



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0710668-8 A2**



(22) Data de Depósito: 09/04/2007
(43) Data da Publicação: 16/08/2011
(RPI 2119)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/70 2006.01
A61K 31/7028 2006.01

(54) Título: **ALFA-GALACTOSIL CERAMIDAS MODIFICADAS PARA MARCAR E ESTIMULAR CÉLULAS T MATADORAS NATURAIS**

(57) Resumo: α -GALACTOSIL CERAMIDAS MODIFICADAS PARA MARCAR E ESTIMULAR CÉLULAS T MATADORAS NATURAIS. Compostos de glicolípido modificados são fornecidos. Também divulgados são métodos para a ativação de uma célula NKT, métodos de estimular uma resposta imune em um paciente, e métodos adequados para marcar células NKT.

(30) Prioridade Unionista: 07/04/2006 US 60/790.096

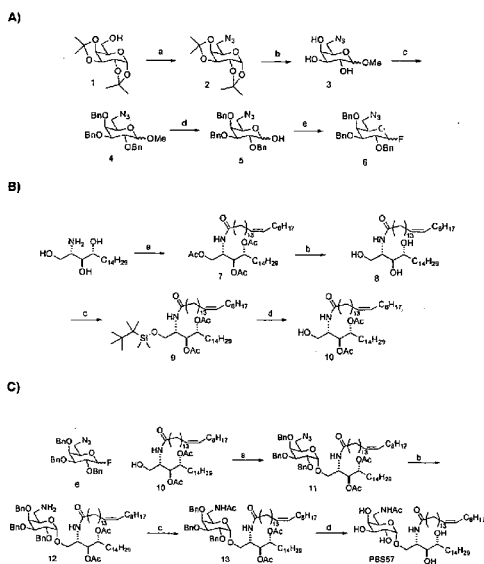
(73) Titular(es): Brigham Young University, The Scripps Research Institute, The University Of Chicago

(72) Inventor(es): Albert Bendelac, Luc Teyton, Paul B. Savage

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2007066250 de 09/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/118234 de 18/10/2007





" α -GALACTOSIL CERAMIDAS MODIFICADAS PARA MARCAR E ESTIMULAR CÉLULAS T MATADORAS NATURAIS"

INTRODUÇÃO

5 Células T matadoras naturais ("células NKT") são uma população de células de memória tipo inata/efetoras que expressam tanto receptores matadores naturais (NK) quanto um receptor de célula T conservado, semi-invariante (TCR), ($V\alpha 14$ - $J\alpha 18/V\beta 8$ em camundongos e $V\alpha 24$ - $J\alpha 18/V\beta 11$ em seres humanos). Células NKT foram implicadas em supressão de auto-imunidade e rejeição do enxerto, promoção de resistência aos patógenos, e promoção de imunidade tumoral.

10 Células NKT reconhecem antígenos lipídicos estranhos e próprios apresentados pelo membro CD1d da família de moléculas associadas à $\beta 2$ -microglobulina. Uma variedade de lipídeos com estruturas diferentes foi mostrada para ligar moléculas CD1d em uma maneira única que acomoda uma cadeia de ácido graxo em cada uma das duas bolsas de ligação hidrofóbica (A' e F) da molécula CD1d. Espécies de lipídeo capazes de ligar moléculas CD1d incluem ácidos micólicos, diacilgliceróis, esfingolipídeos, poliisoprenóides, lipopeptídeos, fosfomicetídeos e compostos hidrofóbicos pequenos. A conservação evolutiva de células NKT é evidente, como células NKT de camundongo reconhecem CD1d humano mais antígeno glicolipídico e vice-versa.

20 Células NKT respondem com vigorosa produção de citocina dentro de horas da ativação do TCR liberando-se citocinas tipo T_{H1} , incluindo IFN- γ e TNF, assim como citocinas tipo T_{H2} , incluindo IL-4 e IL-13. Assim, células NKT exibem uma dupla função: elas agem como células imunossupressoras por intermédio de sua produção de citocinas tipo T_{H2} ; e também agem como promotores imunes para realçar a imunidade mediada por célula por intermédio da produção de citocinas tipo T_{H1} .

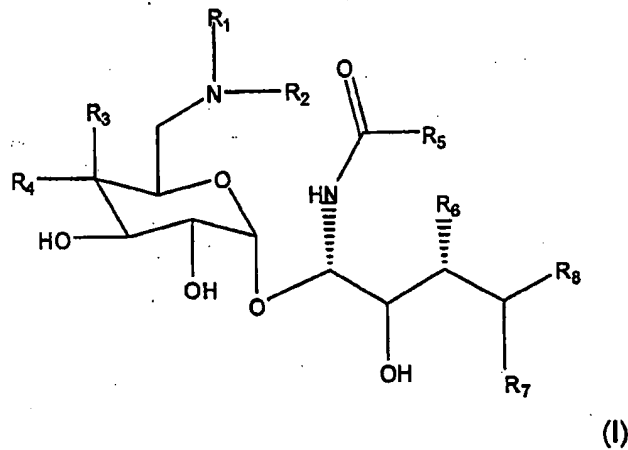
25 Células NKT foram estudadas primeiramente no contexto da apresentação de CD1d de uma α -galactosil ceramida (α GC), denominada KRN7000, a um glicolipídeo não considerado ser um antígeno natural para células NKT. O isolamento e quantificação de células NKT responsivas ao CD1d por citometria de fluxo comumente foram realizados usando tetrâmeros de CD1d marcados com fluoróforo carregados com KRN7000. KRN7000 também é usada em estudos das influências de estimulação da célula NKT em estados de doença específicos. Entretanto, fornecimentos de KRN7000, que é derivada de uma esponja marinha, foram limitados e este glicolipídeo tem solubilidade relativamente deficiente em solventes aquosos ou orgânicos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

35 α -Galactosil ceramidas modificadas fornecidas pela invenção foram descobertas para estimular células NKT mais eficazmente do que KRN7000, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Além disso, estas moléculas podem apresentar solubilidade aumentada e carga intensificada em tetrâmeros de CD1d.

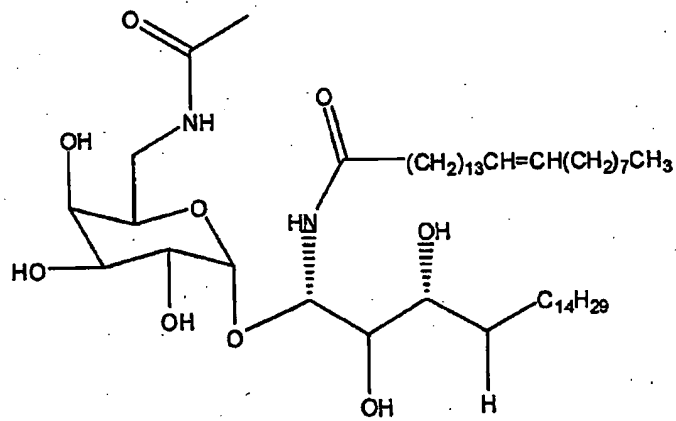
Em um aspecto, a invenção fornece um composto representado pela fórmula estrutural (I):



(I)

5 onde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ e R₈ são definidos aqui abaixo.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um composto, denominado "PBS-57," representado pela fórmula estrutural (II)



(II)

10 Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de ativar uma célula NKT compreendendo contatar a célula NKT com o composto da fórmula (I) na presença de um monômero ou tetrâmero de CD1d.

Ainda em um outro aspecto, a invenção fornece um método de estimular uma resposta imune em um paciente. O método inclui uma etapa de administrar ao paciente uma quantidade eficaz do composto da fórmula (I). Alternativamente, o método de estimular uma resposta imune em um paciente compreende uma etapa de administrar ao paciente uma população de células NKT ativadas contatando-se as células NKT com o composto da

15

fórmula (I) na presença de uma molécula CD1. Como uma terceira alternativa, o método de estimular uma resposta imune em um paciente compreende administrar ao paciente uma população de células apresentadoras de antígeno CD1+ contatadas com o composto da fórmula (I).

5 Ainda em um outro aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo um composto da fórmula (I) e um veículo fisiologicamente aceitável.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de marcar uma célula NKT em um meio compreendendo etapas de complexar um composto da fórmula (I) com um tetrâmero de CD1d para formar um complexo, contatar o complexo com a célula NKT,
10 remover o complexo não ligado do meio, e detectar o complexo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

AS FIGS. 1A, 1B e 1C representam um esquema sintético adequado para PBS-57.

A FIG. 2 representa as estruturas de um composto prototípico da invenção, denominado "PBS-57," e KRN7000.

15 A FIG. 3 representa a marcação de células $V\alpha 14/NKT$ de populações de célula do timo (A-C) e baço (D-F) do camundongo com anti-TCR β -FITC e PBS-57 (C e F), KRN7000 (B e E) ou veículo sozinho (A e D).

A FIG. 4 representa a ligação de tetrâmeros de CD1d carregados com PBS-57 às linhagens de célula de hibridoma NKT no contexto de variar TCR $V\beta$ expressado pela célula
20 NKT. Tetrâmeros de CD1d carregados com um glicolípido não estimulante (α -galactosicolesterol) foram usados como um controle negativo.

A FIG. 5 representa a marcação de células NKT responsivas ao CD1d usando tetrâmeros de CD1d de camundongo e humano carregado com PBS-57 em amostras de sangue de primata humano e não humano.

25 A FIG. 6 representa a liberação de citocina a partir de esplenócitos de camundongo B6 estimulados com PBS-57 (quadrados pretos) ou KNR7000 (quadrados brancos).

A FIG. 7 representa concentrações de soro de INF- γ a partir de camundongos intravenosamente injetadas com quantidades indicadas de glicolídeos PBS-57 (barras pretas) ou KRN7000 (barras brancas).

30 A FIG. 8 mostra estruturas para várias formas de realização adequadas de compostos da invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE VÁRIAS FORMAS DE REALIZAÇÃO

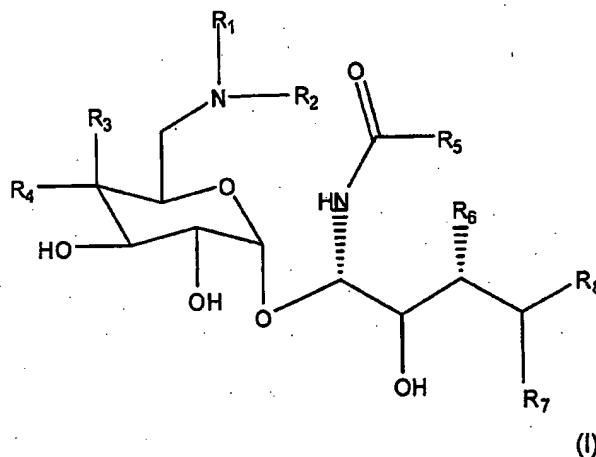
Em um esforço para encontrar compostos que ativam células NKT, os inventores sintetizaram e estudaram uma série de α -galactosil ceramidas modificadas ("aGCs"). Como
35 um resultado deste trabalho, foi determinado que uma modificação adequada para aGC é uma adição de uma ligação dupla cis na cadeia acila na porção ceramida do ácido graxo. Esta modificação foi mostrada para aumentar a solubilidade em compostos completamente

saturados e facilitar o carregamento do glicolípido no sítio de ligação de CD1d. Uma outra modificação adequada substitui o grupo hidroxila na posição C6 da galactose em aGC com uma amida ligada a uma molécula pequena. Estas modificações foram encontradas para produzir compostos que retêm a capacidade para estimular liberação de citocina por células NKT em níveis comparáveis a KRN7000.

Um composto prototípico da invenção, PBS-57 (mostrado na FIG. 1), que inclui as modificações descritas acima, marca células NKT de camundongo e humanas assim como KRN7000 e apresenta solubilidade relativamente alta. Estudos *in vitro* e *in vivo* das propriedades de estímulo da célula NKT de PBS-57 indicaram que isto estimula células NKT mais eficazmente do que KRN7000.

Compostos

Compostos da invenção são glicolípidos representados pela fórmula I, mostrada abaixo:



em que:

15 R_1 é selecionado de:

(i) C(O) R_{13} ;

(ii) C(R_{13}) R_{14} , em que R_{14} é -H, ou R_{13} ou R_{14} e R_2 tomados juntos, formam uma ligação dupla entre os átomos de carbono e nitrogênio a que eles são ligados; ou

(iii) SO_2R_{13} ;

20 em que R_{13} é halo; hidróxi, OR_9 ; OR_{10} ; amino, NHR_9 ; $N(R_9)_2$; NHR_{10} ; $N(R_{10})_2$; aralquilamino; ou alquila C_1 - C_{12} opcionalmente substituído com halo, hidroxila, oxo, nitro, OR_9 , OR_{10} , acilóxi, amino, NHR_9 , $N(R_9)_2$, NHR_{10} , $N(R_{10})_2$, aralquilamino, mercapto, tioalcóxi, $S(O)R_9$, $S(O)R_{10}$, SO_2R_9 , SO_2R_{10} , $NHSO_2R_9$, $NHSO_2R_{10}$, sulfato, fosfato, ciano, carboxila, $C(O)R_9$, $C(O)R_{10}$, $C(O)OR_9$, $C(O)NH_2$, $C(O)NHR_9$, $C(O)N(R_9)_2$, cicloalquila C_3 - C_{10} contendo R_{11} 0-3, heterocíclica C_3 - C_{10} contendo R_{11} 0-3, alquenila C_2 - C_6 , alquinila C_2 - C_6 , cicloalquenila C_5 - C_{10} , heterocicloalquenila C_6 - C_{10} , arila C_6 - C_{20} contendo R_{12} 0-3, ou heteroarila contendo

