

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 738**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2011** **E 20155567 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024** **EP 3669892**

54 Título: **Composición para uso en un método inmunoestimulador**

30 Prioridad:

22.09.2010 AU 2010904284

20.06.2011 AU 2011902408

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
02.10.2024

73 Titular/es:

ENA RESPIRATORY PTY LTD (100.0%)

Suite 205, 1 York Street

Sydney, NSW 2000, AU

72 Inventor/es:

JACKSON, DAVID CHARLES;

TAN, AMABEL y

ZENG, WEIGUANG

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 980 738 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para uso en un método inmunoestimulador

Campo técnico

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

Antecedentes

- 10 La infección por el virus de la gripe A (IAV, por sus siglas en inglés) causa hasta mil millones de infecciones y entre 300.000 y 500.000 muertes anuales, y el brote mundial de la gripe porcina H1N1 en 2009 ha resaltado las limitadas opciones antivirales disponibles para hacer frente a una gripe pandémica. Aunque están disponibles vacunas contra las epidemias estacionales de IAV, estas vacunas inducen anticuerpos contra las proteínas superficiales neuraminidasa y hemaglutinina del IAV que están en constante evolución y, por lo tanto, requieren reformulación y administración anual. Además, estas vacunas generalmente no son efectivas contra los brotes pandémicos causados por virus de nueva aparición. Una alternativa es dirigirse a las regiones internas conservadas del IAV. Sin embargo, el reciente brote pandémico de un virus H1N1 de gripe A porcina ha llevado a la búsqueda de vacunas de protección amplia y opciones antivirales contra la gripe pandémica.

15 El documento WO 2004/014957 divulga composiciones que comprenden Pam2Cys unido a un epítipo de Th y un epítipo de CTL.

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

Compendio de la invención

- 25 La presente invención proporciona una composición que comprende un resto de TLR2 soluble para uso para tratar o prevenir una o más infecciones virales o bacterianas en el tracto respiratorio de un sujeto, en donde el resto de TLR2 comprende un agonista de TLR2 conjugado con un agente solubilizante, en donde el agonista de TLR2 es PEG, en donde el agonista de TLR2 comprende un resto lipídico seleccionado del grupo que consiste en palmitoilo, miristoilo, estearoilo, lauroilo, decanoilo y sus combinaciones, en donde la composición no induce una respuesta inmunitaria humoral o celular específica dirigida contra el agente que causa la infección mencionada anteriormente, y no comprende un antígeno que pueda provocar una respuesta inmunitaria contra el agente que causa la infección mencionada anteriormente, y en donde la composición es administrada al tracto respiratorio por vía intranasal u oral.

Breve descripción de las figuras

- 30 La Figura 1 muestra una representación esquemática de las vacunas lipopeptídicas candidatas. Representación esquemática de construcciones basadas en Pam2Cys. (A) Pam2Cys pegilado (Pam2Cys-PEG_n) consiste en una única molécula de Pam2Cys acoplada a undecaetilenglicol (polietilenglicol, PEG) a través de dos serinas. (B) Las vacunas lipopeptídicas candidatas basadas en Pam2Cys están compuestas de un epítipo de células T CD8⁺ diana y un epítipo de células T cooperadoras unidos a través de un único resto de lisina (K). El resto lipídico de Pam2Cys se une a través de dos restos de serina (Ser) para formar una estructura peptídica ramificada.

- 35 La Figura 2 muestra que la administración intranasal de lipopéptidos expande las poblaciones de células pulmonares. Se inocularon ratones C57BL/6 por vía intranasal con 25 nmoles del lipopéptido OT2-P2C-gB₄₉₈₋₅₀₅ o 25 nmoles del péptido OT2-gB₄₉₈₋₅₀₅ (que carece de Pam2Cys) y la caracterización de las poblaciones de células pulmonares se realizó en los momentos temporales indicados (n=3/grupo/momento temporal). (A) Se muestra el número total de células pulmonares. Los símbolos representan el conteo celular promedio y las barras de error indican el SEM, #=P<0,01 frente al día 0. (B) Se muestra la composición de las células pulmonares. Cada barra representa el recuento celular promedio (n=3) y las barras de error indican la SD, *=P<0,05 frente a la población de células en el día 0. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el análisis ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunnett. Un experimento repetido dio resultados similares.

- 40 La Figura 3 muestra que los lipopéptidos basados en Pam2Cys mejoran el aclaramiento del IAV. (A) Se inocularon ratones con solución salina, IAV-LP (que contenía un epítipo derivado del IAV) o sin IAV-LP y se expusieron el día 3 (panel superior) o el día 7 (panel inferior) después de la inoculación de lipopéptidos a 10^{4,5} ufp del virus de la gripe Mem71 (H3N1) (n=3-5/grupo). Los títulos virales en pulmón se evaluaron el día 5 de la infección y se muestran para ratones BALB/c (◇), C57BL/6 (□) y HHD (O). Los símbolos representan el título obtenido de un ratón individual y la línea indica el título medio de virus del grupo. (B) El porcentaje de aclaramiento viral en relación con la solución salina control se muestra encima de los grupos de lipopéptidos. Se detectaron respuestas de células T CD8⁺ específicas de IAV de ratones C57BL/6 expuestos a Mem71 el día 7 después de la inoculación de LP. El día 5 de la exposición se detectaron células T CD8⁺ específicas de PA₂₂₄₋₂₃₃ del bazo utilizando un ensayo de tinción intracelular para IFN-γ y TNF-α. Las barras indican la respuesta media específica de citoquinas en cada grupo y las barras de error indican la

SD. $^*P<0,05$, $^{**}P<0,01$ frente a solución salina (análisis ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunnett).

La Figura 4 muestra que los lipopéptidos basados en Pam2Cys reducen el impacto de una infección por IAV altamente patógena. Paneles superiores: gráfico de Kaplan-Meier que muestra la supervivencia de ratones C57BL/6 (a mano izquierda) y ratones HHD (a mano derecha) inoculados por vía intranasal con solución salina, IAV-LP o sin IAV-LP ($n=5$ /grupo) y expuestos 7 días después al virus H1N1 PR8. Paneles inferiores: Cambios en el peso corporal tras la infección. Los símbolos indican la media y las barras de error indican el SEM. Estos resultados se reflejaron en una repetición independiente del experimento en ambas cepas de ratón.

La Figura 5 muestra Pam2Cys en el entorno de las citoquinas pulmonares. Se administraron 20 nmoles de Pam2Cys-PEG₁₁ (P2C-PEG₁₁) o 50 μ L de solución salina (i.n.) a ratones C57BL/6 y la concentración de citoquinas en el lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés) se determinó el día 3 (D3) o 7 (D7) posterior a la administración utilizando una matriz citométrica de perlas BD™. Las barras representan la respuesta media de cada grupo ($n=3$) y las barras de error indican la SD, $^*P<0,05$; $^{**}P<0,01$; $^{***}P<0,001$ frente a los grupos de solución salina y sin tratamiento previo (ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple post-hoc de Tukey).

La Figura 6 muestra que Pam2Cys media el aclaramiento viral. Se inocularon ratones con solución salina o 20 nmoles de Pam2Cys-PEG₁₁ y se expusieron 1 (panel superior), 3 (panel central) o 7 (panel inferior) días después a $10^{4,5}$ ufp de virus Mem71 (H3N1) ($n=3-5$ /grupo). Los títulos virales se evaluaron el día 5 de la infección en ratones BALB/c ($\diamond$), C57BL/6 ($\square$) y HHD (O). Los símbolos representan el título obtenido de un ratón individual y la línea indica el título medio del virus del grupo, $^*P<0,05$ frente a la solución salina (prueba t de Student no pareada). El porcentaje de aclaramiento viral en relación con el grupo de solución salina se indica encima de la respuesta a Pam2Cys.

La Figura 7 muestra que la administración intranasal de Pam2Cys expande las subpoblaciones celulares en el pulmón. Se administraron 20 nmoles de Pam2Cys pegilado (P2C-PEG₁₁) o 50 μ L de solución salina (i.n.) a los ratones C57BL/6 y las poblaciones de células pulmonares se caracterizaron 72 horas después de la administración. Las barras representan la respuesta media de cada grupo ($n=3$) y las barras de error indican la SD, $^*P<0,05$ frente al grupo de solución salina (prueba t de Student no pareada).

La Figura 8 muestra que Pam2Cys protege contra la infección virulenta por IAV. Se inocularon ratones C57BL/6 por vía intranasal con solución salina o 20 nmoles de Pam2Cys pegilado (P2C-PEG_n) ($n=5$ /grupo) y se expusieron 7 días después a 200 ufp de virus H1N1 PR8. Un grupo de ratones recibió 20 nmoles de P2C-PEG₁₁ y se expuso 72 h después. Los cambios en el peso corporal después de la infección se muestran en porcentaje del peso original. Los símbolos indican la media y las barras de error indican el SEM. Estos resultados se reflejaron en una repetición independiente del experimento.

