mostrados).

Ejemplo 4

iGb4, pero no LacCer, estimulan las células NKT

Como se mostró en la Figura. 4A, panel de la derecha, iGb4 presentadas por células dendríticas derivadas de médula ósea fueron estimuladoras para ratón y humano (no mostradas) mientras que el LacCer, que también se generó mediante degradación del GM3, tampoco lo fue. También se mostró en la Figura 4A, las células Hexb^{-/-} presentadas por iGb3 pero fallaron en presentar iGb4 y el tráfico CD1d al compartimiento lisosómico fue esencial para presentar estos antígenos debido en parte a la función esencial de las saposinas (Figura. 4B) Así, el reconocimiento del ligando requiere por lo menos tres residuos de sacárido de las series isoglobos.

En un ensayo libre de célula, el iGb3 y el iGb4 requiere ambas saposina B para reemplazar el GT1b precargado sobre el CD1d (Figura. 4C. panel de la izquierda). Más aun, los complejos CD1d-iGb3 directamente simularon las células V α 14 NKT (Figura 14C, panel de la derecha). En contraste, el CD1d/iGb4 solo licitaron una respuesta muy débil. Junto con estos resultados demuestran que el iGb3 es el ligando directo de la célula V α 14 NKT y que, *in vivo*, los residuos de sacárido distantes del iGb4 tienen que ser removidos mediante la acción de β -hexosaminidasas en el lisosoma antes del reconocimiento TCR en la membrana del plasma.

Ejemplo 5

Isolectina B4 bloquea la activación de la célula NKT mediante iGb3

El bloque del desarrollo de la célula V α 14 NKT en los ratones Hexb^{-/-} en la incapacidad de los timositos Hexb^{-/-} para estimular los hibridomas V α 14 NKT siguieren que el iGb3 solo podría ser el ligando natural principal de la célula mV α 14 NKT y hV α 14 NKT. Esta se probó utilizando isolectina B4 de Griffonia Simplicifolia (IB4), una lectina altamente específica para que Gal terminal α 1,3 Gal como se encontró en el iGb3. Como se mostró en la Figura 5A, el IB4 daño la estimulación celular del hV α 14 NKT al agregar exógenamente iGb3 pero no el α GalCer. En contraste, el anti-CD1d mAb bloque lo estimulación por ambos glucolípidos. Estos resultados fueron consistentes con la especificidad del IB4 y se indicó que este reconocía los sacáridos terminales del iGb3 aun cuando se unieron al CD1d, como se podía esperar de los modelos de estructura habituales que colocan los residuos de sacarida por fuera de la ranura de las moléculas CD1 expuestas a los reconocimientos por el TCR o la lactina.

Esta propiedad del IB4 se explotó para probar si los residuos Gal α 1,3 Gal residuales contribuyeron significativamente al estímulo natural de las células mV α 14 y hV α 24 NKT. Como se muestra en la Figura. 5B, el IB4 daño el estímulo auto reactivo natural del DN32.D3 mediante las células RBL que expresan el CD1d de ratón, mientras que, como esperaba, el estímulo de los hibridomas auto reactivos sin V α 14 CD1d tales como el TBA7 y el TCB11 no se afectaron. Adicionalmente, como se muestra en la Figura. 5C, el IB4 también bloqueo el reconocimiento natural de las células dendríticas derivadas de PBMC-que expresan CD1d por la línea V α 24 NKT humana, pero fallaron en bloquear el reconocimiento al agregar exógenamente α GalCer. De manera interesante, el bloqueo de IB4 del reconocimiento del iGb3 en humanos requirió aproximadamente 1000 veces menos lactina que en ratón (0.2 ng/ml vs 0.2 μ g/ml, respectivamente). Esto es probable por que los ratones, pero no los humanos, expresan cantidad muy abundantes de un ligando IB4 adicional, el epítipo Gal α 1,3 Gal expresado sobre glicoproteína. Así, los experimentos que bloquean IB4 suministraron una confirmación independiente del papel prominente del iGb3 como un ligando natural tanto de las células mV α 14 y hV α 14 NKT.