25

R_{12} 0-3; ou cicloalquila C_3-C_{10} , heterociclila C_3-C_{10} , cicloalquenila C_6-C_{10} , ou heterocicloalquenila C_5-C_{10} opcionalmente substituído com um ou mais halo hidroxila, oxo, OR_9 , OR_{10} , acilóxi, nitro, amino, NHR_9 , $N(R_9)_2$, NHR_{10} , $N(R_{10})_2$, aralquilamino, mercapto, tioalcóxi, $S(O)R_9$, $S(O)R_{10}$, SO_2R_9 , SO_2R_{10} , $NHSO_2R_9$, $NHSO_2R_{10}$, sulfato, fosfato, ciano, carboxila, $C(O)R_9$, $C(O)R_{10}$, $C(O)OR_9$, $C(O)NH_2$, $C(O)NHR_{10}$, $C(O)N(R_{10})_2$, alquila, haloalquila, cicloalquila C_3-C_{10} contendo R_{11} 0-3, heterociclila C_3-C_{10} contendo R_{11} 0-3, alquenila C_2-C_6 , alquinila C_2-C_6 , cicloalquenila C_5-C_{10} , heterocicloalquenila C_5-C_{10} , aril heteroarila C_6-C_{20} contendo R_{12} 0-3, ou heteroarila C_6-C_{20} contendo R_{12} 0-3; ou alquenila C_2-C_6 , alquinila C_2-C_6 , arila, ou heteroarila opcionalmente substituído com um ou mais halo, hidroxila, OR_9 , OR_{10} , acilóxi, nitro, amino, NHR_9 , $N(R_9)_2$, NHR_{10} , $N(R_{10})_2$, aralquilamino, mercapto, tioalcóxi, $S(O)R_9$, $S(O)R_{10}$, SO_2R_9 , SO_2R_{10} , $NHSO_2R_{10}$, sulfato, fosfato, ciano, carboxila, $C(O)R_9$, $C(O)R_{10}$, $C(O)OR_9$, $C(O)NH_2$, $C(O)NHR_9$, $C(O)N(R_9)_2$, alquila, haloalquila, cicloalquila C_3-C_{10} contendo R_{11} 0-3, heterociclila C_3-C_{10} contendo R_{11} 0-3, alquenila C_2-C_6 , alquinila C_2-C_6 , cicloalquenila C_6-C_{10} , heterocicloalquenila C_5-C_{10} , arila C_6-C_{20} contendo R_{12} 0-3, ou heteroarila C_6-C_{20} contendo R_{12} 0-3;

R_2 é -H ou alquila C_1-C_6 ;

R_3 é -H se R_4 for -OH, ou R_3 é -OH se R_4 for -H;

R_4 é -H se R_3 for -OH, ou R_4 é -OH se R_3 for -H;

R_5 é selecionado de:

(i) $-(CH_2)_XCH=CH(CH_2)_YCH_3$; ou

(ii) $-(CH_2)_XCH=CH(CH_2)_YCH=CH(CH_2)_ZCH_3$, em que X, Y e Z são números inteiros

independentemente selecionados de 1 a cerca de 14;

R_6 é -OH ou forma uma ligação dupla com R_7 ;

R_7 é -H ou forma uma ligação dupla com R_6 ;

R_8 é um hidrocarboneto saturado ou insaturado tendo de cerca de 5 a cerca de 15 átomos de carbono;

cada R_9 é independentemente um alquila C_1-C_{20} opcionalmente substituído com halo, hidroxila, alcóxi, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato;

cada R_{10} é independentemente um arila opcionalmente substituído com halo, haloalquila, hidróxi, alcóxi, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato;

cada R_{11} é independentemente halo, haloalquila, hidróxi, alcóxi, oxo, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato; e

cada R_{12} é independentemente halo, haloalquila, hidróxi, alcóxi, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato.

Em formas de realização particulares de compostos da fórmula I, R_5 é (i), X é 13 e Y é 7. Em outras formas de realização adequadas, R_1 é $-CH_3$. Ainda em outras formas de realização, R_1 é (i) e R_{13} é $-CH_3$; R_5 é (i), e X é 13, e Y é 7; R_6 é -OH; R_7 é -H; e R_8 é $C_{14}H_{29}$.

Em outras formas de realização, se R_1 é (i) então R_{13} não é $-\text{CH}_3$; se R_5 é (i) então x e y não são 13 e 7, respectivamente; R_6 não é $-\text{OH}$; R_7 não é $-\text{H}$; e R_8 não é $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$. Estruturas para vários exemplos adequados de compostos da invenção são mostradas na FIG. 8.

Termos usados na descrição acima de glicolípídeos da invenção são definidos como segue:

O termo "glicolípídeo" refere-se a qualquer composto contendo um ou mais resíduos de monossacarídeo (porção "glico") unidos por uma ligação glicosídica a uma porção hidrofóbica tal como um acilglicerol, um esfingóide, uma ceramida (N-acilesfingóide) ou um prenilfosfato (porção "lipídeo"). Em formas de realização particulares, um ou mais sacarídeos são ligados a uma porção ceramida.

O termo "halo" ou "halogênio" refere-se a qualquer radical de flúor, cloro, bromo ou iodo.

O termo "alquila" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto que pode ser uma cadeia reta ou cadeia ramificada, contendo o número indicado de átomos de carbono. Por exemplo, alquila $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ indica que o grupo pode ter de 1 a 12 (inclusive) átomos de carbono nele. Os termos "arilalquila" ou "aralquila" referem-se a uma porção alquila em que um átomo de alquil hidrogênio é substituído por um grupo arila, por exemplo grupos benzila ou 9-fluorenila. O termo "alquilamino" e "dialquilamino" referem-se a radicais $-\text{NH}(\text{alquil})$ e $-\text{NH}(\text{alquil})_2$ respectivamente. O termo "alcóxi" refere-se a um radical $-\text{O}$ -alquila. O termo "mercapto" refere-se a um radical SH . O termo "tioalcóxi" refere-se a um radical $-\text{S}$ -alquila.

O termo "arila" refere-se a um sistema de anel de hidrocarboneto monocíclico, bicíclico, ou tricíclico aromático, em que qualquer átomo do anel capaz de substituição pode ser substituído por um substituinte, tais como, mas não limitados a, fenila, naftila, e antracenila.

O termo "cicloalquila" como utilizado aqui inclui grupos de hidrocarboneto cíclico, bicíclico, tricíclico, ou policíclico saturado tendo 3 a 12 carbonos, em que qualquer átomo do anel capaz de substituição pode ser substituído por um substituinte. Exemplos de porções cicloalquila incluem, mas não são limitados a, cicloexila e adamantila.

O termo "heterociclila" refere-se a um sistema de anel de 3 a 10 membros monocíclico, 8 a 12 membros bicíclico, ou 11 a 14 membros tricíclico não aromático tendo 1 a 3 heteroátomos se monocíclico, 1 a 6 heteroátomos se bicíclico, ou 1 a 9 heteroátomos se tricíclico, os ditos heteroátomos selecionados de O, N, ou S (por exemplo, átomos de carbono e 1 a 3, 1 a 6, ou 1 a 9 heteroátomos de N, O, ou S se monocíclicos, bicíclicos, ou tricíclicos, respectivamente), em que qualquer átomo do anel capaz de substituição pode ser substituído por um substituinte.

O termo "cicloalquenila" como utilizado aqui inclui grupos de hidrocarboneto cíclico, bicíclico, tricíclico, ou policíclico, não aromático, parcialmente insaturado tendo 5 a 12

carbonos, preferivelmente 5 a 8 carbonos, em que qualquer átomo do anel capaz de substituição pode ser substituído por um substituinte. Exemplos de porções cicloalquila incluem, mas não são limitados a cicloexenila, cicloexadienila, ou norbornenila.

O termo "heterocicloalquenila" refere-se a um sistema de anel de 5 a 10 membros monocíclico, 8 a 12 membros bicíclico, ou 11 a 14 membros tricíclico, não aromático, parcialmente saturado tendo 1 a 3 heteroátomos se monocíclico, 1 a 6 heteroátomos se bicíclico, ou 1 a 9 heteroátomos se tricíclico, os ditos heteroátomos selecionados de O, N, ou S (por exemplo, átomos de carbono e 1 a 3, 1 a 6, ou 1 a 9 heteroátomos de N, O, ou S se monocíclicos, bicíclicos, ou tricíclicos, respectivamente), em que qualquer átomo do anel capaz de substituição pode ser substituído por um substituinte.

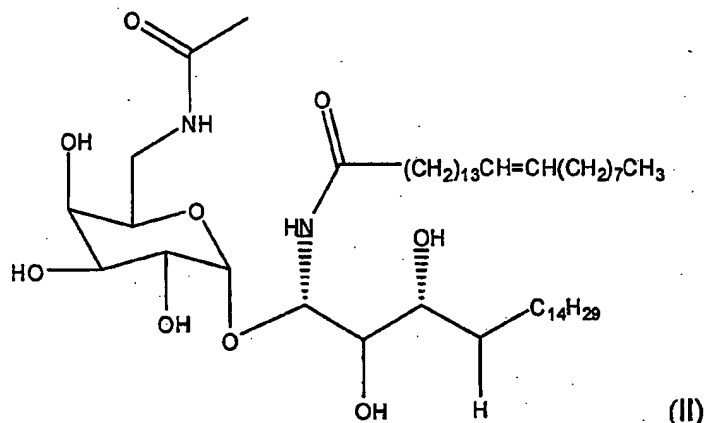
O termo "heteroarila" refere-se a um sistema de anel de 5 a 8 membros monocíclico, 8 a 12 membros bicíclico, ou 11 a 14 membros tricíclico aromático tendo 1 a 3 heteroátomos se monocíclico, 1 a 6 heteroátomos se bicíclico, ou 1 a 9 heteroátomos se tricíclico, os ditos heteroátomos selecionados de O, N, ou S (por exemplo, átomos de carbono e 1 a 3, 1 a 6, ou 1 a 9 heteroátomos de N, O, ou S se monocíclicos, bicíclicos, ou tricíclicos, respectivamente), em que qualquer átomo do anel capaz de substituição pode ser substituído por um substituinte.

O termo "oxo" refere-se a um átomo de oxigênio, que forma um carbonila quando ligado ao carbono, um N-óxido quando ligado ao nitrogênio, e um sulfóxido ou sulfona quando ligado ao enxofre.

O termo "acila" refere-se a um substituinte alquilcarbonila, cicloalquilcarbonila, arilcarbonila, heterociclicarbonila, ou heteroarilcarbonila, qualquer dos quais pode ser ainda substituído por substituintes.

O termo "substituintes" refere-se a um grupo "substituído" em um grupo alquila, cicloalquila, alquenila, alquinila, heterociclica, heterocicloalquenila, cicloalquenila, arila, ou heteroarila em qualquer átomo desse grupo. Substituintes adequados incluem, sem limitação, alquila, alquenila, alquinila, alcóxi, halo, hidróxi, ciano, nitro, amino, SO₃H, sulfato, fosfato, perfluoroalquila, perfluoroalcóxi, metilenodióxi, etilenodióxi, carboxila, oxo, tioxo, imino (alquila, arila, aralquila), S(O)_nalquila (onde n é 0 a 2), S(O)_narila (onde n é 0 a 2), S(O)_nheteroarila (onde n é 0 a 2), S(O)_nheterociclica (onde n é 0 a 2), amina (mono-, di-, alquila, cicloalquila, aralquila, heteroaralquila, e combinações destes), éster (alquila, aralquila, heteroaralquila), amida (mono-, di-, alquila, aralquila, heteroaralquila, e combinações destes), sulfonamida (mono-, di-, alquila, aralquila, heteroaralquila, e combinações destes), arila não substituído, heteroarila não substituído, heterociclica não substituído, e cicloalquila não substituído. Em um aspecto, os substituintes em um grupo são independentemente qualquer um sozinho, ou qualquer subconjunto dos substituintes anteriormente mencionados.

Um glicolípido particularmente adequado da invenção, designado "PBS-57," é representado pela fórmula estrutural II:



Como com a maioria dos glicolípidos, problemas de solubilidade são os principais para o manejo dos compostos. Os compostos são usualmente solubilizados em DMSO, e depois diluídos para realizar concentrações em soluções aquosas. Os presentes compostos foram mostrados ser mais solúveis em DMSO do que KRN7000, desse modo fornecendo baixas concentrações residuais de DMSO nas soluções de trabalho. Em formas de realização adequadas, os compostos da invenção são pelo menos cerca de 10 mg/mL em DMSO sob condições ambientes (aproximadamente 20 °C). Em mais formas de realização adequadas, os compostos da invenção são pelo menos cerca de 20 mg/mL em DMSO na temperatura ambiente. Em outras formas de realização adequadas, os compostos da invenção são pelo menos 80 %, pelo menos dobrados, ou pelo menos quadruplicados em relação à solubilidade de KRN7000 em DMSO na temperatura ambiente.

Em formas de realização particulares, compostos da invenção são capazes de ligar um monômero ou tetrâmero de CD1d. O monômero de CD1d pode ser solúvel, imobilizado em uma superfície sólida, ou expressado na superfície de uma célula NKT. Tetrâmeros de CD1d são bem conhecidos e comercialmente disponíveis. Como usado aqui, "capaz de ligar um monômero ou tetrâmero de CD1d" significa a capacidade do composto ligar CD1d em um ensaio de ligação de lipídeo, isto é, um ensaio de competição de um glicolípido carregado e um controle e resolução não carregados de moléculas CD1 carregadas com glicolípido por eletroforese com IEF (focalização isoeétrica), como descrito em Cantu *et al.*, The Paradox of Immune Molecular Recognition of α -Galactosylceramide: Low Affinity, Low Specificity for CD1d, High Affinity for $\alpha\beta$ TCRs, Journal of Immunology, 2003, 170:p. 4673-4682, a divulgação de que é incorporada aqui por referência. Como determinado por IEF, a ligação do composto às moléculas CD1d pode ser quantificada em relação à ligação de um glicolípido não carregado a moléculas CD1d. A ligação do composto a CD1d pode ser titulada para saturação e quantificada a partir de géis para IEF para determinar constantes de ligação de equilíbrio. Um composto será considerado capaz de ligar uma molécula CD1d

se ela apresentar um K_D menor do que 1mM quando determinado usando o ensaio em Cantu *et al.* citado acima.

Outros métodos para avaliar a capacidade de um composto ligar um monômero ou tetrâmero de CD1d são conhecidos e incluem, por exemplo, cromatografia de filtração em gel, eletroforese em gel, ressonância superficial com plasmon e ELISA. A ligação também pode ser avaliada marcando-se células NKT com compostos complexados a tetrâmeros de CD1d, como descrito em Liu, Y. *et al.*, *J. Immun. Methods* 2006, 312: 34-39, incorporado aqui por referência.

Usando qualquer ensaio adequado, a capacidade de um composto ligar-se às moléculas CD1d pode ser comparada às capacidades de ligação de KRN7000. Adequadamente, o composto exibe pelo menos 80 % da capacidade de ligação do CD1d de KRN7000, mais preferivelmente pelo menos 90 %, mais preferivelmente pelo menos o dobro, mais preferivelmente pelo menos o quádruplo da capacidade de ligação do CD1d de KRN7000.

Em outras formas de realização, compostos da invenção são capazes de ativar uma célula NKT. A ativação de células NKT pode ser avaliada, por exemplo, como descrito abaixo e nos exemplos.