La Figura 9 muestra que la profilaxis con Pam2Cys reduce las cargas virales y la transmisión de la gripe por contacto. Se inocularon ratones BALB/c con solución salina (barras blancas) o 20 nmoles de Pam2Cys pegilado (P2C-PEG₁₁) (barras grises) y se expusieron 7 días, 5 días, 72 horas o 24 horas después a $10^{4,5}$ ufp de virus Udorn (H3N2) ($n=2$ /grupo). Estos ratones se designaron como los ratones propagadores. Veinticuatro horas después de la exposición, los ratones propagadores se alojaron conjuntamente con ratones receptores sin tratamiento previo. Después de 24 horas de alojamiento conjunto, se retiraron los ratones propagadores y se extrajeron los cornetes nasales, la tráquea y los pulmones y se determinaron los títulos virales (panel superior). Los órganos de los ratones receptores se recolectaron 3,5 días después de la exposición a los ratones propagadores y se evaluaron los títulos virales (panel inferior). Las flechas blancas o grises indican una transmisión exitosa mediada por contacto del grupo de tratamiento respectivo a los receptores alojados conjuntamente.

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

La Figura 11 muestra que varias variantes de Pam2Cys también confieren protección contra la exposición al IAV. A los ratones se les administró de forma profiláctica 20 nmoles de varias construcciones que contenían Pam2Cys vía intranasal y 3 días después se expusieron a una dosis letal de virus PR8. Después, los ratones se monitorizaron durante un período de 8 días después de la exposición a PR8 para determinar el peso corporal (A) y la supervivencia (B). La reducción del peso corporal observada en el grupo de solución salina fue estadísticamente significativa ($P<0,01$) en comparación con cada uno de los otros grupos de tratamiento.

La Figura 12 muestra que PEG-Pam2Cys es eficaz cuando se administra en una dosis repetida. Se administró a ratones Balb/c una dosis única de PEG-Pam2Cys, o dos dosis de PEG-Pam2Cys con tres semanas de diferencia y después se expusieron a PR8 tres días después de la segunda dosis. Después, los ratones se monitorizaron durante un período de 8 días después de la exposición para determinar el peso corporal y la supervivencia y se sacrificaron el día 7 después de la exposición a PR8 para evaluar la carga viral pulmonar. La reducción del peso corporal observada en el grupo de solución salina fue estadísticamente significativa ($P<0,01$) en comparación con cada uno de los otros

grupos de tratamiento (A). Las cargas virales en ratones tratados con PEG-Pam2Cys fueron sustancialmente más bajas que en ratones que recibieron solo solución salina (B).

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

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

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

La Figura 16 muestra que PEG-Pam2Cys es eficaz como agente antibacteriano. Ratones C57BL/6 se trataron previamente (i.n.) con 20 nmoles de PEG Pam2Cys y 3 días después se expusieron a 1×10^6 UFC de *L. pneumophila* (cepa JR32 Δ fla). Los ratones se monitorizaron diariamente después de la exposición intranasal a *L. pneumophila* y la carga bacteriana en los pulmones de los ratones se evaluó 1, 2 y 3 días después de la exposición (A). Cada símbolo representa la carga bacteriana media obtenida en cada momento temporal y las barras de error representan la desviación estándar (SD). La significación estadística se denota mediante * ($p < 0,05$) que se obtuvo mediante la prueba t de Student que compara los grupos de tratamiento con solución salina y PEG-Pam2Cys. El porcentaje medio de reducción bacteriana en relación con el grupo de solución salina se muestra sobre cada símbolo. Para demostrar la ventana de protección de PEG-Pam2Cys, los ratones se trataron previamente con PEG-Pam2Cys 3 días (B) o 7 días (C) antes de la exposición con *L. pneumophila*. La carga bacteriana en el día 3 después de la infección se muestra en las Figuras B y C.

Descripción detallada

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

Cabe señalar que, tal como se utilizan en la memoria descriptiva del tema, las formas singulares "un", "una" y "el(la)" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un agente" incluye un único agente, así como dos o más agentes; la referencia a "la composición" incluye una única composición, así como dos o más composiciones; etcétera.

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

Un agonista de TLR2 es un agente que se une al receptor 2 tipo Toll. El agonista de TLR2 se puede unir a TLR2 como homodímero o heterodímero.

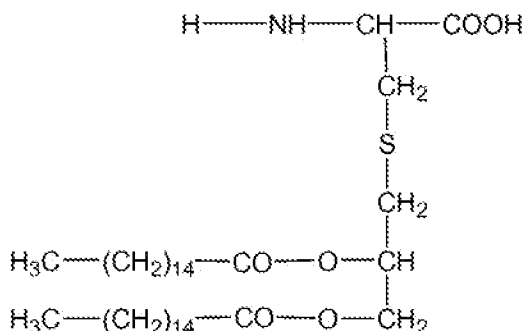
La presente invención se basa en la observación de que un agonista de TLR2, tal como S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína (Pam2Cys) demuestra la capacidad de generar una respuesta inmunitaria innata en un sujeto y, en particular, provocar un efecto profiláctico y terapéutico contra un agente infeccioso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

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición que comprende un resto de TLR2 soluble para uso para tratar o prevenir una o más infecciones virales o bacterianas en el tracto respiratorio de un sujeto, en donde el resto de TLR2 comprende un agonista de TLR2 conjugado con un agente solubilizante, en donde el agente es PEG, en donde el agonista de TLR2 comprende un resto lipídico seleccionado del grupo que consiste en palmitoilo, miristoilo, estearoilo, lauroilo, decanoilo y combinaciones de los mismos, en donde la composición no induce una respuesta inmunitaria humoral o celular específica dirigida contra el agente infeccioso que causa la infección mencionada anteriormente, y no comprende un antígeno que pueda provocar una respuesta inmunitaria contra el agente que causa la infección mencionada anteriormente, y en donde la composición se administra al tracto respiratorio por vía intranasal u oral.

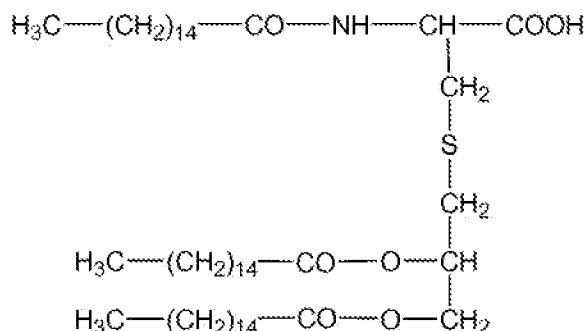
El agonista de TLR2 es un lipopéptido o comprende un resto lipídico como se define en las reivindicaciones.

Un lipopéptido ilustrativo de acuerdo con esta realización de la presente invención es el lipopéptido "Pam2Cys". Un experto en la técnica entendería que el término "lipopéptido" significa cualquier composición de materia que comprende uno o más restos lipídicos y una o más secuencias de aminoácidos que están conjugadas. "Pam2Cys" (también conocido como dipalmitoil-S-gliceril-cisteína o S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína ha sido sintetizado y corresponde al resto lipídico de MALP-2, un lipopéptido activador de macrófagos aislado de *Mycoplasma fermentans*. Pam2Cys es conocido por ser un ligando de TLR2.

Pam2Cys tiene la estructura:



Otro lipopéptido ilustrativo es el lipoaminoácido N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína, también conocido como Pam3Cys o Pam3Cys-OH, que es una versión sintética del resto N-terminal de la lipoproteína de Braun que abarca las membranas internas y externas de las bacterias gramnegativas. Pam3Cys tiene la siguiente estructura:



La patente de Estados Unidos No. 5,700,910 describe varias N-acil-S-(2-hidroxialquil)cisteínas para uso como compuestos intermedios en la preparación de lipopéptidos que se utilizan como adyuvantes sintéticos, estimulantes de linfocitos B, estimulantes de macrófagos o vacunas sintéticas. La patente de EE.UU. 5,700,910 también enseña el uso de tales compuestos como compuestos intermedios en la síntesis de Pam3Cys-OH y de lipopéptidos que comprenden este lipoaminoácido o un análogo del mismo en el extremo N-terminal.

Los restos lipídicos que se utilizan para atacar los TLR de la superficie celular incluyen palmitoil, miristoilo, estearoil, lauroilo, octanoilo o decanoilo.