Ejemplo 6

Síntesis del iGb3

El compuesto 2, mostrado en la Figura. 7, se utilizó como material en la generación de iGb3. El esquema sintético 1, también mostrado en la Figura. 7, se inició al acoplar el compuesto 2 con el drenador 3, seguido al remover el grupo protector bencilo. Los alcoholes restantes fueron asignados para generar el compuesto 4. El alcohol anomérico se liberó, y el trisacárido se acopló a la ceramida 5. La purificación del compuesto 6, seguido por la desprotección dio iGb3 con buen rendimiento. Los reactivos utilizados en el esquema 1 fueron como sigue (rendimiento en paréntesis):

a) AgOTf, 4 A MS, CH₂Cl₂ (61%); b) H₂, Pd/C (10%), EtOAc, EtOH (61%); c) Ac₂O, Et₃N, DMAP (95%); d) TFA, CH₂Cl₂ (99%); e1) CCl₃CN, K₂CO₃ e2) 5, BF₃-OEt, MS AW300, CH₂Cl₂; (45%); f) NaOMe, MeOH (86%).

Como se utilizó en esta especificación en las reivindicaciones finales, unas formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen las referencias plurales a menos que su contenido claramente dicte otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene “un polinucleótido” incluye una mezcla de dos o más polinucleótidos. Se debe notar también que el término “o” es generalmente empleado en el sentido de incluir “y/o” a menos que el contenido claramente dicte otra cosa. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes referenciadas en estas especificaciones son indicativas del nivel de desperdicio ordinario en la técnica a la cual esta dimensión de esta dimensión pertenece. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes son expresamente preparadas aquí mediante referencia en la misma proporción que si cada publicación individual o solicitud de patente fuera específica e individualmente indicada mediante referencia. En caso de conflicto entre la presente descripción y las patentes incorporadas, las publicaciones y referencias, la presente descripción debe prevalecer.

También se entiende específicamente que cualquier valor numérico citado aquí incluye todos los valores desde el valor inferior al valor superior, es decir, todas las posibles combinaciones de los valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto numerado para ser considerado como expresamente establecido en esta solicitud. Por ejemplo si un rango de concertación se establece como 1% a 50%, pretende que los valores tales como 2% a 40%, 10% a 30%, o 1% a 3% etc. Sean expresamente numerados en esta especificación. Esto son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes al activar la célula NKT que comprende poner en contacto la célula NKT con una cantidad suficiente de iGb3 para inducir secreción de una citoquina proveniente de la célula NKT, estimular la proliferación de la célula NKT o regular hacia arriba la expresión del marcador de la superficie celular sobre la célula NKT.
- 10 2. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el iGb3 es purificado o sintético.
- 15 3. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde poner en contacto la célula NKT comprende poner en contacto un receptor de célula T y la célula NKT.
- 20 4. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el iGb3 se presentó a la célula NKT mediante una célula que presenta antígeno que comprende una molécula CD1d.
- 25 5. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula que presenta antígeno es una célula dendrítica.
6. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 5, en donde un precursor iGb3 es suministrado a la célula que antígeno para producir iGb3.
- 30 7. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 6, en donde un precursor iGb3 es iGb4.
8. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 1 a 7, en donde las células NKT es cultivada *ex vivo*.
- 35 9. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la citoquina se selecciona el grupo que consiste de IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, TNF- α , TNF- β , IFN- γ y combinaciones de las mismas.
- 40 10. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el marcador de superficie celular es CD69, CD25 un receptor IL-12 o CD40L.
- 45 11. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula NKT es cultivada *in vitro*.
12. iGb3 o precursor iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes.
- 50 13. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el iGb3 se purifica o se sintetiza.
14. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el precursor es iGb3 también se purifica o se sintetiza.
- 55 15. iGb3 para uso en el tratamiento de trastornos cancerosos, infecciosos o autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el precursor es iGb4.