Métodos de ativar células NKT

“Estimulação de uma célula NKT” e “ativação de uma célula NKT” são usadas permutavelmente aqui para referirem-se à indução de um efeito observável em uma célula NKT que é compatível com uma resposta celular para o ajuste do TCR da célula NKT com um antígeno apresentado no contexto da molécula CD1d. Efeitos observáveis de ativação de células NKT incluem secreção de citocinas, proliferação clonal e supra-regulação da expressão de marcadores de superfície celular, por exemplo, moléculas CD69, receptores IL-12 e/ou moléculas CD40L. Para ativar uma célula NKT de acordo com os presentes métodos, a célula NKT é contatada com um composto da invenção na presença de um monômero ou tetrâmero de CD1d. Adequadamente, um composto da invenção estimula uma célula NKT quando o composto é complexado com, ou ligado a, um monômero ou tetrâmero de CD1d. A ativação da célula NKT resulta da contatação do TCR da célula NKT com o complexo, desse modo obtendo uma resposta observável, tal como, por exemplo, expressão da citocina modificada. “Um receptor de célula T de uma célula NKT”, como o termo é usado aqui, refere-se ao TCR conservado, semi-invariante de células NKT compreendendo por exemplo, $V\alpha 14$ - $J\alpha 18/V\beta 11$ em seres humanos e $V\alpha 14$ - $J\alpha/V\beta 8$ em camundongos.

Como usado aqui, “contatar uma célula NKT” refere-se à adição *in vitro* de um composto da invenção às células NKT em cultivo, opcionalmente na presença de monômeros ou tetrâmeros de CD1d solúveis, ou insolúveis, imobilizados ou células

apresentadoras de antígeno (APCs) expressando moléculas CD1d, ou à administração *in vivo* de um composto da invenção a um paciente. O composto pode ser apresentado ao TCR da célula NKT por moléculas CD1d na superfície de uma célula apresentadora de antígeno (APC), tal como uma célula dendrítica (DC) ou macrófago. Alternativamente, moléculas CD1d podem ser plaqueadas e as células NKT e um composto da invenção podem ser adicionados às moléculas CD1d *in vitro*.

Exemplos de citocinas que podem ser secretadas por células NKT ativadas de acordo com a invenção podem incluir, mas não são limitadas a, IL-10, IL-4, e IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , e TGF- β . É avaliado que combinações de qualquer uma das citocinas observadas acima podem ser secretadas por células NKT na ativação. Métodos para detectar e medir níveis de citocinas secretadas são bem conhecidos na técnica. Como será apreciado, a avaliação da ativação da célula NKT é adequadamente realizada medindo-se a expressão da citocina pela célula NKT em relação a um controle adequado.

A proliferação da célula NKT também pode ser induzida contactando-se células NKT com um ou mais compostos da invenção. A proliferação é adequadamente medida *in vitro* por métodos padrão, por exemplo, ensaios de incorporação de ^3H -timidina ou de BrdU.

A supra-regulação de marcadores de superfície celular também é adequadamente observada na ativação de células NKT. Por exemplo, receptores CD69, CD25, CD40L e IL-12 são supra-regulados na ativação de células NKT. Métodos imunológicos, tais como FACS, podem ser usados para detectar a supra-regulação de marcadores de superfície celular, assim como outros métodos comumente utilizados na técnica. Efeitos à jusante da ativação da célula NKT, tais como indução da maturação da DC, também são observáveis, por exemplo, medindo-se a supra-regulação de CD80 e/ou CD86 em DCs.

A ativação *in vivo* e *ex vivo* de células NKT é especificamente considerada além da ativação *in vitro*. A apresentação de compostos da invenção a células NKT no contexto de moléculas CD1d resulta na ativação da célula NKT e maturação da célula dendrítica. Consequentemente, estes compostos estimulam respostas imunes contra antígenos nominais assim como agentes infecciosos e malignidades neoplásticas, incluindo tumores sólidos e hematológicos. Tanto a imunidade celular quanto a humoral pode ser estimulada administrando-se compostos agonistas de célula NKT, como ainda descrito abaixo.

Métodos de estimular uma célula NKT *in vivo*, isto é, em um paciente, incluem administrar um composto agonista de célula NKT ao paciente. A administração a um paciente de acordo com alguns métodos da invenção pode incluir primeiro formular o composto agonista de célula NKT com um veículo e/ou excipiente fisiologicamente aceitável para fornecer dosagens desejadas, estabilidade, etc. Formulações adequadas para preparações de vacina e compostos terapêuticos são conhecidas na técnica. Métodos de

estimular uma célula NKT *ex vivo* podem incluir o uso de métodos de transferência adotados com base em administrar células que foram contatadas com compostos agonistas de célula NKT *ex vivo* para estimular células NKT em um paciente. Em algumas formas de realização, as células podem ser células NKT que são estimuladas *ex vivo* e injetadas em um paciente.

5 Em outras formas de realização, as células podem ser APCs que foram contatadas com compostos da invenção *ex vivo* para permitir o carregamento das moléculas CD1d expressadas na superfície com o composto para apresentação às células NKT. As células NKT estimuladas *ex vivo* ou APCs carregadas depois podem ser administradas, por exemplo, por injeção no paciente.

10 Métodos de estimular uma resposta imune

Algumas formas de realização da invenção fornecem um método de estimular uma resposta imune em um paciente. Um "paciente" é um vertebrado, adequadamente um mamífero, mais adequadamente um ser humano. Como será avaliado, para propósitos de estudo, o paciente é adequadamente um modelo animal, por exemplo, um camundongo. "A estimulação de uma resposta imune" inclui, mas não é limitada a, indução de um efeito terapêutico ou profilático que é mediado pelo sistema imune do paciente. Mais especificamente, estimular uma resposta imune no contexto da invenção refere-se a obter uma resposta de célula NKT em um paciente administrando-se uma quantidade eficaz de um composto da invenção ao paciente, desse modo induzindo efeitos à jusante tais como produção de anticorpos, permuta de classe da cadeia pesada do anticorpo, maturação de APCs, e estimulação de células T citolíticas, células auxiliares T e tanto células de memória T quanto B. Alternativamente, a estimulação de uma resposta imune em um paciente pode ser realizada administrando-se ao paciente uma população de células NKT que foram ativadas como descrito acima ou uma população de células apresentadoras de antígeno CD1d+ que foram contatadas com um composto da invenção. Adicionalmente, qualquer combinação dos métodos acima de estimular uma resposta imune pode ser adequada.

Em algumas formas de realização, a resposta imune estimulada de acordo com a invenção pode ser uma resposta imune antimicrobiana. Uma tal resposta imune promove adequadamente a liberação de um agente infeccioso ou permite controle imune do agente tal que os sintomas da doença são reduzidos ou resolvidos, por exemplo, uma infecção persistente ou latente.

Em outras formas de realização, a resposta imune realçada pode ser uma resposta imune anti-câncer ou anti-tumor. Uma tal resposta imune promove adequadamente rejeição do tumor, reduz o volume do tumor, reduz a carga tumoral, previne a metástase, e/ou previne o retorno do tumor. O tumor pode ser qualquer tumor sólido ou hematológico, incluindo mas não limitado a leucemia, linfoma, cânceres relacionados à AIDS, cânceres de osso, cérebro, mama, sistema gastrointestinal, sistema endócrino, olho, trato geniturinário,

células germinais, órgãos reprodutivos, cabeça e pescoço, sistema musculoesquelético, pele, sistema nervoso ou sistema respiratório. Como é avaliado na técnica, uma resposta imune específica ao câncer pode ser monitorada por vários métodos, incluindo: 1) medir citotoxicidade de células efectoras, usando, por exemplo, um ensaio de liberação de cromo; 5 2) medir a secreção de citocina por células efectoras; 3) avaliar as especificidades do receptor de célula T (TCR), por exemplo, usando-se multímeros de peptídeo-MHC; 4) medir a composição clonal da resposta de célula T; e/ou 5) medir a desgranulação da célula T.

Uma resposta imune realçada também é adequadamente avaliada pelos ensaios tais como, por exemplo, ativação de células NKT, indução da produção de citocina, indução da 10 maturação de APCs, realce de funções da célula T citolíticas e auxiliares, realce do recrutamento de célula T CD8+ e CD4+, realce da produção de anticorpo, indução da permuta de classe de anticorpo e tolerância à quebra.

A estimulação de uma resposta imune em um paciente de acordo com a invenção pode ser realizada administrando-se ao paciente uma composição incluindo um composto 15 da invenção e em algumas formas de realização, um antígeno. O composto e o antígeno podem ou não induzir uma resposta imune detectavelmente realçada quando administrados a um paciente independentemente.

Adequadamente, o composto e o antígeno são co-administrados para estimular uma resposta imune em um paciente. O termo "co-administração" é significado para referir-se a qualquer protocolo de administração em que um composto da invenção e um antígeno 20 são administrados a um paciente. O composto e o antígeno podem estar nas mesmas formulações de dosagem ou formulações separadas. Onde o composto e o antígeno estão em formulações de dosagem separadas, eles podem ser administrados concorrente, simultânea ou sequencialmente (isto é, a administração de um pode diretamente suceder a 25 administração do outro ou eles podem ser fornecidos periodicamente, isto é, um pode ser fornecido em um período seguido pelo outro em um período posterior, por exemplo, dentro de uma semana), contanto que eles sejam fornecidos em uma maneira suficiente para permitir que ambos obtenham quantidades terapêutica ou profilaticamente eficazes no paciente. O composto e o antígeno também podem ser administrados por vias diferentes, 30 por exemplo, um pode ser administrado intravenosamente enquanto o segundo é administrado intramuscular, intravenosa ou oralmente.

Em algumas formas de realização, o composto é adequadamente adicionado a uma composição de vacina ou é co-administrado com uma composição de vacina. A adição de um composto da invenção a uma composição de vacina ou a co-administração com uma 35 composição de vacina pode ser particularmente adequada em casos onde o antígeno tem uma taxa baixa de eficácia como uma vacina e/ou pode ser administrado em uma quantidade ou em uma dose maior do que aquela que pode ser considerada ideal devido a

efeitos colaterais, custo e/ou disponibilidade do antígeno, etc. Exemplos de tais vacinas podem incluir, mas não são limitados a vacinas contra o papilomavírus humano, vacina contra otite média aguda (PREVNAR®), vacinas contra gripe, vacinas contra cólera e a vacina contra telomerase que causa câncer.

5 A administração a um paciente pode ser realizada por qualquer método adequado, incluindo absorção intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, transcutânea, oral, nasofaríngea ou transmucosal, entre outras. Adequadamente, um composto da invenção é administrado em uma quantidade eficaz para ativar uma célula NKT ou células tal que um efeito profilático ou terapêutico é obtido no paciente, por exemplo, uma resposta imune anti-tumor ou resposta imune antimicrobiana.

10 A administração a um paciente também inclui o uso de métodos de transferência adotados com base na administração de células que foram contatadas com um composto da invenção *ex vivo* para estimular ou realçar uma resposta imune em um paciente. Em algumas formas de realização, as células podem ser células NKT que são ativadas *ex vivo* e injetadas em um paciente para fornecer ou realçar uma resposta imune a, por exemplo, células cancerosas ou agentes infecciosos. Em algumas formas de realização, as células podem ser APCs que foram contatadas com um composto da invenção *ex vivo* para permitir o complexo com as moléculas CD1d expressado pela APC. Células apresentadoras de antígeno depois podem ser administradas, por exemplo, por injeção no paciente, para fornecer uma resposta imune adequada. Este método de administração leva em conta a estimulação da resposta imune com mínima exposição do paciente ou das células do paciente aos compostos.

15 A administração de compostos da invenção a um paciente de acordo com a invenção mostra-se para exibir efeitos benéficos em uma maneira dependente da dose. Assim, dentro de limites amplos, a administração de grandes quantidades dos compostos é esperada para ativar maiores números de células NKT ou ativar células NKT a um maior grau do que faz a administração de uma quantidade menor. Além disso, a eficácia também é considerada em dosagens abaixo do nível em que a toxicidade é observada.

20 Será avaliado que a dosagem específica administrada em qualquer caso dado será ajustada de acordo com o composto ou compostos sendo administrados, a doença a ser tratada ou prevenida, a condição do paciente, e outros fatores médicos relevantes que podem modificar a atividade do composto ou a resposta do paciente, como é bem conhecido por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, a dose específica para um paciente particular depende da idade, peso corpóreo, estado geral de saúde, dieta, o tempo e modo de administração, a taxa de excreção, medicamentos usados em combinação e a severidade do distúrbio particular a que a terapia é aplicada. Dosagens para um paciente dado podem ser determinadas usando considerações convencionais, por exemplo, por

comparação habitual das atividades diferenciais do composto da invenção e de um agente conhecido tal como α GalCer, tal como por meio de um protocolo farmacológico ou profilático convencional apropriado.

5 A dosagem máxima para um paciente é a dosagem mais alta que não causa efeitos colaterais indesejáveis ou intoleráveis. O número de variáveis no que diz respeito a um regime profilático ou de tratamento do indivíduo é grande, e uma faixa considerável de doses é esperada. É esperado que dosagens do composto de acordo com a presente invenção prevenirão ou reduzirão sintomas pelo menos 50 % comparadas aos sintomas do pré-tratamento. É especificamente considerado que preparações de vacina e composições
10 da invenção podem paliar ou aliviar sintomas da doença sem fornecer uma cura, ou, em algumas formas de realização, podem ser usadas para curar ou prevenir a doença ou distúrbio.

Quantidades de dosagem eficazes adequadas para administrar os compostos podem ser determinadas por aqueles de habilidade na técnica, mas tipicamente variam de
15 cerca de 1 micrograma a cerca de 10.000 microgramas por quilograma de peso corpóreo semanalmente, embora elas estejam tipicamente a cerca de 1.000 microgramas ou menos por quilograma de peso corpóreo semanalmente. Em algumas formas de realização, a quantidade de dosagem eficaz varia de cerca de 10 a cerca de 5.000 microgramas por quilograma de peso corpóreo semanalmente. Em uma outra forma de realização, a
20 quantidade de dosagem eficaz varia de cerca de 50 a cerca de 1.000 microgramas por quilograma de peso corpóreo semanalmente. Em uma outra forma de realização, a quantidade de dosagem eficaz varia de cerca de 75 a cerca de 500 microgramas por quilograma de peso corpóreo semanalmente. As quantidades de dosagem eficazes descritas aqui referem-se a quantidades totais administradas, isto é, se mais do que um
25 composto é administrado, as quantidades de dosagem eficazes correspondem à quantidade total administrada. O composto pode ser administrado como uma dose única semanalmente ou como doses divididas.