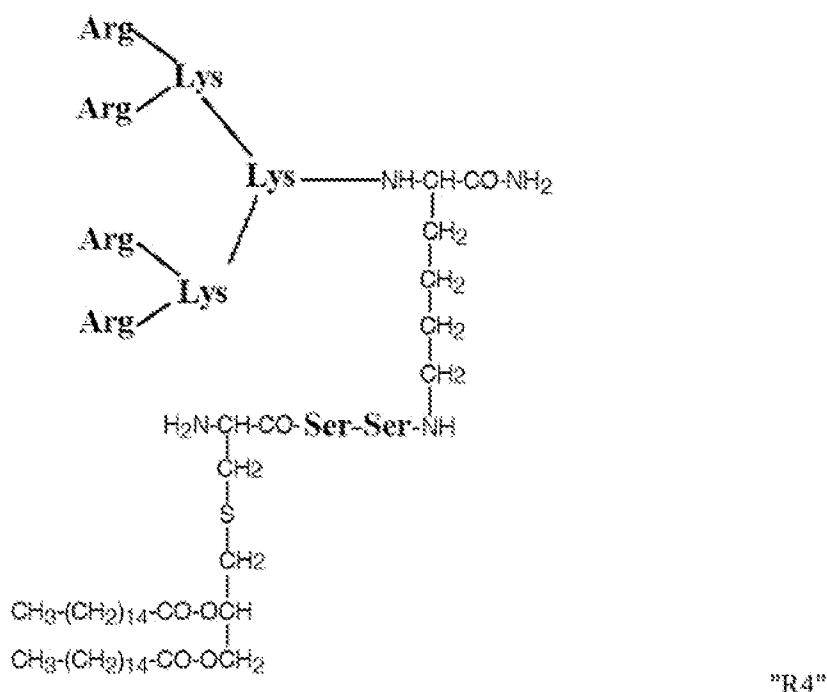
Además de Pam2Cys y Pam3Cys, la presente invención también contempla el uso de Set2Cys, Lau2Cys y Oct2Cys según la presente invención. Los expertos en la técnica serán conscientes de que Ste2Cys también se conoce como S-[2,3-bis(estearoiloxi)propil]cisteína o diestearoil-S-gliceril-cisteína; que Lau2Cys también se conoce como S-[2,3-bis(lauroiloxi)propil]cisteína o dilauoil-S-gliceril-cisteína; y que Oct2Cys también se conoce como S-[2,3-bis(octanoiloxi)propil]cisteína o dioctanoil-S-gliceril-cisteína.

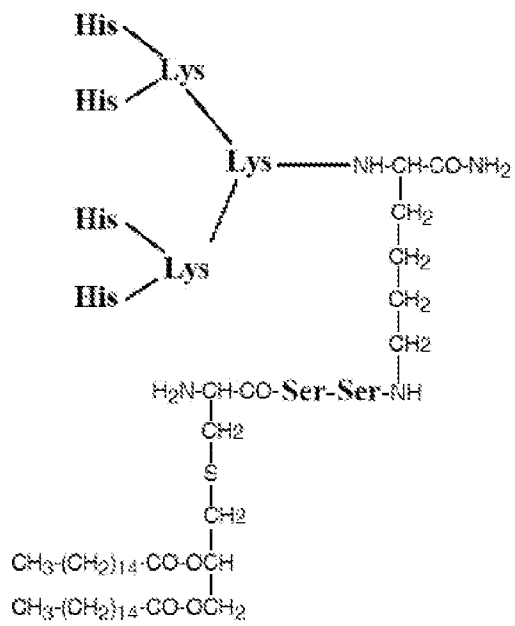
Otros agonistas de TLR2 adecuados incluyen, pero no se limitan a, lipopéptidos triacilados y diacilados sintéticos, FSL-1 (una lipoproteína sintética derivada de *Mycoplasma salivarium* 1), Pam3Cys (tripalmitoil-S-gliceril cisteína) y S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteína, donde "Pam3" es "tripalmitoil-S-glicerilo". Los derivados de Pam3Cys también son agonistas de TLR2 adecuados, donde los derivados incluyen, pero no se limitan a, S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-R,S)-propil]-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(Lys)4-hidroxitrihidrocloruro; Pam3Cys-Ser-Ser-Asn-Ala; Pam3Cys-Ser-(Lys)4; Pam3Cys-Ala-Gly; Pam3Cys-Ser-Gly; Pam3Cys-Ser; Pam3Cys-OMe; Pam3Cys-OH; PamCAG, palmitoil-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-Ala-Gly-OH; y similares. Otros ejemplos no limitantes de agonistas de TLR2 adecuados son Pam2CSK4, Pam2CSK4 (dipalmitoil-S-gliceril cisteína-serina-(lisina)4; o Pam2Cys-Ser-(Lys)4) es un lipopéptido diacilado sintético. Otros agonistas sintéticos de TLR incluyen los descritos, por ejemplo, en Kellner et

al. (1992, Biol. Chem. 373:1:51-5); Seifer et al. (1990, Biochem. J, 26:795-802) y Lee et al. (2003, J. Lipid Res., 44:479-486).

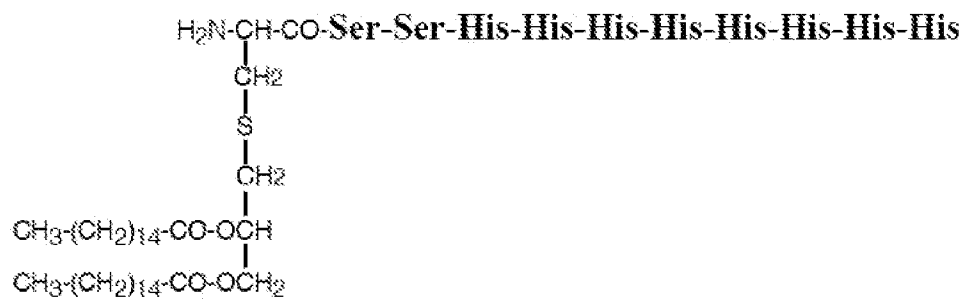
5 Como entenderán los expertos en la técnica, los agonistas de TLR2 son típicamente no polares y, por consiguiente, aunque son solubles en disolventes no polares, son solo solubles con moderación en disolventes polares y acuosos. Según la invención, el resto de TLR2 comprende un agonista de TLR2 conjugado con un agente solubilizante que es PEG.

10 Un agente solubilizante puede incluir uno o más de un agente solubilizante que puede conjugarse con un agonista de TLR2 para mejorar la solubilidad del resto de TLR2. El agente solubilizante será generalmente un resto polar que aumenta la solubilidad del resto de TLR2 en disolventes polares o acuosos. En aún otra realización de la presente invención, el agente solubilizante incluye, además de PEG, uno o más del grupo que consiste en polipéptidos polares tales como "R4", un complejo de tetra arginina hiperramificado; "H4", un complejo de tetra histidina hiperramificado; "H8", un péptido lineal que contiene restos de histidina; y "E8", un péptido lineal que contiene restos de glutamato. También se prevén otros agentes solubilizantes tipo lípidos lineales y ramificados, incluido un péptido hiperramificado
15 que contiene residuos de glutamato (véase, p. ej., "E8 ramificado", más adelante). En una realización adicional más de la presente invención, el agente solubilizante incluye PEG y uno o más del grupo que consiste en R4, H4, H8 y E8 (lineal o ramificado). R4, H4, H8 y E8 se han descrito anteriormente en el documento PCT/AU2009/000469 (WO/2010/115230) y tienen las siguientes estructuras:

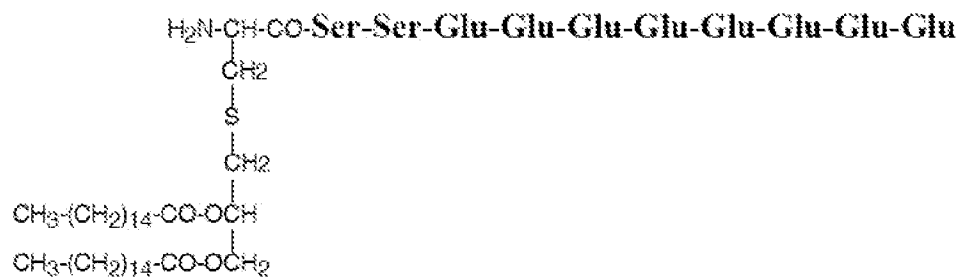




"H4"



"H8"



"E8"



5

10

En una forma particularmente preferida según la presente invención, el resto de TLR2 comprende un conjugado que comprende Pam2Cys conjugado con PEG.

15

20

25

35

o más antígenos peptídicos que serán irrelevantes para la enfermedad a prevenir o tratar o el resto de TLR2 se puede utilizar en ausencia de uno o más antígenos peptídicos.

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

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

En algunas realizaciones, el agente infeccioso es la causa de una infección secundaria en el sujeto (p. ej., neumonía). Por lo tanto, la presente invención también proporciona una composición para uso en el tratamiento o prevención de una infección secundaria en un sujeto generando una respuesta inmunitaria innata, uso que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende un resto de TLR2 en solución, en donde la infección secundaria no se trata o previene mediante una respuesta inmunitaria humoral o celular dirigida contra el resto de TLR2 soluble.