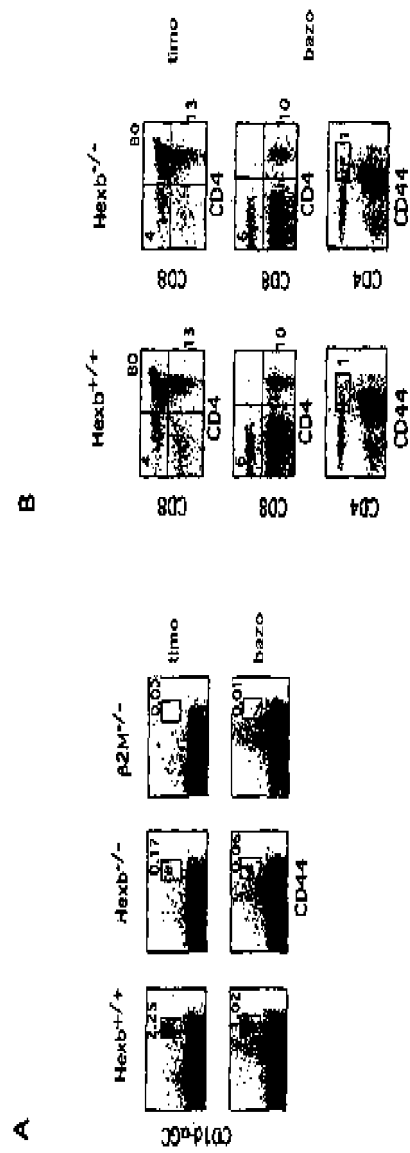


FIG. 1

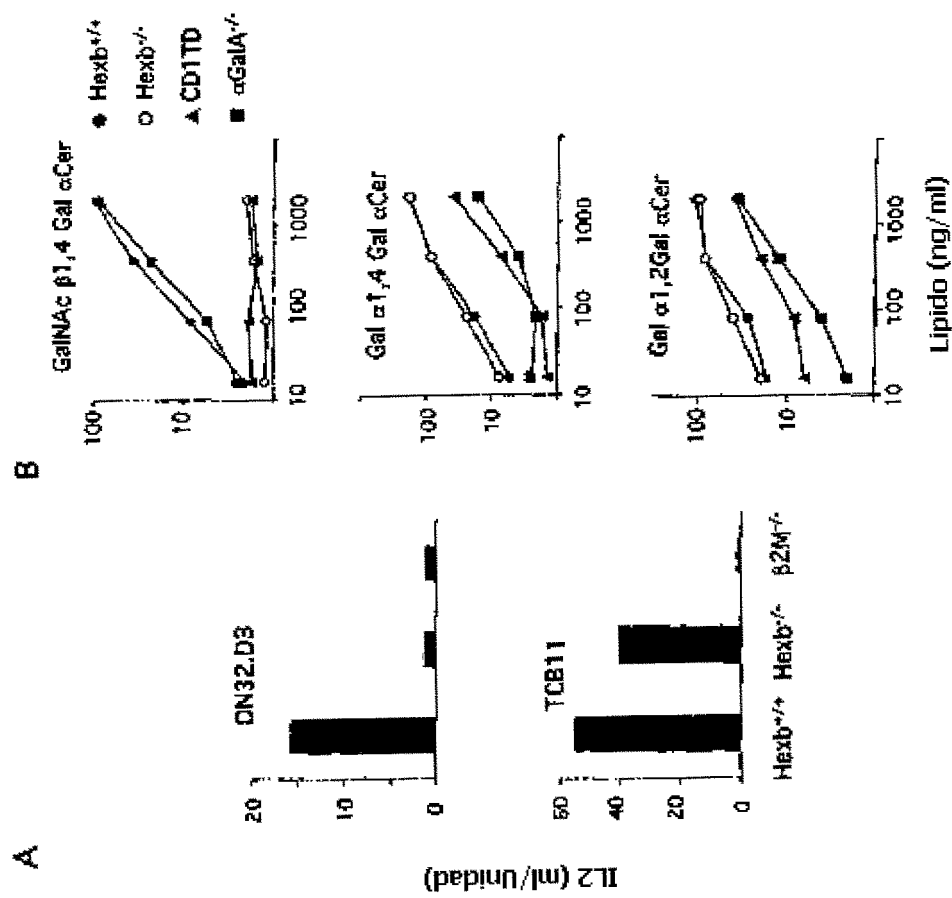


FIG. 2