Em algumas formas de realização, um antígeno de tumor e o composto são co-administrados a um paciente para induzir uma resposta imune anti-tumor no paciente.
30 Adequadamente, a co-administração do antígeno com o composto realça a resposta anti-tumor e resulta na inibição do crescimento do tumor, redução da carga tumoral e tratamento de câncer, como descrito acima.

Composições

Os compostos da invenção, como descrito acima, são adequadamente incluídos em
35 uma composição com um veículo fisiologicamente aceitável. Um veículo "fisiologicamente aceitável" é qualquer veículo que é adequado para administração *in vivo* (por exemplo, administração oral, transdérmica ou parenteral) ou uso *in vitro*, isto é, cultura celular.

Veículos fisiologicamente aceitáveis adequados para administração *in vivo* incluem água, soluções tamponadas e soluções de glicose, entre outros. Um veículo adequado para cultura celular são meios celulares comercialmente disponíveis. Componentes adicionais das composições adequadamente podem incluir excipientes tais como estabilizadores, preservantes, diluentes, emulsificadores ou lubrificantes, além do veículo fisiologicamente aceitável e um ou mais compostos da invenção. Em particular, excipientes adequados incluem, mas não são limitados a, Tween 20, DMSO, sacarose, L-histadina, polisorbato 20 e soro.

Adequadamente, composições compreendendo compostos da invenção podem ser formuladas para o uso *in vivo*, isto é, administração terapêutica ou profilática a um paciente. Em algumas formas de realização, as composições são formuladas para administração parenteral. Uma forma de dosagem adequada para administração parenteral é uma injetável. Uma forma de dosagem injetável pode ser uma solução ou suspensão isotônica e pode ser preparada usando um agente de dispersão, agente umectante ou agente de suspensão adequados, como conhecido na técnica. Em outras formas de realização, as composições são formuladas para administração oral. Formas de dosagem oral adequadas incluem tabletes, cápsulas, xaropes, comprimidos e pastilhas, entre outros. Formulações de dosagem oral adequadamente incluem lactose, amido, derivados de celulose, estearato de magnésio, ácido esteárico, glicóis, e outros. Será avaliado que as composições da invenção não são limitadas a qualquer forma de dosagem exemplificada particular, mas podem ser formuladas em qualquer maneira descrita na técnica, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (2000), que é incorporada aqui por referência.

Além do composto da invenção e um veículo fisiologicamente aceitável, algumas formas de realização da invenção ainda incluem monômeros ou tetrâmeros de CD1d. Nestas composições, pelo menos uma porção do composto presente na composição é ligada a pelo menos uma porção dos monômeros ou tetrâmeros de CD1d. Opcionalmente, quantidades de moléculas CD1d e concentração do composto da invenção podem ser otimizadas tal que substancialmente todas as moléculas CD1d na composição são ligadas pelo composto da invenção.

Em outras formas de realização, o composto da invenção (ou o composto ligado por um monômero ou tetrâmero de CD1d) e um antígeno são adequadamente co-formulados em uma composição. Antígenos incluídos na composição podem ser porções polipeptídeo ou carboidrato, ou combinações destas, por exemplo, glicoproteínas. O antígeno pode ser derivado de um agente infeccioso (por exemplo, um microorganismo patogênico), um tumor, uma molécula endógena (por exemplo, uma "auto"- molécula), ou, para propósitos de estudo, um antígeno nominal, tal como ovalbumina. A composição também pode ser

formulada como uma vacina usando uma variedade de métodos preparativos conhecidos àqueles de habilidade na técnica. Ver Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (2000), que é incorporada aqui por referência.

Em algumas formas de realização, antígenos para inclusão em composições da invenção são adequadamente derivados de agentes infecciosos enfraquecidos ou mortos. Será entendido que todos os microorganismos ou porções destes (por exemplo, espectros de membrana; preparações de membrana bruta, lisatos e outras preparações de microorganismos) podem ser adequadamente incluídos como um antígeno. Agentes infecciosos adequados dos quais um antígeno pode ser derivado incluem, mas não são limitados a, vírus e microorganismos patogênicos. Em alguns contextos, antígenos adequados são obtidos ou derivados de um patógeno viral que está associado com doença humana incluindo, mas não limitada a, HIV/AIDS (*Retroviridae*, por exemplo, moléculas gp120 para isolados de HIV-1 e HIV-2, HTLV-I, HTLV-11), os vírus da gripe (*Orthomixoviridae*, por exemplo, tipos A, B e C), herpes (por exemplo, os vírus do herpes simples, HSV-1 e HSV-2, glicoproteínas gB, gD e gH), infecções pelo rotavírus (*Reoviridae*), infecções respiratórias (parainfluenza e vírus sinciciais respiratórios), Poliomielite (*Picornaviridae*, por exemplo, poliovírus, rinovírus), sarampo e caxumba (*Paramyxoviridae*), Rubéola (*Togaviridae*, por exemplo, vírus da rubéola), hepatite (por exemplo, vírus da hepatite tipos A, B, C, D, E e/ou G), citomegalovírus (por exemplo, gB e gH), gastroenterite (*Caliciviridae*), febre Amarela e do Nilo Ocidental (*Flaviviridae*), Raiva (*Rhabdoviridae*), febre hemorrágica Coreana (*Bunyaviridae*), febre Venezuelana (*Arenaviridae*), verrugas (*Papillomavirus*), vírus da imunodeficiência símia, vírus da encefalite, vírus varicela-zóster, vírus Epstein-Barr, e outras famílias de vírus, incluindo *Coronaviridae*, *Birnaviridae* e *Filoviridae*.

Antígenos bacterianos e parasíticos adequados também podem ser obtidos ou derivados de agentes bacterianos conhecidos responsáveis por doenças incluindo, mas não limitadas a, difteria, coqueluche, tétano, tuberculose, pneumonia bacteriana ou fúngica, otite média, gonorréia, cólera, febre tifóide, meningite, mononucleose, peste, disenteria bacteriana ou salmonelose, doença dos Legionários, doença de Lyme, hanseníase, malária, ancilostomíase, Oncocercose, Esquistossomose, Tripanossomíase, Leishmaniose, giardíase, amebíase, filaríase, Borrélia, e triquinose. Outros antígenos ainda podem ser obtidos ou derivados de patógenos não convencionais tais como os agentes causadores de kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), scrapie, encefalopatia transmissível da marta, e doenças consuntivas crônicas, ou de partículas protéicas infecciosas tais como príons que estão associados com a doença da vaca louca.

Patógenos específicos dos quais antígenos podem ser derivados incluem *M. tuberculosis*, *Chlamydia*, *N. gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Treponema*

pallidum, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A e B), pneumococo, meningococo, *Haemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, *Moraxella catarrhalis*, donovanose, e actinomicose; patógenos fúngicos incluem candidíase e aspergilose; patógenos parasíticos incluem Tênia, dactilogirose, nematelmintos, amebíase, giardíase, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, tricomoníase e triquinose. A presente invenção também pode ser usada para fornecer uma resposta imune adequada contra numerosas doenças veterinárias, tais como febre aftosa, coronavírus, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter*, *Strongylus vulgaris*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, e *Bordetella pertussis*, *parapertussis* e *brochiseptica*.

Em algumas formas de realização, antígenos para inclusão em composições da invenção são adequadamente antígenos derivados de tumor ou células tumorais totais autólogas ou alogênicas. Adequadamente, o antígeno de tumor é um antígeno específico de tumor (TSA) ou um antígeno associado ao tumor (TAA). Vários antígenos de tumor e seus padrões de expressão são conhecidos na técnica e podem ser selecionados com base no tipo de tumor a ser tratado. Exemplos não limitantes de antígenos de tumor incluem cdk4 (melanoma), β -catenina (melanoma), caspase-8 (carcinoma de célula escamosa), MAGE-1 e MAGE-3 (melanoma, mama, glioma), tirosinase (melanoma), idiotipo da Ig de superfície (por exemplo, BCR) (linfoma), Her-2/neu (mama, ovariano), MUC-1 (mama, pancreático) e HPV E6 e E7 (carcinoma cervical). Antígenos de tumor adequados adicionais incluem antígeno prostático específico (PSA), sialil-Tn (STn), proteínas de choque térmico e peptídeos de tumor associados (por exemplo, gp96), moléculas de gangliosídeo (por exemplo, GM2, GD2, e GD3), Antígeno carcino-embriônico (CEA) e MART-1.

25 Marcação de células NKT

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece um método para marcar células NKT em um meio. O método pode ser usado para identificar células NKT em um meio a partir de outros tipos de célula. Em uma primeira etapa, um composto da invenção é complexado a tetrâmero de CD1d solúvel. O tetrâmero é adequadamente marcado. Uma "marcação," como usado aqui, é qualquer entidade que possa ser avaliada. Marcações adequadas incluem, mas não são limitadas a estreptavidina, biotina e fluoróforos, tais como, por exemplo, PE ou FITC. As células NKT são marcadas por contato com o complexo composto marcado/tetrâmero de CD1d em um meio adequado. Um meio adequado pode ser solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou meio celular comercialmente disponível, como conhecido na técnica. Complexos glicolípido/tetrâmero não ligados podem ser removidos do meio por qualquer recurso conhecido na técnica, por exemplo, lavagem e centrifugação das células e remoção do meio. Células marcadas com o complexo podem

ser detectadas por qualquer meio adequado conhecido na técnica, tais como citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência.

Os exemplos seguintes são fornecidos para auxiliar em uma compreensão adicional da invenção. Os materiais e condições particulares utilizados são intencionados a serem
5 ainda ilustrativos da invenção e não são limitantes no escopo razoável desta.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Síntese e solubilidade de PBS-57

PBS-57 foi sintetizado como mostrado na FIG. 1. Reagentes correspondentes à FIG. 1A são como segue (rendimentos em parênteses): (a) PPh₃, DPPA, DIAD (79 %). (b)
10 AcCl, MeOH (81 %). (c) BnBr, NaH, DMF (47 %). (d) AcOH, HCl (rendimento de 69 %). (e) DAST, CH₂Cl₂ (87 %). Reagentes correspondentes à FIG. 1B são como segue (rendimentos em parênteses): (a) Ácido nervônico, DCC, NHS, THF; Ac₂O, Et₃N, DMAP, (48 %). (b) MeONa, MeOH, (71 %). (c) Cloreto de dimetiltexilsilila, piridina; Ac₂O, DMAP, (80 %). (d) THF, HF, (83 %). Reagentes correspondentes à FIG. 1C são como segue (rendimentos em
15 parênteses): (a) AgClO₄, SnCl₂, CH₂Cl₂, (56 %). b) PPh₃/H₂O, THF. c) Ac₂O, Piridina, DMAP, (total de 80 %) (d) Na⁺, NH₃, -78 °C (47 %).

A preparação dos intermediários na via sintética mostrada na FIG. 1 é descrita abaixo.

Preparação de 2: Composto 1 (3,00 g, 11,3 mmols) foi dissolvido em THF seco (20
20 mL), esfriado a 0 °C, e PPh₃ (5,95 g, 22,6 mmols) foi adicionado à solução, seguido por DIAD (5 mL, 22,6 mmols), depois DPPA (3,7 ml, 22,6 mmols). A mistura foi deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada durante a noite. A mistura foi concentrada sob pressão reduzida, depois dissolvida em EtOAc (200 ml), lavada com 5 % de HCl (80 ml), continuou a ser lavada com NaHCO₃ saturado, os extratos foram concentrados a vácuo, e o
25 produto foi purificado por cromatografia em coluna (SiO₂, EtOAc:hexanos 1:5) fornecendo um vidro transparente (2,61 g, rendimento de 79 %). RMN (¹H, CDCl₃) d 5,55 (d, J = 5,0 Hz, 1 H), 4,63 (dd, J = 2,5, 8,0 Hz, 1 H), 4,34 (dd, J = 2,5, 5,0 Hz, 1 H), 4,20 (dd, J = 2,0, 8,0 Hz, 1 H), 3,93 - 3,90 (m, 1 H), 3,51 (dd, J = 9,0, 12,5 Hz, 1 H), 3,36 (dd, J = 5,5, 13,0 Hz, 1 H), 1,55 (s, 3 H), 1,46 (s, 3 H), 1,34 (s, 3 H); ¹³C RMN (500 Hz, CDCl₃) d 109,8, 108,9, 96,5,
30 77,2, 77,0, 67,17, 50,8, 26,2, 26,1, 25,1, 24,6.

Preparação de 4: Composto 2 (3,71 g, 13,0 mmols) foi dissolvido em MeOH (40 mL), esfriado a 0 °C, e AcCl (8,6 mL) foi adicionado. A mistura foi deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada durante a noite. O solvente foi removido sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia (SiO₂, 10 % de MeOH em CH₂Cl₂)
35 produzindo 3 (como mistura de anômeros) como um sólido branco (2,31 g, rendimento de 81 %). A uma solução de 3 (1,5 g, 6,9 mmols) em DMF (60 mL) foi adicionado hidreto de sódio em óleo (1,26 g, 60 % em óleo mineral). A mistura foi agitada durante 5 min a 0 °C, depois

brometo de benzila (4,9 mL, 41,4 mmols) foi adicionado às gotas. A agitação foi continuada durante 12 h na temperatura ambiente, e depois metanol (10 mL) foi adicionado. O solvente foi removido a vácuo e o sólido resultante foi dissolvido/colocado em suspensão em CH₂Cl₂. A mistura foi lavada com HCl 2 M e água, seca (Na₂SO₄), e concentrada. Cromatografia em
 5 coluna (SiO₂, EtOAc:hexanos 1:6) forneceu 4 como um vidro transparente (1,6 g, rendimento de 47 %). RMN (¹H, CDCl₃) δ 7,40 - 7,25 (m, 15 H), 5,02 - 4,62 (m, 7 H), 4,14 - 3,76 (m, 4 H), 3,57 - 3,48 (m, 1 H), 3,39 (s, 3 H), 2,94 (dd, J = 2,4, 4,4 Hz, 1 H); RMN (¹³C, CDCl₃) δ 138,65, 138,58, 138,34, 128,68, 128,61, 128,32, 128,12, 128,01, 127,87, 127,78, 99,01, 79,16, 76,48, 75,45, 74,81, 73,89, 69,98, 55,71, 51,64; HRFAB-MS (matriz tioglicerol + H⁺)
 10 m/e ([M + H]⁺) 490,2347, calculado 490,2342.