Los presentes inventores también han demostrado que, cuando se administra de forma profiláctica, una composición que comprende un resto de TLR2 según la presente invención es capaz de proporcionar protección inmediata contra una infección leve y patógena por un agente infeccioso tal como Gripe A y que esta protección está asociada con la afluencia de mediadores inmunes innatos en el pulmón. Esta actividad antiviral no es específica de un antígeno.

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

La composición según la presente invención se debe administrar en una cantidad eficaz. Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" de un resto de TLR2, como se utiliza en la presente memoria, significan una cantidad suficiente para proporcionar en el proceso el efecto terapéutico o fisiológico deseado en al menos un número estadísticamente significativo de sujetos. Los efectos indeseables, p. ej., los efectos secundarios, a veces se manifiestan junto con el efecto terapéutico deseado; por lo tanto, un profesional equilibra los beneficios potenciales frente a los riesgos potenciales al determinar cuál es una "cantidad eficaz" apropiada. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, según la especie, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración y similares. Por lo tanto, puede que no sea posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una "cantidad eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en la técnica utilizando solo la experimentación rutinaria. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz para un sujeto humano se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 nmoles/kg de peso corporal/dosis a 1 mol/kg de peso corporal/dosis. En algunas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 1 nmol a 1 mol, de aproximadamente 1 μ mol a 1 mol, de 1 μ mol a 500 μ moles, de 1 μ mol a 250 μ moles, de 1 μ mol a 50 μ moles, o de 1 nmol a 1 μ mol/kg de peso corporal/dosis. En algunas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 0,08 μ moles a 0,11 μ moles/kg de peso corporal/dosis del resto TLR2. Los regímenes de dosificación se ajustan para adaptarse a las exigencias de la situación y se pueden ajustar para producir la dosis terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden proporcionar varias dosis diarias, semanales, mensuales u otros intervalos de tiempo apropiados.

Los términos "tratamiento" o "que trata" incluyen pero no se limitan a, (i) ralentizar o detener la progresión de la enfermedad, (ii) revertir parcialmente la progresión de la enfermedad y (iii) revertir completamente la progresión de la enfermedad (es decir, curar la enfermedad). Los términos "prevenir" o "que previene" no se deben interpretar como que se limitan a la prevención completa de la enfermedad (es decir, provocar que la enfermedad no se desarrolle),

sino que pueden incluir minimizar la progresión de la enfermedad, por ejemplo, cuando la enfermedad ocurre con menos intensidad o progresa a un ritmo más lento en un sujeto como resultado de la administración profiláctica de la composición según la presente invención.

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

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

- 15 Por consiguiente, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un resto de TLR2 en solución junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para tratar o prevenir una enfermedad generando una respuesta inmune innata en un sujeto, en donde el resto de TLR2 comprende un agonista de TLR2 y en donde la enfermedad no se trata ni previene mediante una respuesta inmune humoral o celular dirigida contra el resto de TLR2.

Las composiciones de la presente invención se administran al tracto respiratorio intranasal u oralmente.

Ejemplos

Materiales y métodos

- 30 Síntesis, purificación y autenticación de péptidos y lipopéptidos. La síntesis de lipopéptidos y péptidos se llevó a cabo mediante síntesis en fase sólida convencional utilizando la química de Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo). Los péptidos se ensamblaron automáticamente utilizando un sintetizador Symphony Multiplex (Protein Technologies Inc, Arizona, EE.UU.) o un sintetizador Liberty (CEM, Carolina del Norte, EE.UU.) que utiliza tecnología de microondas para facilitar la producción de secuencias peptídicas de alta fidelidad. Los péptidos y lipopéptidos se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa y la autenticidad de los productos se determinó mediante espectrometría de masas. Los procedimientos utilizados para el ensamblaje, purificación y caracterización de péptidos se han descrito en detalle en otra parte (1, 2, 3). Se preparó una forma soluble de Pam2Cys mediante la adición de O-(N-Fmoc-2-aminometil)-O'-(2-carboxietil)-undecaetilenglicol (Fmoc-PEG₁₁-OH, Merck Ltd) a Pam2Cys. Esto dio lugar a la formación de una forma pegilada del lípido, Pam2Cys-PEG₁₁. Los epítomos incluidos en las construcciones de lipopéptidos y las composiciones de lipopéptidos individuales se muestran en la Tabla 1.

- 40 Animales. Se utilizaron ratones macho y hembra C57BL/6, BALB/c, B6.IFN- γ ^{-/-}, B6.IFNAR^{-/-} y HHD de 6-8 semanas de edad. Los ratones knockout HHD expresan una monocadena quimérica de los dominios α 1- α 2 de HLA-A2.1 y α 3 y los dominios citoplásmicos y transmembrana de H-2D^b. Estos ratones se construyeron en un ratón doble knockout H-2D^b^{-/-} β 2m^{-/-}, que no expresaba moléculas H-2D^b murinas detectables serológicamente (4, 5). Los ratones HHD se desarrollaron en el Institut Pasteur, París, y fueron amablemente suministrados por el Queensland Institute for Medical Research. Los ratones fueron criados y mantenidos en las instalaciones para el alojamiento de animales del departamento de microbiología. Los ratones B6.IFN- γ ^{-/-} son deficientes en interferón- γ y los ratones B6.IFNAR^{-/-} no poseen el receptor de interferón tipo 1. El Dr. Shizuo Akira, de la Universidad de Osaka, proporcionó amablemente ratones deficientes en TLR2. Todos los procedimientos con ratones fueron aprobados por el Comité de Ética de experimentación animal de la Universidad de Melbourne.

- 50 Procedimiento de inoculación. Los ratones se anestesiaron mediante inhalación de PenthraneTM o isoflurano y se inocularon por vía intranasal con 25 nmoles de lipopéptido, 25 nmoles del péptido no lipidado o 2-20 nmoles de construcciones que contenían Pam2Cys. Las construcciones que contenían Pam2Cys y los lipopéptidos y péptidos se disolvieron en solución salina y se administraron en un volumen de 50 μ L, mientras que los grupos control de solución salina recibieron 50 μ L de solución salina solamente.

- 55 Exposición al virus de la gripe A. El día 1, 3 ó 7 después de la inoculación de lipopéptidos los ratones se expusieron por vía intranasal a IAV vivos. Para una infección leve por IAV, a los ratones se les administró 10^{4.5} UFP del virus H3N1, Mem71, un reagrupador genético de A/Memphis/1/71 [H3N2] x A/Bellamy/42 [H1N1]. En el día 5 de la exposición, se recolectaron los pulmones para determinar los títulos virales y se recolectaron los bazo para caracterizar las respuestas de las células T CD8⁺. La exposición a IAV altamente patógeno se llevó a cabo utilizando

50 UFP (ratones HHD), 200 UFP (ratones C57BL/6) o 500 UFP (ratones BALB/c) del virus A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (PR8) vía intranasal. Este virus altamente patógeno induce una infección sintomática caracterizada por pérdida de peso y deshidratación. Los ratones se monitorizaron diariamente para detectar signos de morbilidad y se sacrificaron cuando fue necesario en un punto final humanitario que se determinó utilizando una combinación de síntomas clínicos y el grado de pérdida de peso aprobado por el Comité de Ética de experimentación animal de la Universidad de Melbourne.

Exposición a la bacteria *Legionella pneumophila*. Ratones C57BL/6 se trataron previamente por vía intranasal con 20 nmoles de PEG-Pam2Cys 3 días antes de la exposición intranasal con 1×10^6 UFC de *L. pneumophila* (cepa JR32 Δ fla). La carga bacteriana en los pulmones de los ratones se evaluó 1, 2 y 3 días después de la infección.

Estudio de transmisión por contacto. Para evaluar la transmisión viral en ratones BALB/c, los ratones "donantes" (n=2) recibieron $10^{4.5}$ ufp de los virus H3N2 Udorn (A/Udorn/72) en 50 μ L de solución salina por vía intranasal. Un día después de la exposición, los ratones donantes se alojaron conjuntamente con ratones "receptores" (n=3) sin tratamiento previo durante 24 horas, después de lo cual se recolectaron los ratones donantes y se extrajeron los cornetes, la tráquea y los pulmones y se evaluaron para determinar los títulos virales. Tres días y medio después de la exposición a ratones donantes, se recolectaron los cornetes nasales, la tráquea y los pulmones de los ratones receptores para evaluar los títulos virales. Este protocolo se basa en un modelo de transmisión por contacto desarrollado por Edenborough et al. (en preparación).