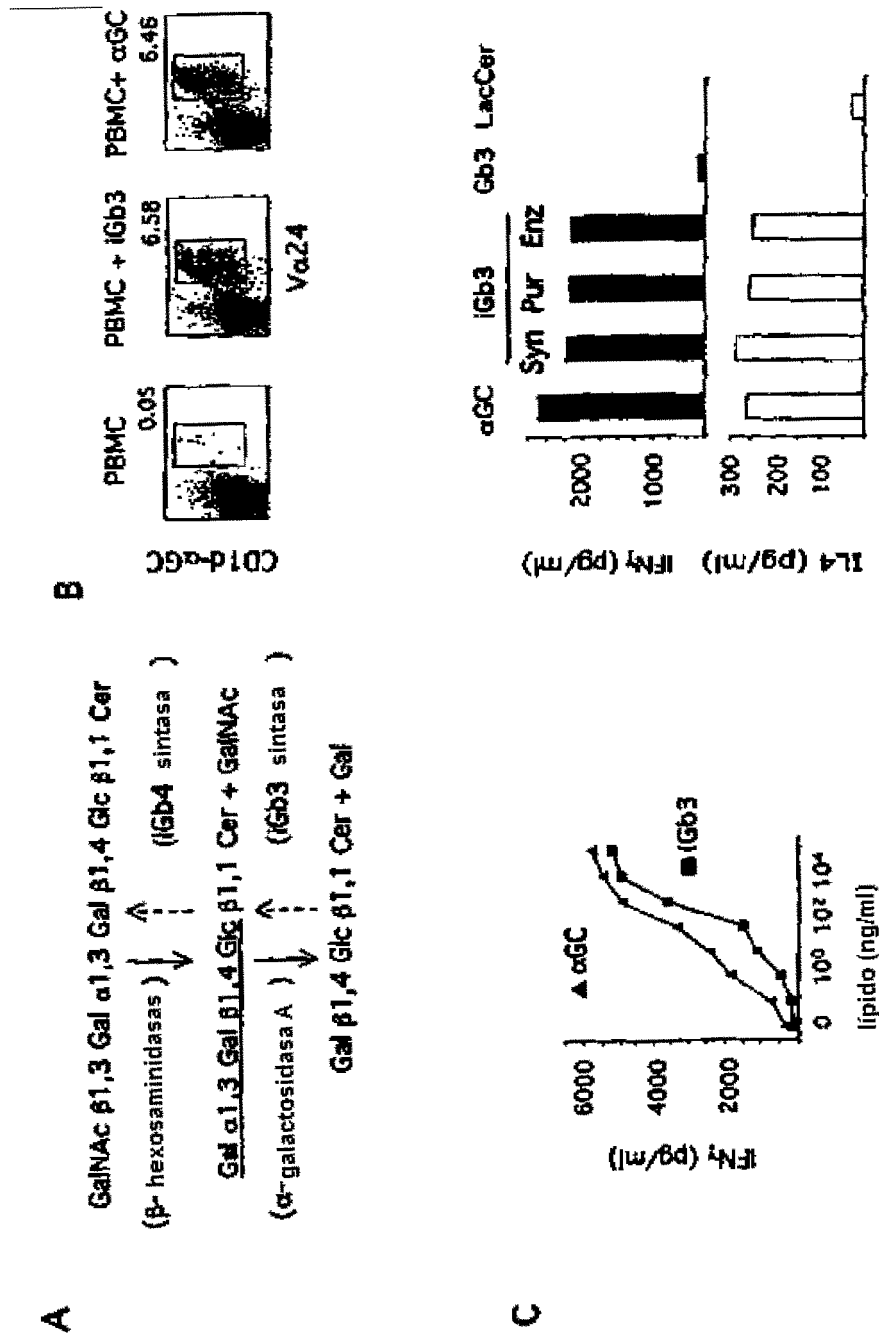


FIG. 3

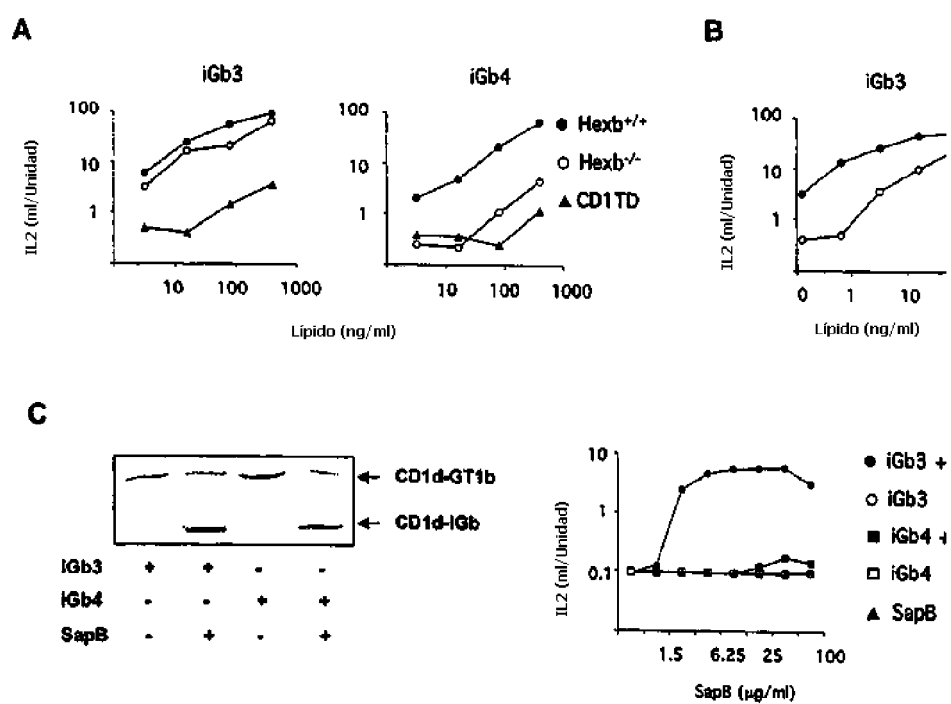


FIG. 4