Preparação de 5: Composto 4 (1,6 g, 3,2 mmols) foi dissolvido em ácido acético: HCl 6 M (50 mL:7 mL). A mistura foi agitada a 85 °C durante 1 h, e a solução foi concentrada sob pressão reduzida. O produto foi extraído com clorofórmio (100 mL) e lavado com água fria (2 x 50 mL), e os extratos combinados foram secos em Na₂SO₄ e
 15 concentrados a vácuo. Depois da cromatografia (SiO₂, EtOAc:hexanos 1:4), composto 5 (1,0 g, rendimento de 69 %) foi obtido como um óleo claro. RMN (¹H, CDCl₃) δ 7,39 - 7,28 (m, 15 H), 6,38 (d, J = 3,5 Hz, 1 H), 5,02 - 4,58 (m, 6 H), 4,17 (dd, J = 11,0, 4,0 Hz, 1 H), 3,91 - 3,88 (m, 3 H), 3,47 (dd, J = 12,5, 7,0 Hz, 1 H), 3,15 (dd, J = 12,5, 7,0 Hz, 1 H), 2,12 (s, 3 H); RMN (¹³C, CDCl₃) δ 169,55, 138,59, 138,13, 138,00, 128,68, 128,62, 128,57, 128,56, 128,53,
 20 128,51, 128,18, 128,13, 128,10, 128,03, 127,98, 127,85, 127,79, 127,60, 90,65, 78,67, 75,45, 75,31, 74,95, 74,69, 74,60, 74,42, 73,57, 73,53, 71,89, 50,85, 21,28; HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na⁺) m/e ([M + Na]⁺) 540,2112 (100 %), calculado 540,2111.

Preparação de 6: Composto 5 (3,09 g, 5,7 mmols) foi dissolvido em 200 mL de CH₂Cl₂, seguido por adição às gotas de DAST (0,906 mL). A solução foi agitada na
 25 temperatura ambiente durante 30 min antes que a reação fosse extinta com H₂O (30 mL). A mistura depois foi diluída com CH₂Cl₂ e lavada com água e salmoura, a camada orgânica foi seca e concentrada a vácuo. O produto desejado (2,7 g, rendimento de 87 %) foi obtido como um óleo claro depois da cromatografia (SiO₂, EtOAc:hexanos 1:6). RMN (¹H, CDCl₃) δ 7,40 - 7,25 (m, 15 H), 5,63 (dd, J = 54,0, 2,5 Hz, 1 H), 5,00 (d, J = 11,5 Hz, 1 H), 4,88 - 4,72
 30 (m, 4 H), 4,61 (d, J = 11,0 Hz, 1 H), 4,01 - 3,88 (m, 4 H), 3,51 (dd, J = 12,5, 7,5 Hz, 1 H), 3,13 (dd, J = 12,0, 6,0 Hz, 1 H); RMN (¹³C, CDCl₃) δ 138,38, 138,09, 138,07, 128,74, 128,71, 128,66, 128,56, 128,23, 128,20, 128,16, 128,04, 127,80, 107,12, 105,32, 78,45, 75,85, 75,67, 74,99, 74,48, 73,99, 73,67, 72,14, 72,11, 50,96; HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na⁺) m/e ([M + Na]⁺) 500,1956 (100 %), calculado 500,1962.

35 Preparação de 8. Ácido nervônico (3,0 g, 8,2 mmols) foi dissolvido em THF anidro (100 mL) a 5 °C seguido por NHS (1,88 g, 16,3 mmols) e DCC (3,38 g, 16,3 mmols). A mistura foi aquecida ao refluxo durante 2 h. Fitoesfingosina dissolvida em THF e piridina

foram adicionadas à mistura de reação e submetidas ao refluxo durante 12 h. Anidrido acético (9 mL) foi adicionado seguido por trietilamina (9 mL), DMAP (300 mg), e a mistura foi agitada durante 2 h. O solvente foi removido a vácuo. Triacetato 7 (3,4 g, rendimento de 48,6 %) foi isolado por cromatografia (SiO₂, EtOAc:Hexano 1:8). Metal sódio (230 mg, 10 mmols) foi adicionado a MeOH (100 mL). Triacetato 7 (3,4 g, 4,4 mmols) foi adicionado, e a mistura foi agitada durante 1 h, depois centrifugada (3000 rpm, 5 m) para fornecer um sólido branco. O sobrenadante foi removido, e o sólido enxaguado com MeOH fresco (80 mL) para remover qualquer base remanescente. Depois da remoção do sobrenadante, o sólido branco bruto (2,1 g, 71 %) foi seco sob vácuo. RMN (¹H, CDCl₃) δ 6,14 (d, J = 9,5, 1 H), 5,34 (m, 2 H), 5,12 (dd, J = 3, 8,5 Hz, 1 H), 4,93 (m, 1 H), 4,50 (m, 1 H), 4,29 (dd, J = 5, 11,5 Hz, 1 H), 4,0 (dd, J = 3,0, 11,5 Hz, 1 H), 2,21 (t, J = 7,5 Hz, 2 H), 2,08 (s, 3 H), 2,05 - 1,99 (m, 10 H), 1,66 - 1,60 (m, 4 H), 1,33 - 1,22 (m, 56 H), 0,89 (t, J = 7,0 Hz, 6 H); RMN (¹³C, CDCl₃) δ 178,25, 173,19, 171,31, 170,99, 170,20, 129,99, 73,15, 71,92, 63,05, 60,52, 47,50, 36,81, 34,11, 32,05, 29,91, 29,83, 29,80, 29,74, 29,67, 29,51, 29,45, 29,39, 29,26, 28,10, 27,33, 25,80, 25,68, 24,92, 22,82, 21,13, 20,88, 20,84, 14,30, 14,24. HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na⁺) m/e ([M + Na]⁺) 814,6526, calculado 814,6537.

Preparação de 10. Triol 8 (2,1 g, 3,09 mmols) foi dissolvido em piridina (15 mL), e cloreto de dimetiltexilsilila (0,606 ml, 3,09 mmols) foi adicionado. Depois de 5 min, anidrido acético (1,16 mL, 12,3 mmols), e DMAP (200 mg) foram adicionados, e a mistura foi agitada durante 2 h. Purificação por cromatografia (SiO₂, EtOAc:Hex 1:20) produziu 9 (2,0 g, rendimento de 80 %) como um óleo claro. Composto 9 (2,0 g, 2,4 mmols) foi dissolvido em THF (5 mL) em um tubo centrifugador (plástico), seguido por adição de HF aquoso (5 mL). Depois da conclusão da reação, a mistura foi vertida em NaHCO₃ saturado (80 mL), depois extraída com EtOAc (100 mL x 2). A camada orgânica foi seca e concentrada, depois purificada por cromatografia (SiO₂, EtOAc:Hexano 1:2) para produzir 10 como sólido branco (1,5 g, 83 %). (¹H, CDCl₃) δ 6,66 (d, J = 9,0 Hz, 1 H), 5,34 (t, J = 4,0 Hz, 1 H), 5,10 (dd, J = 2,0, 9,0 Hz, 1 H), 4,95 - 4,92 (m, 1 H), 4,20 - 4,14 (m, 1 H), 3,61 - 3,55 (m, 2 H), 2,22 (t, J = 8,0 Hz, 2 H), 2,13 (s, 3 H), 2,04 - 1,99 (m, 7 H), 1,66 - 1,60 (m, 4 H), 1,34 - 1,22 (m, 56 H), 0,89 - 0,86 (m, 6 H). RMN (¹³C, CDCl₃) δ 173,44, 171,52, 171,45, 130,08, 73,54, 72,49, 61,61, 49,74, 36,93, 32,15, 32,13, 29,94, 29,90, 29,84, 29,78, 29,76, 29,64, 29,56, 27,87, 27,42, 25,97, 25,93, 22,91, 21,27, 21,09, 14,36. HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na⁺) m/e ([M + Na]⁺) 772,6429, calculado 772,6431.

Preparação de 11. Composto 6 (112 mg, 0,21 mmol) e composto 10 (75 mg, 0,10 mmol) foram dissolvidos em CH₂Cl₂ (15 mL), e peneiras moleculares de 4 Å empoadas (900 mg) foram adicionadas. A mistura foi esfriada a 0 °C, agitada durante 10 min, e AgClO₄ (62 mg, 0,30 mmol) e SnCl₂ (57 mg, 0,30 mmol) foram introduzidos. A mistura foi deixada aquecer até a temperatura ambiente com agitação durante 3 h, depois filtrada através de

celite e lavada com CH_2Cl_2 . O filtrado combinado foi concentrado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia (SiO_2 , EtOAc:hexanos 1:7) para fornecer 11 (68 mg, rendimento de 56 %). RMN (^1H , CDCl_3) d 7,42 - 7,19 (m, 15 H), 6,67 (d, J = 9,5 Hz, 1 H), 5,37 - 5,33 (m, 2 H), 5,24 - 5,22 (m, 1 H), 4,98 (dd, J = 11,0 Hz, 3,0, 1 H), 4,93 (dt, J = 10,5 Hz, 3,0 Hz, 1 H), 4,86 - 4,55 (m, 6 H), 4,37 - 4,31 (m, 1 H), 4,03 (dd, J = 10,5 Hz, 3,0 Hz, 1 H), 3,92 - 3,77 (m, 4 H), 3,60 - 3,56 (m, 2 H), 3,05 (dd, J = 4,5 Hz, 12,5 Hz, 1 H), 2,14 (t, J = 8,0 Hz, 2 H), 2,06 - 2,00 (m, 10 H), 1,67 - 1,59 (m, 4 H), 1,38 - 1,25 (m, 56 H), 0,91 - 0,87 (m, 6 H); RMN (^{13}C , CDCl_3) d 173,20, 171,22, 170,38, 138,76, 138,40, 138,23, 130,14, 128,78, 128,67, 128,36, 128,23, 128,11, 127,85, 127,67, 100,81, 78,73, 75,01, 74,90, 73,71, 73,42, 71,64, 70,59, 60,80, 51,50, 48,40, 36,96, 32,16, 29,96, 29,68, 29,57, 27,75, 27,46, 25,96, 25,88, 22,94, 21,26, 21,17, 14,38; HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na^+) m/e ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 1229,8448, calculado 1229,8433.

Preparação de 12. A uma solução de 11 (68 mg, 0,056 mmol) em THF (3 mL), foram adicionados H_2O (0,6 ml) e trifetilfosfina (23 mg, 0,085 mmol). A mistura de reação foi agitada na temperatura ambiente durante a noite. A solução foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em THF (5 mL) e Ac_2O (0,1 ml), Et_3N (0,1 mL), e DMAP (5 mg) foram adicionados. A mistura foi agitada durante 2 h. A solução foi concentrada, e cromatografia em coluna forneceu 13 (55 mg, rendimento de 80 %). RMN (^1H , CDCl_3) d 7,41 - 7,27 (m, 15 H), 6,73 (d, J = 10,0 Hz, 1 H), 6,12 (t, J = 6,5 Hz, 1 H), 5,36 - 5,34 (m, 2 H), 5,24 (dd, J = 3,0 Hz, 13,5 Hz, 1 H), 4,96 (d, J = 11,5 Hz, 1 H), 4,86 (tt, J = 10,5, 3,0 Hz, 1 H), 4,82 - 4,65 (m, 6 H), 4,38 (tt, J = 3,0, 9,5 Hz, 1 H), 4,04 (dd, J = 3,0, 10,5 Hz, 1 H), 3,93 (dd, J = 3,0, 11,5 Hz, 1 H), 3,87 - 3,78 (m, 3 H), 3,53 - 3,46 (m, 2 H), 3,32 - 3,27 (m, 1 H), 2,13 (t, J = 8,0 Hz, 2 H), 2,06 - 2,00 (m, 10 H), 1,88 (s, 3 H), 1,72 - 1,57 (m, 4 H), 1,38 - 1,22 (m, 56 H), 0,90 - 0,87 (m, 6 H); RMN (^{13}C , CDCl_3) d 173,49, 171,74, 170,51, 170,40, 138,89, 138,64, 138,56, 130,13, 129,21, 128,65, 128,31, 128,11, 127,77, 100,91, 79,14, 76,64, 74,91, 73,84, 73,64, 71,32, 71,10, 70,27, 48,68, 40,24, 36,84, 32,14, 29,94, 29,90, 29,86, 29,82, 29,76, 29,68, 29,60, 29,55, 27,89, 27,45, 25,94, 25,79, 23,37, 22,92, 21,41, 21,19, 14,35; HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na^+) m/e ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 1245,8634, calculado 1245,8633.

Preparação de PBS57. Na° (21 mg, 0,91 mmol) foi adicionado a NH_3 líquido (20 ml) sob N_2 a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, e a mistura foi agitada durante 5 min. Composto 13 (55 mg, 0,045 mmol) foi dissolvido em THF seco (2 mL). A solução foi adicionada ao NH_3 líquido azul e agitada durante 2 h. A reação foi extinta com MeOH. Depois que a amônia foi removida, a solução foi concentrada, e cromatografia em coluna forneceu PBS57 (18 mg, 47 %). RMN (^1H , 10 % de MeOD em CDCl_3) d 5,35 (t, J = 5,0 Hz, 2 H), 4,87 (d, J = 3,0 Hz, 1 H), 4,16 - 4,13 (m, 1 H), 3,85 - 3,51 (m, 9 H), 3,24 - 3,21 (m, 1 H), 2,1 (t, J = 7,5 Hz, 2 H), 2,03 - 1,98 (m, 7 H), 1,64 - 1,52 (m, 4 H), 1,38 - 1,22 (m, 56 H), 0,89 - 0,86 (m, 6 H); RMN (^{13}C , 10 % de MeOD

em CDCl_3) d 174,61, 172,60, 129,96, 99,57, 74,71, 72,16, 69,92, 69,12, 68,88, 67,14, 50,53, 49,48, 49,30, 49,13, 48,96, 48,79, 48,62, 39,70, 36,58, 32,70, 31,97, 29,83, 29,77, 29,65, 29,56, 29,50, 29,45, 29,42, 29,39, 29,36, 27,25, 25,95, 25,91, 22,72, 22,58, 14,10; HRFAB-MS (matriz tioglicerol + Na^+) m/e ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 891,7014, calculado 891,7014.

5 A solubilidade de KRN7000 em DMSO é <5 mg/mL enquanto que a solubilidade de PBS-57 em DMSO foi de 20 mg/mL (22,4 mM).

Exemplo 2: Marcação de células NKT $\text{V}\alpha 14\text{i}$ com tetrâmeros de CD1d carregados com PBS-57

Um meio típico para isolar e quantificar células NKT responsivas ao CD1 é através de citometria de fluxo usando tetrâmeros de CD1d marcados com fluoróforo carregados com esfingoglicolípídeos. Para testar a capacidade de PBS-57 facilitar a marcação de tetrâmero de CD1d, tetrâmeros de CD1d carregados com glicolípídeo foram formados. Moléculas sCD1d de camundongo biotinizadas (em PBS) foram misturadas com PBS-57 ou KRN7000 em uma razão molar de 1:3 (proteína:lipídeo) e incubadas durante a noite na temperatura ambiente. No dia seguinte, 80 μg de estreptavidin-PE (Pharmagen) foram adicionados a 200 μg da mistura de CD1-glicolípídeo e incubados na temperatura ambiente durante 4 horas. Tetrâmeros foram armazenados a 4 °C até o uso.