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

Preparación de suspensiones unicelulares a partir de órganos. Después de la asfixia con CO₂, los pulmones de los ratones se perfundieron con 10 mL de PBS a través del ventrículo derecho del corazón para eliminar las células circulantes. Los pulmones se cortaron en trozos y se sometieron a digestión enzimática con colagenasa A (2 mg/mL, Roche, Mannheim, Alemania) en RPMI durante 30 minutos. Los fragmentos de pulmón digeridos se colaron a través de un tamiz y se trataron con 3 mL de solución de cloruro de amonio Tris-tamponada precalentada (ATC) durante 2 minutos a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos. Después, las células pulmonares se lavaron dos veces en RP10 (medio RPMI 1640 [Gibco, EE.UU.] complementado con FCS al 10% [CSL, Parkville, Australia] 7,5 mM HEPES, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 76 μ M, 150 U/mL de penicilina, 150 μ g/mL de estreptomina y 150 μ M de aminoácidos no esenciales [Gibco]). Los bazo se recogieron en 10 mL de RP10 y se prepararon suspensiones de células individuales mediante ruptura a través de un tamiz y después se trataron con ATC durante 5 minutos a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con RP10 antes del uso. Para obtener el fluido de lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés), las tráqueas de ratón se canularon con una jeringa y el espacio de aire se lavó con tres lavados de 1 mL de RPMI por separado y un enjuague final de 1 mL de la jeringa. El sobrenadante de los lavados de BAL se almacenó a una temperatura de -70 °C para posterior análisis de citoquinas. El sobrenadante de los lavados de BAL se almacenó a -70 °C para posterior análisis de citoquinas. Las células viables se contaron con un hemocitómetro y la exclusión del colorante azul de tripano.

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

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

Ensayo de tinción intracelular de citoquinas (ICS, por sus siglas en inglés). Se estimularon suspensiones celulares únicas de células de pulmón o bazo con péptido a razón de 1 μ g/mL (C57BL/6 y BALB/c) o 10 μ g/mL (HHD) durante 6 horas a 37 °C en presencia de 5 μ g/mL de GolgiPulG (BD Biosciences Pharmingen) 25 U/mL e IL-2 recombinante de ser humano (Roche, Indianápolis, EE.UU.) en un volumen total de 200 μ L RP10. Las células se tiñeron con PerCP (Cy5,5) marcado con anticuerpo CD8 α anti-ratón de rata (BD Biosciences Pharmingen) durante 30 minutos en hielo. Las células se fijaron y se permeabilizaron utilizando el kit BD Cytofix/Cytoperm TM (BD) según las instrucciones del fabricante y se tiñeron con anti-IFN- γ marcado con FITC y anti-TNF- α marcado con APC (BD Biosciences Pharmingen) durante 30 min a 4 °C. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur y se analizaron con el software FlowJo.

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

Resultados

La inoculación de lipopéptidos basada en Pam2Cys expande las poblaciones de células pulmonares. El efecto del lipopéptido basado en Pam2Cys en el entorno celular pulmonar se examinó en ratones C57BL/6 que se inocularon por vía intranasal con el lipopéptido OT2-P2C-gB₄₉₈₋₅₀₅ que contenía el epítipo OT2 de linfocitos T cooperadores (Th) y un epítipo (gB₄₉₈₋₅₀₅; véase la Tabla 1) de células T CD8⁺ derivado del virus del herpes simple 1. Las poblaciones de células residentes pulmonares en los pulmones perfundidos con PBS se caracterizaron mediante citometría de flujo celular.

La inoculación intranasal con OT2-P2C-gB₄₉₈₋₅₀₅ provocó un aumento dramático en el número total de células pulmonares que alcanzaron un máximo el día 3 y se mantuvieron elevadas hasta el día 8 (Fig. 2A). En contraste, los ratones que recibieron el péptido OT2-gB₄₉₈₋₅₀₅ (que carece de Pam2Cys) no mostraron cambios significativos en el número total de células o en la proporción de tipos de células presentes en los pulmones, apuntando hacia Pam2Cys como el mediador de la afluencia celular (Fig. 2A). En ratones inoculados con lipopéptidos, el infiltrado celular el día 3 después de la inoculación estaba compuesto en gran parte por neutrófilos y macrófagos intersticiales (Fig. 2B). El examen microscópico mediante tinción de Giemsa reveló que los neutrófilos exhibían un fenotipo altamente vacuolar indicando activación, mientras se encontró que la población de macrófagos intersticiales/monocitos F480⁺ estaba compuesta predominantemente por macrófagos intersticiales con una morfología grande y nucleada con pocas células que poseían el núcleo en forma de donut o de riñón característico de los monocitos (datos no mostrados). Aunque los macrófagos alveolares (AM, por sus siglas en inglés) estaban presentes en niveles muy bajos en el pulmón en estado estacionario (día 0), fue evidente un aumento significativo en esta población después de la inoculación de lipopéptidos. Finalmente, también se observaron aumentos en los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y en las células de tipo dendrítico CD11c^{hi} entre los días 3-8 posteriores a la inoculación. Un examen de la afluencia de células pulmonares de ratones BALB/c y HHD reveló patrones similares de infiltración temprana de neutrófilos seguida de expansión de las poblaciones de macrófagos intersticiales y macrófagos alveolares CD11b^{hi} (datos no mostrados).

La administración de Pam2Cys pegilado expande las poblaciones de células pulmonares. La administración intranasal de Pam2Cys pegilado (P2C-PEG₁₁) también dio lugar a aumentos significativos en las poblaciones totales de neutrófilos, macrófagos intersticiales y alveolares y linfocitos de pulmón (que incluye el intersticio de pulmón y el fluido que contiene BAL) en ratones C57BL/6 (Figura 7) y BALB/c (datos no mostrados). También se observaron niveles aumentados de células NK activadas productoras de IFN- γ y células $\alpha\delta$ T (Figura 7).

La profilaxis con Pam2Cys es eficaz contra la exposición a un IAV altamente patógeno. Para determinar si la actividad antivírica de Pam2Cys es eficaz contra una cepa virulenta de IAV, los ratones que recibieron Pam2Cys pegilado (P2C-PEG₁₁) fueron expuestos 72 horas o 7 días después a una dosis letal del virus H1N1 PR8. Los ratones tratados con solución salina (expuestos 72 horas después) experimentaron una pérdida de peso sustancial, desarrollaron síntomas clínicos de infección y el día 8 todos los ratones habían sucumbido a la infección (Figura 8). En contraste, los ratones tratados previamente con PEG-Pam2Cys experimentaron una pérdida de peso sustancialmente menor y todos los ratones sobrevivieron a la infección (Figura 8).

La profilaxis con Pam2Cys puede reducir las tasas de transmisión. Para determinar si los ratones infectados con el virus de la gripe, tratados previamente con Pam2Cys, tienen una menor capacidad para transmitir el virus, se utilizó un modelo de ratón de transmisión por contacto (Edenborough et al., en preparación). Los ratones "donantes" que fueron tratados previamente con PEG-Pam2Cys se expusieron en varios intervalos de tiempo posteriores a $10^{4,5}$ ufp de virus Udm H3N2. Los resultados muestran que la profilaxis con Pam2Cys reduce los títulos virales nasales, traqueales y pulmonares (Figura 9). Todos los ratones receptores que fueron alojados conjuntamente con ratones donantes tratados con solución salina se infectaron, lo que confirma la capacidad de los ratones donantes para transmitir el virus. Aunque los ratones que habían recibido Pam2Cys 5 ó 7 días antes de la exposición transmitieron el virus a los ratones receptores, los ratones que habían recibido Pam2Cys 24 horas o 72 horas antes de la exposición al virus no transmitieron la infección a los ratones receptores alojados conjuntamente.

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

del IAV (T CD8⁺ o CD4⁺) en el sin IAV-LP significa que las respuestas específicas al IAV no serán inducidas en la inoculación.

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

La ausencia de epítomos específicos de IAV (T CD8⁺ o CD4⁺) en el sin IAV-LP sugirió que la actividad antivírica de los sin IAV-LP es conferida por el resto Pam2Cys. Para confirmar esta teoría, se examinó la presencia de respuestas de células T CD8⁺ específicas de IAV a PA₂₂₄₋₂₃₃, una diana específica de IAV inmunodominante en ratones C57BL/6, y el mismo epítipo incluido en el IAV-LP pero no en el sin IAV-LP. En ratones C57BL/6 inoculados con lipopéptidos, solo los ratones que recibieron IAV-LP mostraron niveles significativos de células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ o IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ específicas de PA₂₂₄₋₂₃₃, mientras que ni los grupos de solución salina ni de sin IAV-LP provocaron respuestas detectables a estos epítomos (Fig. 3B). Este mismo patrón de respuestas de células T CD8⁺ se observó en las cepas de ratones BALB/c y HHD. La ausencia de células específicas de IAV en ratones inoculados con sin IAV-LP demuestra que el efecto antiviral temprano observado se debe a la acción de Pam2Cys y no a una capacidad acelerada para aumentar una respuesta inmunitaria adaptativa específica de IAV.