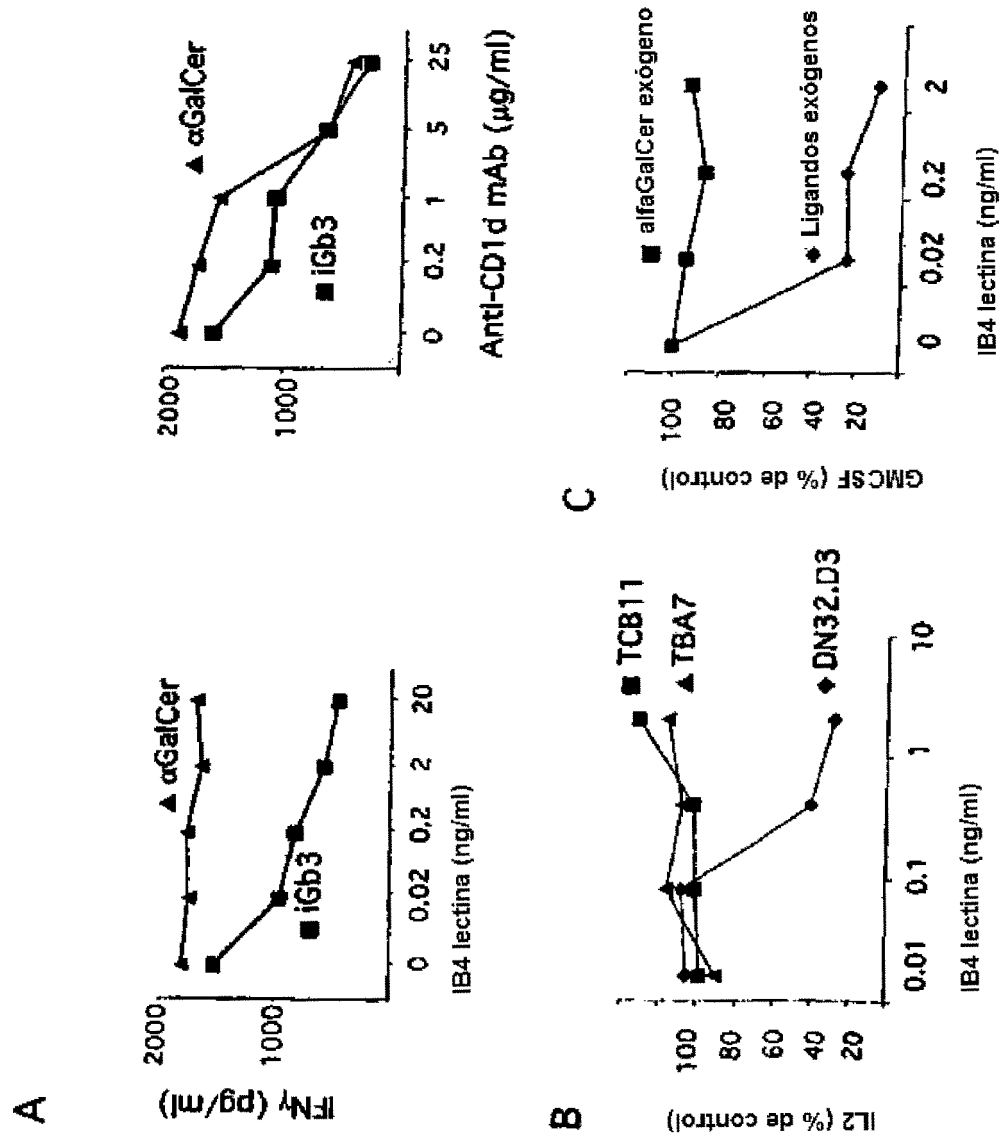


FIG. 5

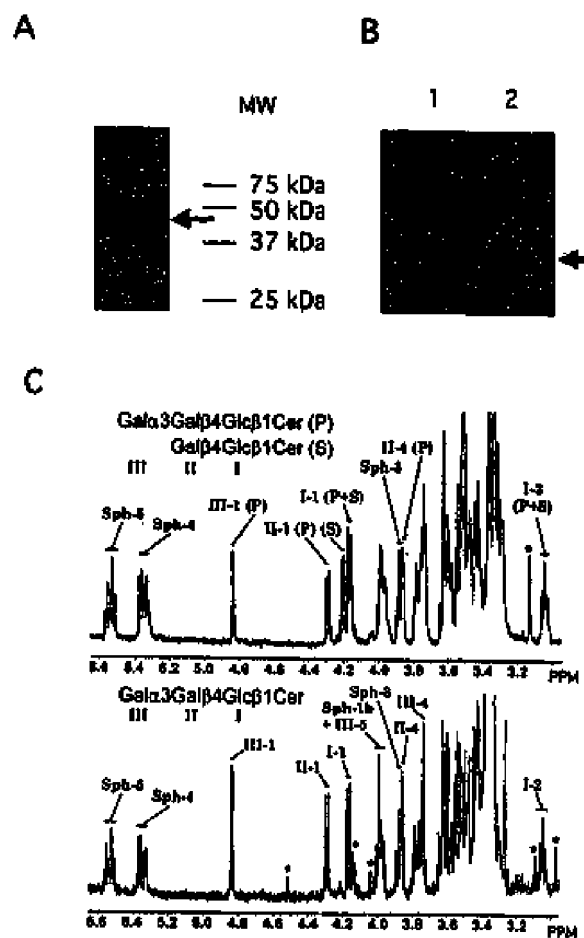