Suspensões de células únicas de timócitos e esplenócitos foram isoladas de camundongos C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) como conhecido na técnica. O repertório do TCR das células NKT foi limitado com uma subunidade $\text{V}\alpha$ invariável ($\text{V}\alpha 14$ em camundongos) e subunidades $\text{V}\beta$ variadas. Células 10^6 foram incubadas com 200 μL do meio de marcação (2 % de BSA, 1 % de NaN_3 , 10 mM de EDTA em PBS) com 2,4G2 (1:100; ATCC, Manassas, VA) e Neutravidina (5 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$; Sondas Moleculares, Eugene, OR) durante 20 minutos em gelo. Células foram peletizadas e recolocadas em suspensão no meio de marcação com anti-TCR β FITC (1:100; H57-597 BD-Pharmingen, San Diego, CA) e tetrâmeros carregados com CD1/glicolípídeo ou veículo (sem glicolípídeo) conjugados com estreptavidin-PE (1:400) e incubadas em gelo durante 45 minutos. Células foram lavadas duas vezes no meio de marcação, fixadas com 1 % de paraformaldeído em PBS e analisadas por citometria de fluxo. Como observado na FIG. 3, PBS-57 marcou células NKT no baço e timo similar a KRN7000.

Exemplo 3: PBS-57 é capaz de facilitar a marcação de células NKT que expressam uma ampla variedade de subunidades do TCR $\text{V}\beta$.

O TCR expressado em células NKT é limitado a uma subunidade $\text{V}\alpha$ invariável, e uma subunidade $\text{V}\beta$ variável que responde a apresentação de glicolípídeo por CD1d. Para determinar se tetrâmeros carregados com PBS-57 foram específicos da subunidade $\text{V}\beta$ em sua capacidade de ligação, hibridomas de célula NKT expressando $\text{V}\beta$ diferente, foram testadas quanto a sua capacidade para ligar tetrâmeros de CD1d carregados com PBS-57.

Hibridomas de NKT foram estabelecidas nos laboratórios Bendelac e Hayakawa como descrito previamente (Zhou *et al.*, Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells, *Science*, 2004, 306:p. 1786 - 1788, e Gui *et al.*, TCR beta chain influences but does not solely control autoreactivity of V alpha 14J281T cells, *Journal of Immunology*, 2001, 167:p. 6239 - 6246).

Para marcação de hibridomas de célula NKT, tetrâmeros de CD1d solúveis (sCD1d) foram carregados com PBS-57 ou KRN7000 pelo procedimento seguinte. Reagentes de estoque dos seguintes foram preparados: sCD1d (1 mg/ml em solução salina tamponada com fosfato (PBS)); PBS-57 (1 mg/ml em DMSO); Tween 20 (0,5 % em PBS); e estreptavidin-APC (80 µg/mL em PBS). 10 µL de estoque de sCD1d, 1 µL de estoque de PBS-57, e 10 µL de estoque de Tween 20 foram misturados, e 79 µL de PBS foram adicionados para levar o volume até 100 µL. A solução foi incubada a 37 °C durante 3 horas. Para separar glicolípido não ligado, a mistura foi aplicada a um filtro Microcon YM30 (Miliporo) que foi previamente umedecido com PBS (400 µL). A membrana carregada foi centrifugada até que apenas ~10 µL de solução permaneceu. O volume depois foi aumentado para 100 µL por adição de PBS. A solução foi agitada para auxiliar na liberação da proteína a partir do filtro. A unidade Microcon foi invertida em um tubo Eppendorf fresco e os teores foram centrifugados no tubo. Uma alíquota de 10 µL da solução foi removida e a solução de estreptavidin-APC (5 µL) foi adicionada. A solução resultante foi incubada a 37 °C durante 2 horas.

Hibridomas de célula NKT foram colocadas em suspensão em PBS e estreptavidina (1 µg/mL) para bloquear a biotina da superfície das células durante 20 minutos na temperatura ambiente. sCD1d-estreptavidin-cicromo não carregado foi usado para avaliar a ligação não específica de tetrâmeros de CD1d vazios não carregados por incubação durante 20 minutos na temperatura ambiente. A marcação de células NKT foi pré-formada a 37 °C durante 4 horas usando o complexo glicolípido-sCD1d-estreptavidin-APC. As células foram lavadas por PBS e avaliadas por intermédio de citometria de fluxo.

Como observado na FIG. 4, variações na subunidade V_{β} do TCR na célula NKT não afetaram a ligação de tetrâmeros de CD1d carregados com PBS-57, e assim PBS-57 pode ser um ligante "universal" para células NKT.

Exemplo 4: Capacidade de PBS-57 facilitar a marcação de tetrâmero de CD1d de células NKT em amostras de sangue de primata humano e não humano.

Para testar se PBS-57 pode facilitar a ligação de célula NKT em amostras de sangue tanto de primatas humanos quanto não humanos, tetrâmeros de CD1d humano e de camundongo foram carregados com PBS-57 como descrito no Exemplo 2. Uma maioria das amostras de sangue humano continham células NKT suficientes (>0,08 % de células CD3-positivas) para observar a marcação (separadas 14 de 17 amostras), enquanto que algumas

amostras também continham poucas células NKT para permitir a detecção da marcação (Lee *et al.*, 2002). Entre os primatas não humanos, a marcação de célula NKT significativa foi observada com uma maioria de amostras de sangue de chimpanzé (separadas 6 de 10 amostras) e um quarto de amostras de macacos-reso (12 amostras). Manchas pontos representativos da marcação de célula NKT em seres humanos, chimpanzé e macacos-reso são mostrados na FIG. 5. Nenhuma marcação foi observada em amostras de macacos rabo de porco ou mangabeys cinza-escuros, isto pode ser devido à população limitada de células NKT circulando no sangue e o tamanho da amostra pequeno.

Exemplo 5: Liberação de citocina em resposta ao complexo PBS-57/tetrâmero de CD1d *in vitro*.

Para determinar se PBS-57 estimulou a liberação de citocina por células NKT *in vitro*, esplenócitos de camundongo 5×10^5 isolados de camundongos B6 foram incubados em reservatórios separados com 10^5 , 10^4 , 10^3 , 100, 10 e 1 pg/mL de PBS-57 ou KRN7000 no meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de FBS, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, 2 mM de glutamina e antibióticos. Depois de 48 horas, níveis de IL-4 e IFN γ foram medidos por ELISA (BD Pharmingen). Como observado na FIG. 6, citocina responde ao nível de PBS-57 em aproximadamente 100 pg/mL, como comparado a 1000 pg/mL para KRN7000. PBS-57 foi capaz de induzir tanto secreção de citocina Th1 quanto de Th2.

Exemplo 6: Liberação de citocina em resposta ao complexo PBS-57/tetrâmero de CD1d *in vivo*.

Para examinar se PBS-57 obteve uma resposta imune *in vivo*, a capacidade de PBS-57 e KRN7000 obter um aumento em níveis de citocina em um camundongo foi avaliada. 1 Mg/ml de soluções estoque de PBS-57 e KRN7000 em DMSO foi preparado. As soluções de PBS-57 e KRN7000 foram diluídas com PBS a 1, 100, 10^4 e 10^6 pg/mL. 100 μ L de cada solução foi injetado por via intravenosa em camundongos B6 com 6 semanas de idade. Amostras de soro foram isoladas dos camundongos em 24 horas, e a concentração de INF- γ foi avaliada por ELISA (BD Pharmingen). A FIG. 7 demonstra as concentrações de INF- γ no soro, e PBS-57 aparece para obter o nível de citocina igual a ou maior do que KRN7000.

Embora as composições e métodos desta invenção sejam descritos em termos de formas de realização exemplares, será evidente àqueles habilitados na técnica que variações podem ser aplicadas às composições e métodos e nas etapas ou na seqüência de etapas dos métodos descritos aqui sem divergir do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será evidente que certos agentes que estão relacionados tanto química quanto fisiologicamente podem ser substituídos no lugar dos agentes descritos aqui enquanto os mesmos ou resultados similares seriam obtidos. Considera-se que todos esses substitutos similares e modificações evidentes àqueles habilitados na técnica estão dentro

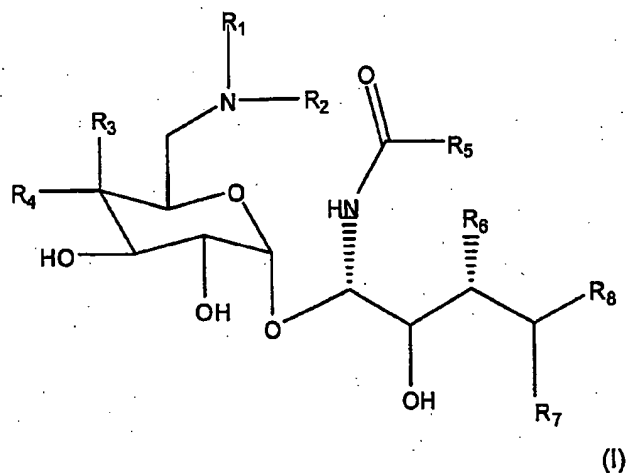
do espírito, escopo e conceito da invenção. Além disso, todas as patentes e publicações listadas ou descritas aqui são incorporadas em sua totalidade por referência.

5 Como usado neste relatório descritivo e as reivindicações anexas, as formas no singular "um(a)," e "o(a)" incluem referentes no plural a menos que o conteúdo claramente dite de outro modo. Assim, por exemplo, referência a uma composição contendo "um polinucleotídeo" inclui uma mistura de dois ou mais polinucleotídeos. Também deve ser observado que o termo "ou" geralmente é utilizado no seu sentido incluindo "e/ou" a menos que o conteúdo claramente dite de outro modo. Todas as publicações, patentes e pedido de patentes referenciados neste relatório descritivo são indicativos do nível de habilidade
10 comum na técnica a que esta invenção pertence. Todas as publicações, patentes e pedido de patentes são aqui expressamente incorporados por referência à mesma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específico e individualmente indicado por referência. No caso de conflito entre a presente divulgação e as patentes, publicações e referências incorporadas, a presente divulgação deve guiar.

15 Também é especificamente entendido que qualquer valor numérico relatado aqui inclui todos os valores do valor inferior ao valor superior, isto é, todas as combinações possíveis de valores numéricos entre o valor mais baixo e o valor mais alto enumerados devem ser consideradas serem expressamente estabelecidas neste pedido.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que é representado pela fórmula estrutural (I):



em que:

5 R₁ é selecionado de:

(i) C(O)R₁₃;

(ii) C(R₁₃)R₁₄, em que R₁₄ é -H, ou R₁₃ ou R₁₄ e R₂ tomados juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de carbono e de nitrogênio a que eles são ligados; ou

(iii) SO₂R₁₃;

10 em que R₁₃ é halo; hidróxi, OR₉; OR₁₀; amino, NHR₉; N(R₉)₂; NHR₁₀; N(R₁₀)₂; aralquilamino; ou alquila C₁-C₁₂ opcionalmente substituído com halo, hidroxila, oxo, nitro, OR₉, OR₁₀, acilóxi, amino, NHR₉, N(R₉)₂, NHR₁₀, N(R₁₀)₂, aralquilamino, mercapto, tioalcóxi, S(O)R₉, S(O)R₁₀, SO₂R₉, SO₂R₁₀, NHSO₂R₉, NHSO₂R₁₀, sulfato, fosfato, ciano, carboxila, C(O)R₉, C(O)R₁₀, C(O)OR₉, C(O)NH₂, C(O)NHR₉, C(O)N(R₉)₂, cicloalquila C₃-C₁₀ contendo

15 R₁₁ 0-3, heterocicila C₃-C₁₀ contendo R₁₁ 0-3, alquenila C₂-C₆, alquinila C₂-C₆, cicloalquenila C₅-C₁₀, heterocicloalquenila C₅-C₁₀, arila C₆-C₂₀ contendo R₁₂ 0-3, ou heteroarila contendo R₁₂ 0-3; ou cicloalquila C₃-C₁₀, heterociclila C₃-C₁₀, cicloalquenila C₅-C₁₀, ou heterocicloalquenila C₅-C₁₀ opcionalmente substituído com um ou mais halo hidroxila, oxo, OR₉, OR₁₀, acilóxi, nitro, amino, NHR₉, N(R₉)₂, NHR₁₀, N(R₁₀)₂, aralquilamino, mercapto,

20 tioalcóxi, S(O)R₉, S(O)R₁₀, SO₂R₉, SO₂R₁₀, NHSO₂R₉, NHSO₂R₁₀, sulfato, fosfato, ciano, carboxila, C(O)R₉, C(O)R₁₀, C(O)OR₉, C(O)NH₂, C(O)NHR₁₀, C(O)N(R₁₀)₂, alquila, haloalquila, cicloalquila C₃-C₁₀ contendo R₁₁ 0-3, heterociclila C₃-C₁₀ contendo R₁₁ 0-3, alquenila C₂-C₆, alquinila C₂-C₆, cicloalquenila C₅-C₁₀, heterocicloalquenila C₅-C₁₀, aril heteroarila C₆-C₂₀ contendo R₁₂ 0-3, ou heteroarila C₆-C₂₀ contendo R₁₂ 0-3; ou alquenila C₂-

25 C₆, alquinila C₂-C₆, arila, ou heteroarila opcionalmente substituído com um ou mais halo, hidroxila, OR₉, OR₁₀, acilóxi, nitro, amino, NHR₉, N(R₉)₂, NHR₁₀, N(R₁₀)₂, aralquilamino,

mercapto, tioalcóxi, $S(O)R_9$, $S(O)R_{10}$, SO_2R_9 , SO_2R_{10} , $NHSO_2R_{10}$, sulfato, fosfato, ciano, carboxila, $C(O)R_9$, $C(O)R_{10}$, $C(O)OR_9$, $C(O)NH_2$, $C(O)NHR_9$, $C(O)N(R_9)_2$, alquila, haloalquila, cicloalquila C_3-C_{10} contendo R_{11} 0-3, heterocíclica C_3-C_{10} contendo R_{11} 0-3, alquenila C_2-C_6 , alquinila C_2-C_6 , cicloalquenila C_5-C_{10} , heterocicloalquenila C_5-C_{10} , arila C_6-C_{20} contendo R_{12} 0-3, ou heteroarila C_6-C_{20} contendo R_{12} 0-3;

R_2 é -H ou alquila C_1-C_6 ;

R_3 é -H se R_4 for -OH, ou R_3 é -OH se R_4 for -H;

R_4 é -H se R_3 for -OH, ou R_4 é -OH se R_3 for -H;

R_5 é selecionado de

10 (i) $-(CH_2)_XCH=CH(CH_2)_YCH_3$; ou

(ii) $-(CH_2)_XCH=CH(CH_2)_YCH=CH(CH_2)_ZCH_3$, em que X, Y e Z são números inteiros

independentemente selecionados de 1 a cerca de 14;

R_6 é -OH ou forma uma ligação dupla com R_7 ;

R_7 é -H ou forma uma ligação dupla com R_6 ;

15 R_8 é um hidrocarboneto saturado ou insaturado tendo de cerca de 5 a cerca de 15 átomos de carbono;

cada R_9 é independentemente um alquila C_1-C_{20} opcionalmente substituído com halo, hidroxila, alcóxi, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato;

20 cada R_{10} é independentemente um arila opcionalmente substituído com halo, haloalquila, hidróxi, alcóxi, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato;

cada R_{11} é independentemente halo, haloalquila, hidróxi, alcóxi, oxo, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato; e

cada R_{12} é independentemente halo, haloalquila, hidróxi, alcóxi, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato.