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

La profilaxis con lipopéptidos es eficaz contra la exposición a un IAV altamente patógeno. Para determinar si la actividad antivírica de Pam2Cys fue eficaz contra la infección altamente patógena, los ratones inoculados con lipopéptidos se expusieron 7 días después al virus H1N1 altamente patógeno, PR8. La inoculación de lipopéptidos IAV-LP y sin IAV-LP aumentó drásticamente la tasa de supervivencia en ratones expuestos a PR8 (Fig. 4). Mientras que la mayoría de los ratones inoculados con solución salina sucumbieron a la infección, el 100% de los animales inoculados con IAV-LP y el 80% de los animales inoculados sin IAV-LP sobrevivieron a la infección. Además de mejorar las tasas de supervivencia, el grado de pérdida de peso y la sintomatología clínica que normalmente se asocia con la infección también se redujo en el grupo sin IAV-LP (Fig. 4).

El espectro de citoquinas inducidas por Pam2Cys soluble. Para eliminar la influencia del péptido, o respuestas específicas a epítomos del sistema, los presentes inventores construyeron una forma soluble de Pam2Cys conjugando el Pam2Cys, normalmente insoluble, con polietilenglicol (PEG). Para identificar el impacto de Pam2Cys-PEG₁₁ en el entorno pulmonar, se midió la concentración de citoquinas asociadas a la inflamación en el fluido de lavado broncoalveolar (BAL) de ratones C57BL/6 a los que se administró 20 nmoles de Pam2Cys-PEG₁₁ (i.n.) por análisis citométrico con matriz de perlas (Fig. 5). El día 3 después de la administración se detectaron aumentos significativos de las concentraciones de IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70 en ratones inoculados con Pam2Cys-PEG₁₁ en comparación con ratones inoculados con solución salina o sin tratamiento previo. Para el día 7, las concentraciones de citoquinas en el grupo de Pam2Cys-PEG₁₁ se normalizaron a los niveles de administración previa y no difirieron significativamente con respecto al grupo sin tratamiento previo (Fig. 5).

La actividad antivírica de Pam2Cys es independiente del antígeno. Para confirmar que el resto Pam2Cys es principalmente responsable de la actividad antivírica temprana de los lipopéptidos, los ratones se inocularon por vía intranasal con 20 nmoles de Pam2Cys-PEG₁₁ y se expusieron a 10^{4.5} UFP de virus H3N1 1, 3 ó 7 días después. Los resultados mostrados en la Figura 6 demuestran que la inoculación con Pam2Cys-PEG₁₁ reduce las cargas víricas pulmonares en la misma medida que el sin IAV-LP, lo que confirma que la actividad antivírica temprana de los lipopéptidos observada está mediada por Pam2Cys. La profilaxis con Pam2Cys-PEG₁₁ redujo la carga vírica después de la exposición casi de inmediato, desde el día 1 hasta el día 7 posterior a la administración, lo que revela que la profilaxis de Pam2Cys-PEG₁₁ puede proporcionar al menos una ventana de protección de 7 días.

Pam2Cys protege contra IAV cuando se administra por vía intranasal en una sola dosis. Después de la administración profiláctica de Pam2Cys pegilado (PEG-Pam2Cys) (también denominado en la presente memoria Pam2Cys-PEG₁₁ o P2C-PEG_n) en ratones a través de las vías intranasal (i.n.), subcutánea (s.c.) o intravenosa (i.v.) y una posterior exposición a una dosis letal del virus PR8 3 días después, solo los ratones a los que se administró PEG-Pam2Cys por vía intranasal estaban protegidos contra la muerte y la pérdida de peso asociada con la infección por PR8 (Figura 10).

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

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

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

ⁱⁱ OT2 (secuencia de aminoácidos ISQAVHAAHAEINEAGR) es un epítipo de Th de ovoalbúmina.

ⁱⁱⁱ P2C: Pam2Cys.

^{iv} Se administró una mezcla de los tres IAV-LP a ratones HHD antes de la exposición al H1N1 PR8. Los ratones expuestos a H3N1 Mem71 solo recibieron OTS-P2C-M1₅₈₋₆₆.

^v P25 (secuencia de aminoácidos KLIPNASLIENCTKAEL) es un epítipo de Th indiscriminado (16) de virus morbilli.

^{vi} El epítipo PA224-233 no es reconocido por las moléculas de restricción de Clase 1 presentes en ratones BALB/c

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

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

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

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

20 PEG-Pam2Cys es eficaz como agente terapéutico. Cuando los ratones se expusieron a 10^{4.5} UFP de virus Udm (Gripe A) (i.n.) y 4 horas después se administraron 20 nmoles de PEG-Pam2Cys (i.n.), se encontraron menores cargas virales en la nariz, orofaringe, tráquea y pulmón. La carga viral en los pulmones, en particular, mostró un Log₁₀4, o una reducción de 10000 veces en comparación con el grupo de solución salina (Figura 15).

25 Pam2Cys es eficaz como agente antibacteriano. Cuando los ratones se trataron previamente con PEG-Pam2Cys (i.n.) mostraron cargas bacterianas en el pulmón y la tráquea significativamente menores después de la exposición intranasal a *L. pneumophila* (Figura 16A). La carga bacteriana en los pulmones alcanzó su punto máximo en los días 2 y 3. También se pueden lograr menores cargas bacterianas hasta 7 días después de la administración de PEG-

Pam2Cys y se muestran las cargas bacterianas el día 3 después de la infección en los ratones que recibieron la profilaxis 3 con PEG-Pam2Cys (Fig. 16B) o 7 días (Fig. 16C) antes de la exposición.

Discusión

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

Referencias

1. Jackson, D. C., et al. 2004. Proc Natl Acad Sci USA 101:15440-5.
2. Zeng, W., et al. 2005. Vaccine 23:4427-35.
3. Zeng, W., et al. 2002. J Immunol 169:4905-12.
4. Firat, H., et al. 1999. Eur J Immunol 29:3112-21.
5. Pascolo, S., et al. 1997. J Exp Med 185:2043-51.
6. Tannock, G. A., et al. 1984. Infect Immun 43:457-62.
7. Cleret, A., et al. 2007. J Immunol 178:7994-8001.
8. Gonzalez-Juarrero, M., et al. J Immunol 171:3128-35.
9. Landsman, F., and S. Jung. 2007. J Immunol 179:3488-94.
10. Belz, G. T., et al. 2000. J Virol 74:3486-93.
11. Wallace, M. E., et al. 1999. J Virol 73:7619-26.
12. Gotch, F., et al. 1987. Nature 326:881-2.
13. Gianfrani, C., et al. 2000. Hum Immunol 61:438-52.
14. Jameson, J., et al. 1999. J Immunol 162:7578-83.
15. Bodmer, H. C. et al., 1988. Cell 52:253-8.
16. Sherman, L. A., et al. 1992. J Exp Med 175:1221-6.

REIVINDICACIONES

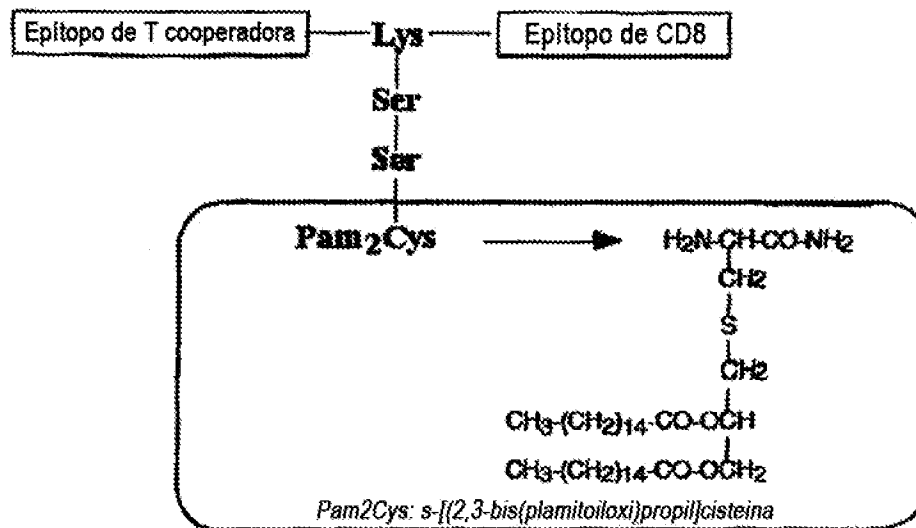
1. Una composición que comprende un resto de TLR2 soluble para uso para tratar o prevenir una o más infecciones virales o bacterianas en el tracto respiratorio de un sujeto,
- 5 en donde el resto TLR2 comprende un agonista de TLR2 conjugado con un agente solubilizante, en donde el agente es PEG,