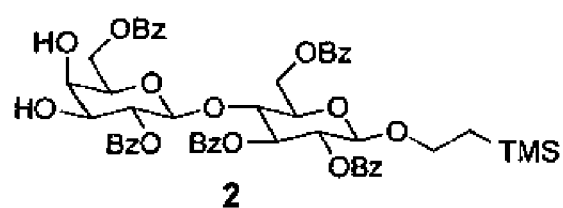


FIG. 6



Esquema 1

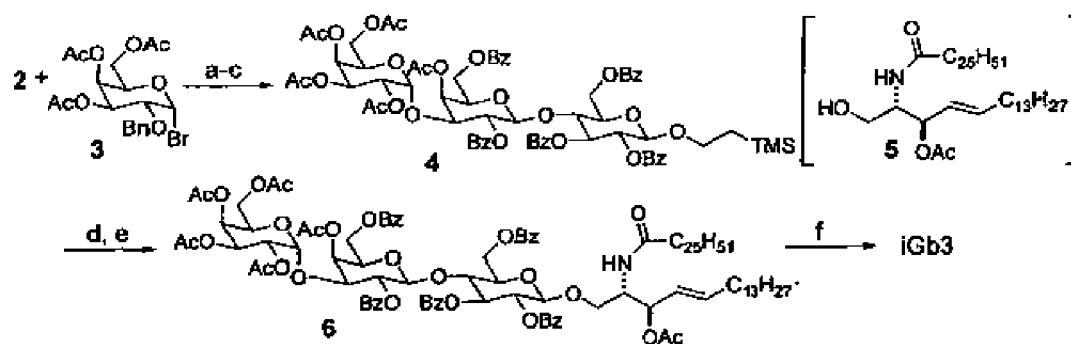


FIG. 7