25 2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que R_5 é (i), X é 13 e Y é 7.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que R_1 é $-CH_3$.

30 4. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que:

R_1 é (i) e R_{13} é $-CH_3$;

R_5 é (i), e X é 13, e Y é 7;

R_6 é -OH;

R_7 é -H; e

35 R_8 é $C_{14}H_{29}$.

5. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que:

se R_1 é (i) então R_{13} não é $-\text{CH}_3$;

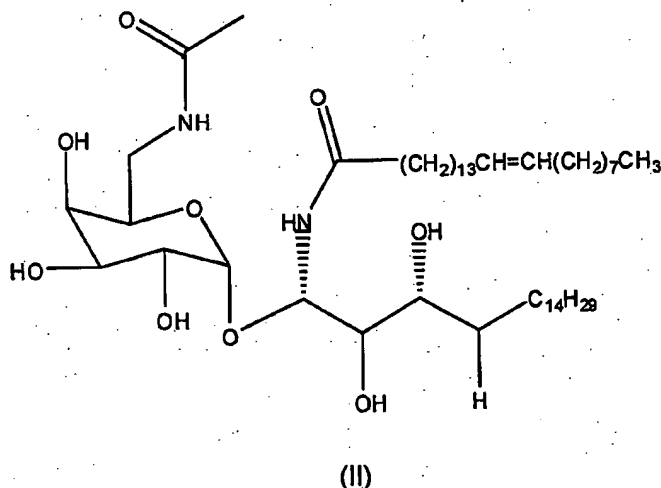
se R_5 é (i) então x e y não são 13 e 7, respectivamente;

R_6 não é $-\text{OH}$;

R_7 não é $-\text{H}$; e

5 R_8 não é $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$.

6. Composto, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é representado pela fórmula estrutural (II)



7. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a solubilidade do composto é pelo menos cerca de 20 mg/mL em DMSO.

8. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o composto é capaz de ligar um monômero ou tetrâmero de CD1d.

9. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o composto é capaz de ativar uma célula NKT.

10. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o composto de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 e um veículo fisiologicamente aceitável.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ainda um monômero ou tetrâmero de CD1d, em que o composto é ligado ao monômero ou tetrâmero de CD1d.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ainda um antígeno.

13. Método de ativar uma célula NKT, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende contatar a célula NKT com o composto de acordo com a reivindicação 9 na presença de um monômero ou tetrâmero de CD1d.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o composto é ligado ao monômero ou tetrâmero de CD1d.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o monômero ou tetrâmero de CD1d é solúvel.

5 16. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o monômero de CD1d é expressado em uma superfície da célula.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a célula é uma célula apresentadora de antígeno.

10 18. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a ativação da célula NKT é caracterizada por expressão de citocina modificada em relação a um controle.

19. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a célula NKT é ativada *in vitro*.

15 20. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a célula NKT é ativada *in vivo*.

20 21. Método de estimular uma resposta imune em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de: a) o composto de acordo com a reivindicação 9; b) uma população de células NKT ativadas de acordo com o método da reivindicação 13; c) uma população de células apresentadoras de antígeno CD1d+ contatadas com o composto de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6; ou d) qualquer combinação de a), b) e c).

22. Método de marcar uma célula NKT em um meio **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

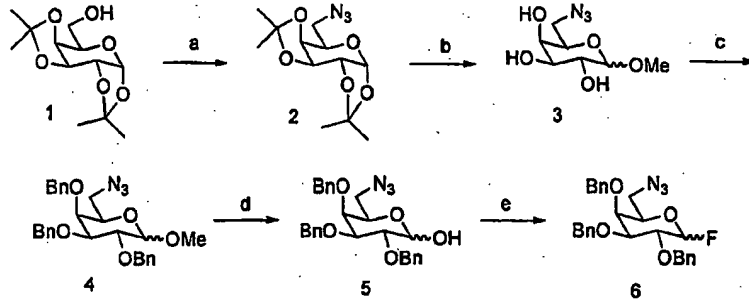
25 a) complexar o composto de acordo com a reivindicação 9 com um tetrâmero de CD1d para formar um complexo;

b) contatar a célula NKT com o complexo;

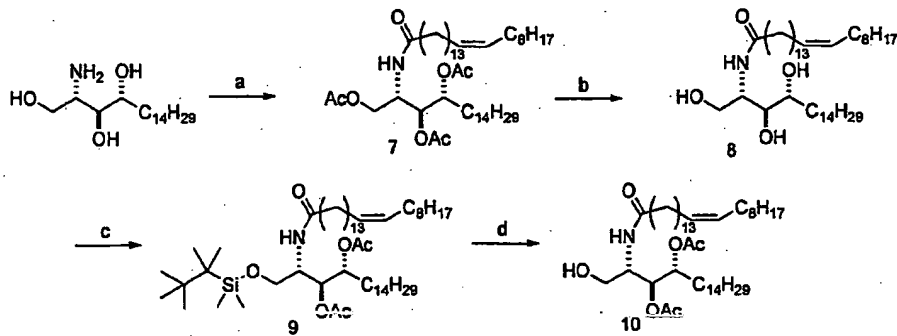
c) remover o complexo não ligado do meio; e

d) detectar o complexo.

A)



B)



C)

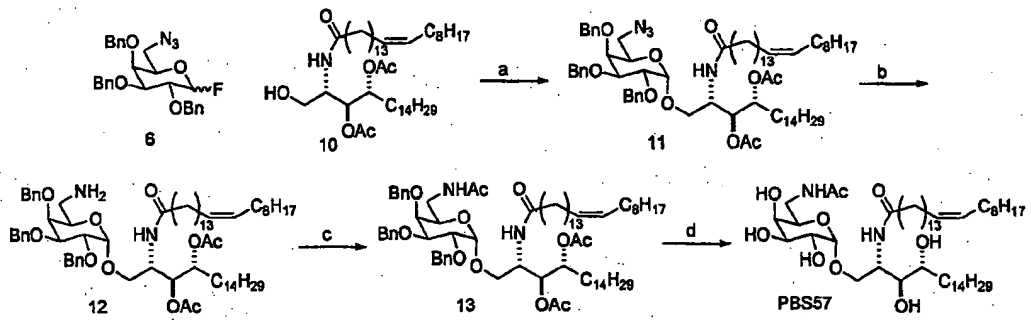
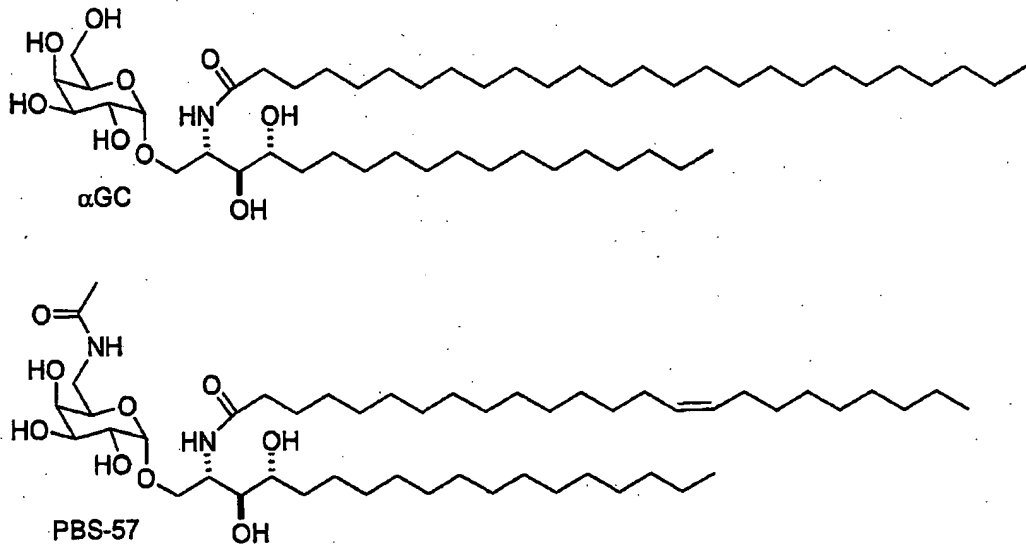
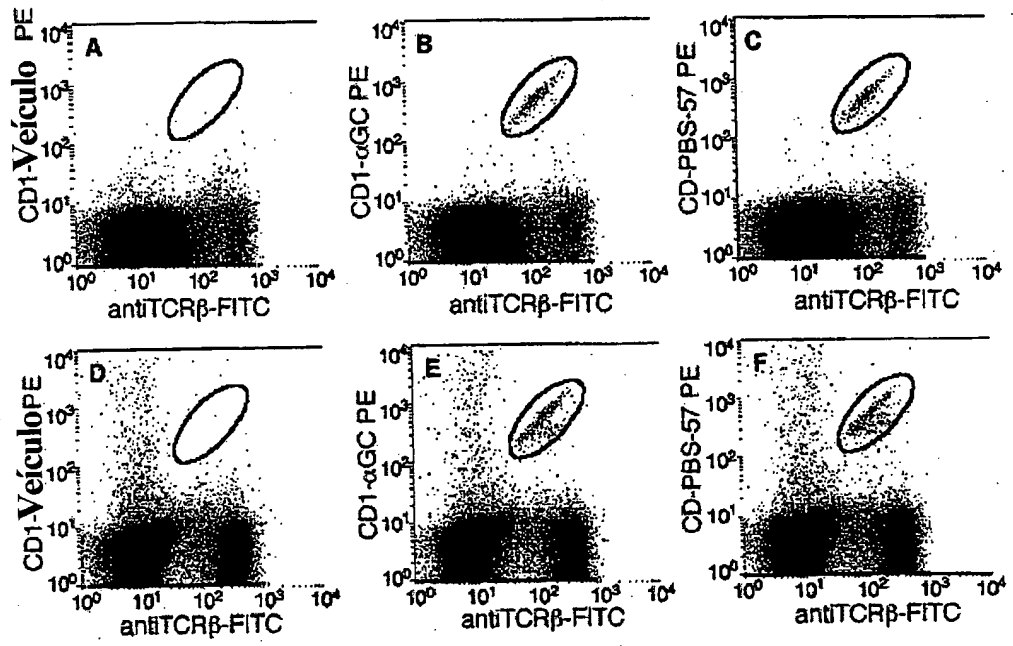