en donde el agonista de TLR2 comprende un resto lipídico seleccionado del grupo que consiste en palmitoilo, miristoilo, estearoilo, lauroilo, decanoilo y combinaciones de los mismos,

en donde la composición no induce una respuesta inmunitaria humoral o celular específica dirigida contra el agente que causa la infección mencionada anteriormente, y no comprende un antígeno que pueda provocar una respuesta inmunitaria contra el agente que causa la infección mencionada anteriormente, y
- 10 en donde la composición se administra al tracto respiratorio por vía intranasal u oral.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde el agente solubilizante comprende además uno cualquiera de R4, H4, H8, EB8 y E8.
- 15 3. La composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde la composición se administra intranasalmente al sujeto.
4. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente infeccioso es el virus de la gripe A (IVA).
5. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente infeccioso es
- 20 *Mycobacterium tuberculosis* o *Legionella pneumophila*.
6. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición no comprende un agonista de TLR9.
7. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto de TLR2 soluble no comprende un antígeno peptídico.
- 25 8. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto de TLR2 soluble no comprende un antígeno.
9. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto de TLR2 soluble consiste en un agonista de TLR2 conjugado a un agente solubilizante.
- 30 10. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto de TLR2 soluble comprende un antígeno que no puede provocar una respuesta inmunitaria específica al uno o más agentes infecciosos.

FIGURA 1

A



B

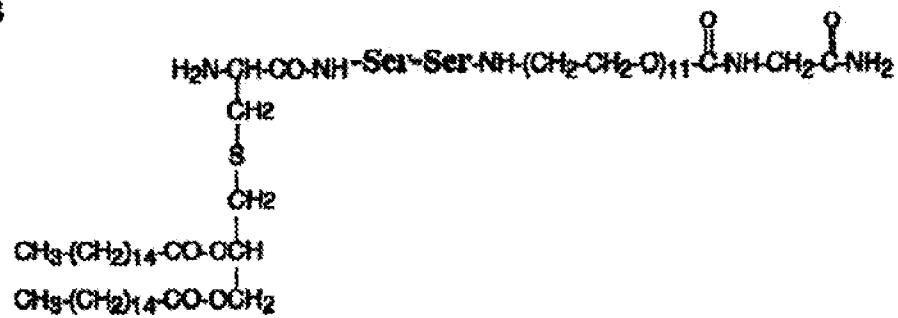


FIGURA 2

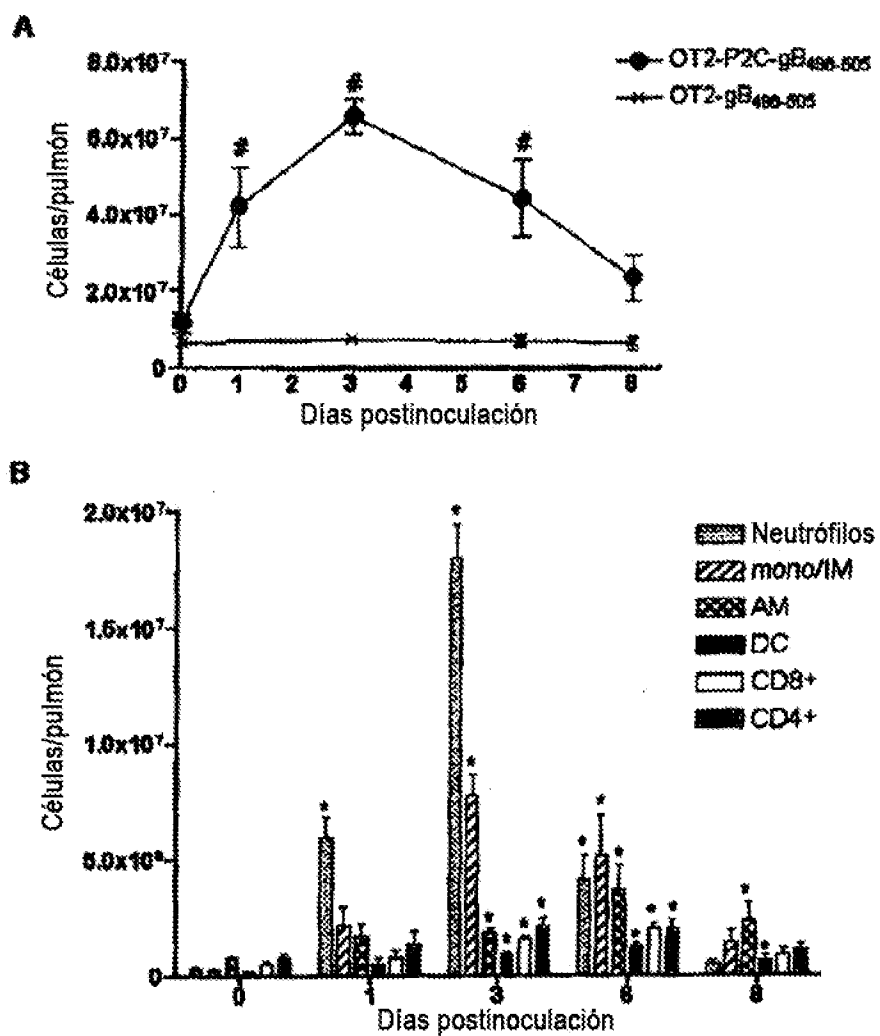


FIGURA 3

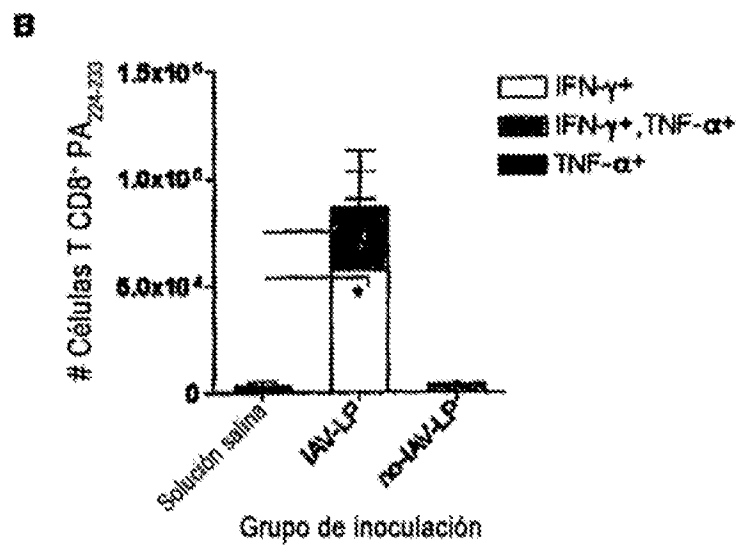
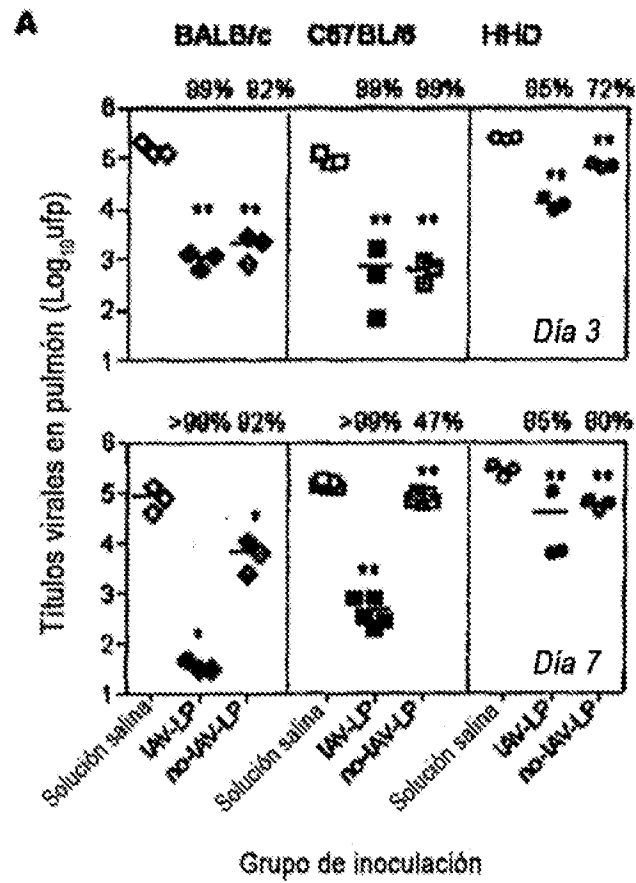