FIG. 1

**FIG. 2**

**FIG. 3**

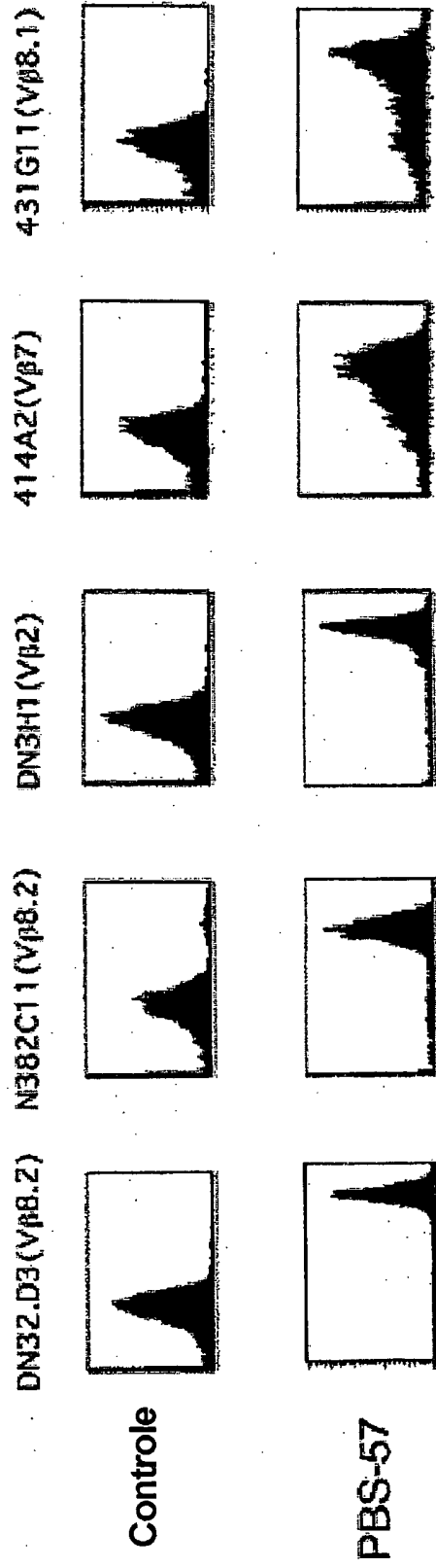


FIG. 4

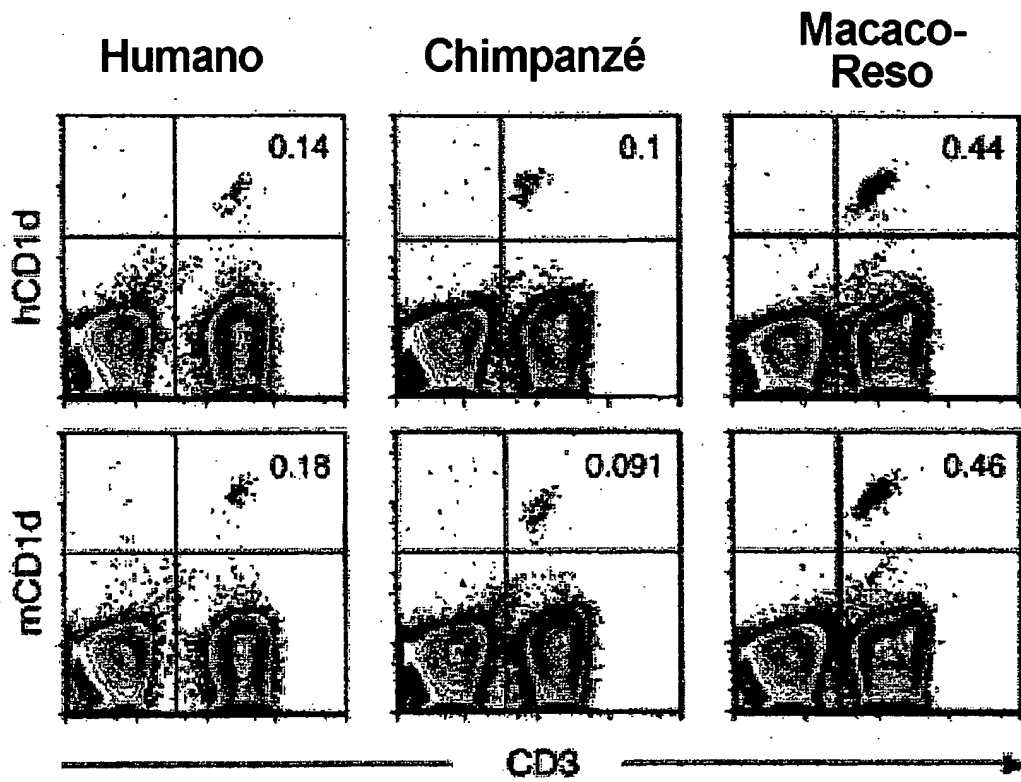
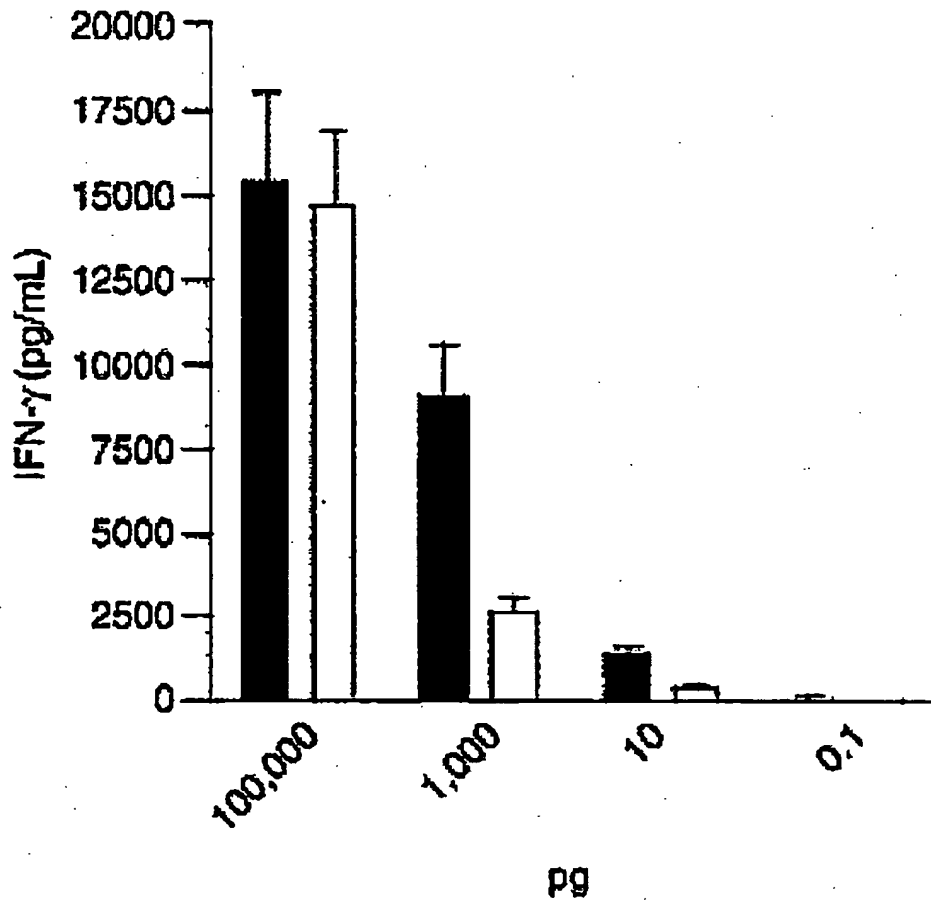


FIG. 5



FIG. 6

**FIG. 7**

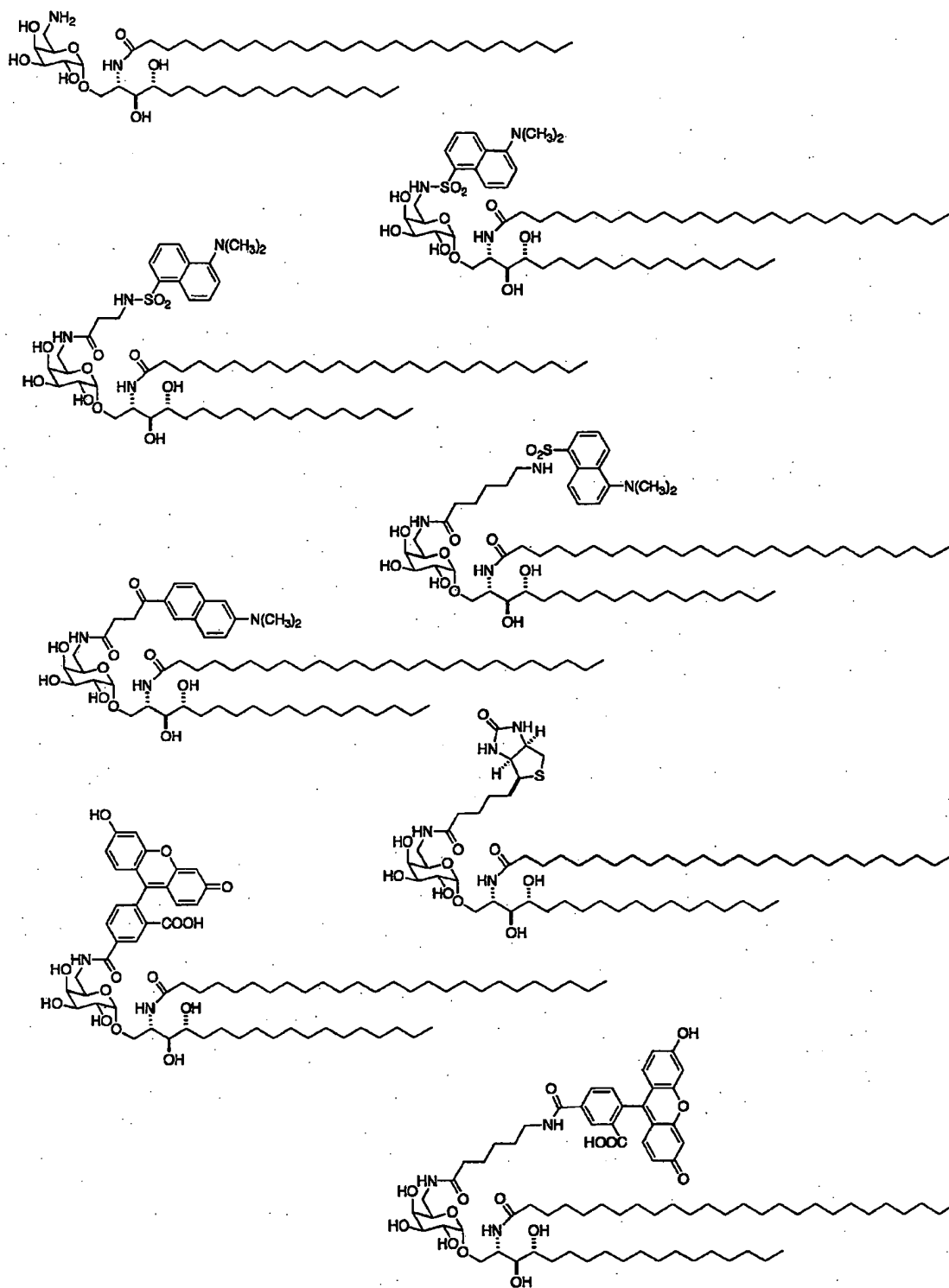


FIG. 8

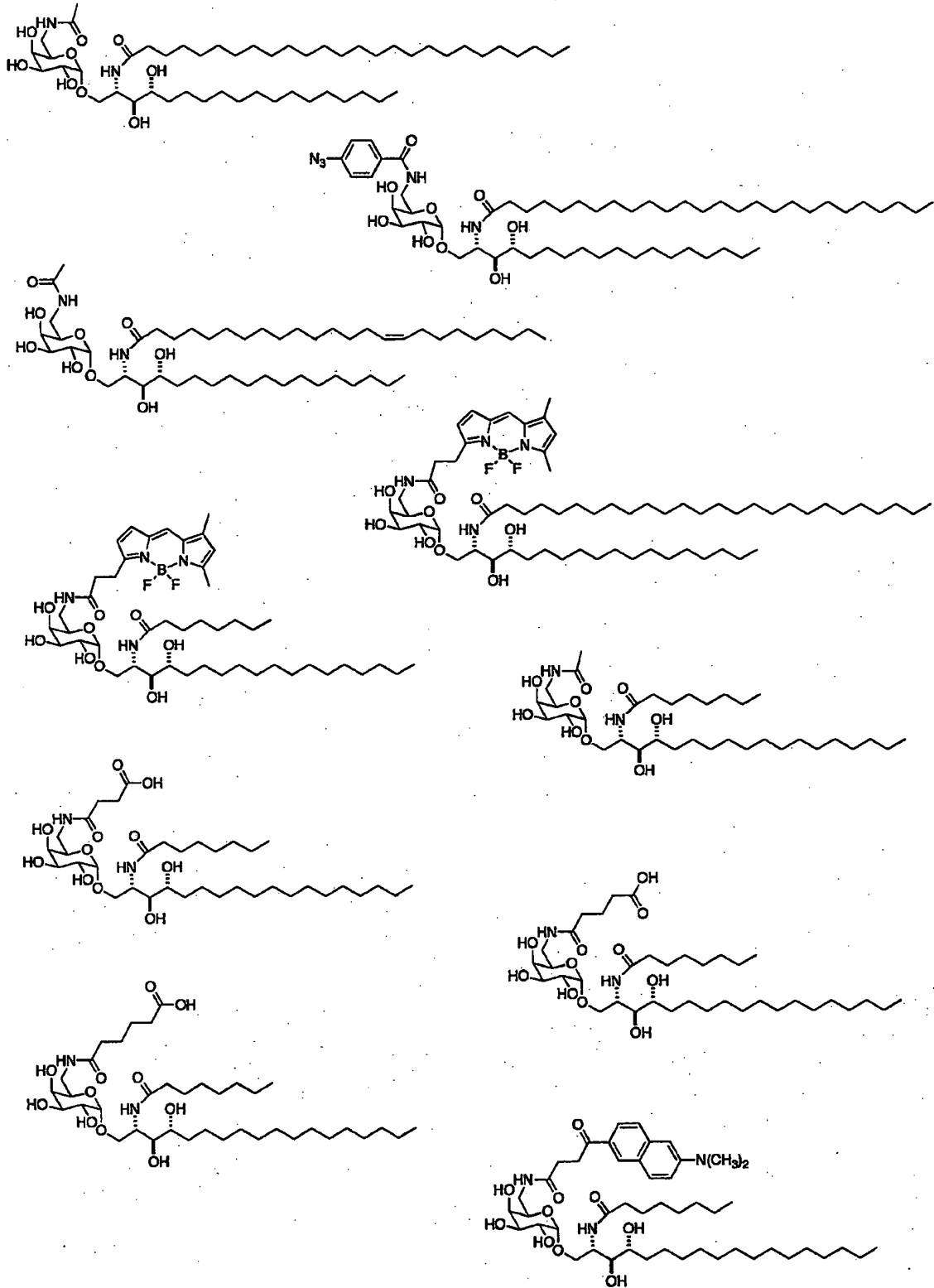
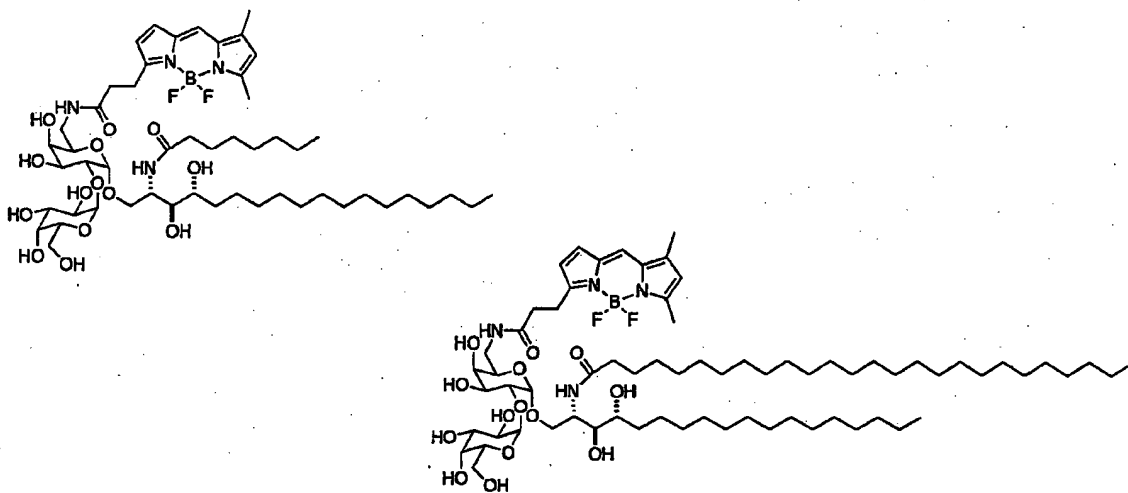


FIG. 8 (cont.)

**FIG. 8 (cont.)**

P1210668-8

RESUMO

" α -GALACTOSIL CERAMIDAS MODIFICADAS PARA MARCAR E ESTIMULAR CÉLULAS T MATADORAS NATURAIS"

5 Compostos de glicolípido modificados são fornecidos. Também divulgados são métodos para a ativação de uma célula NKT, métodos de estimular uma resposta imune em um paciente, e métodos adequados para marcar células NKT.