FIGURA 4

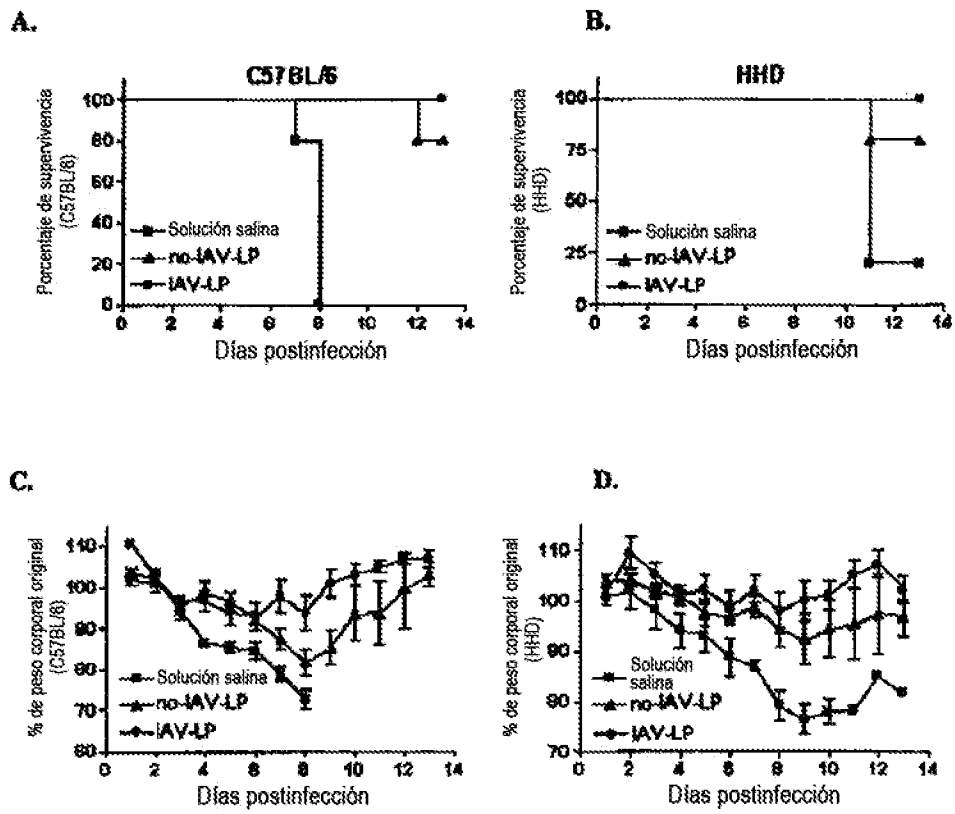


FIGURA 5

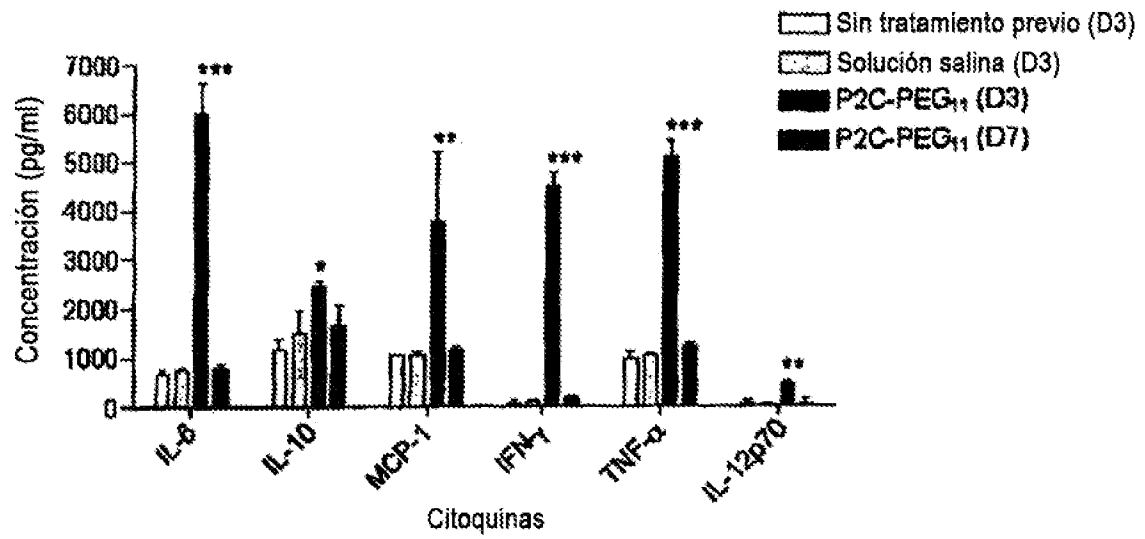


FIGURA 6

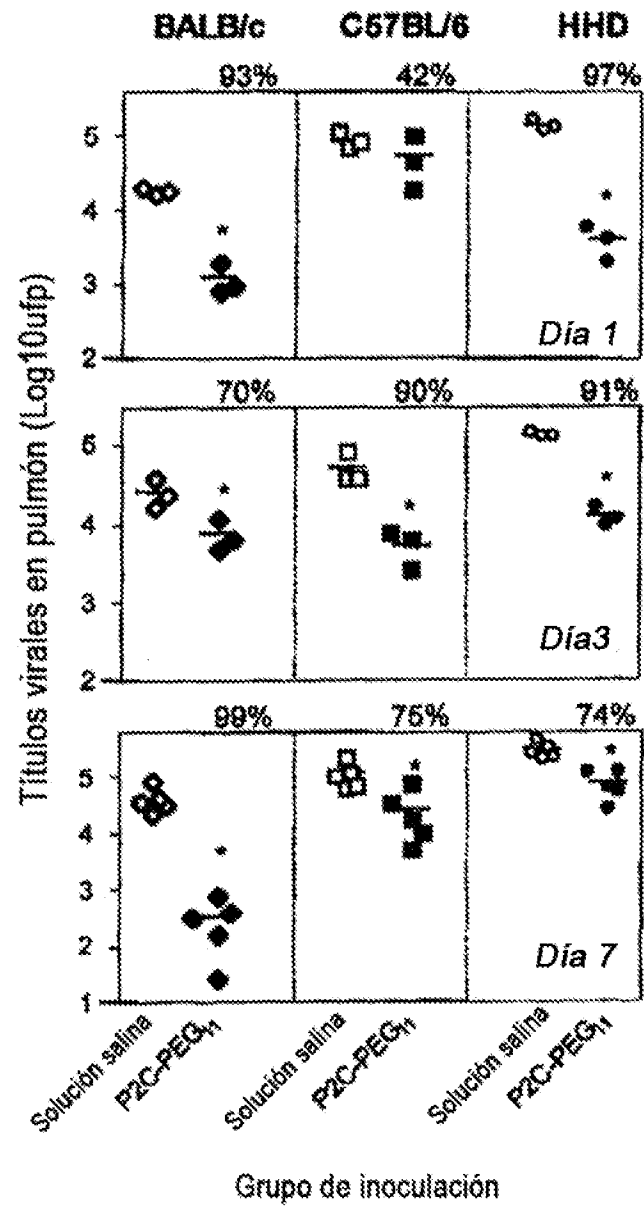


FIGURA 7

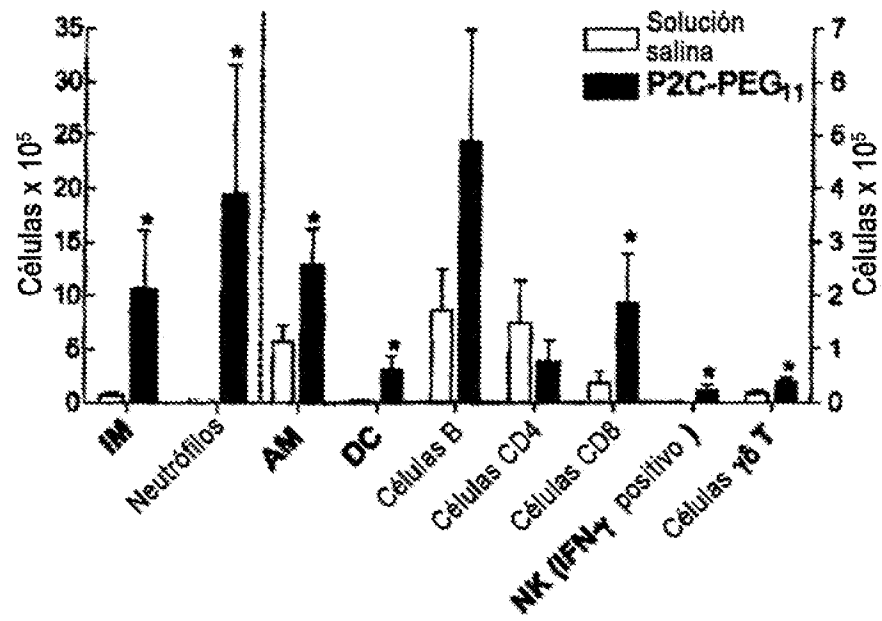


FIGURA 8

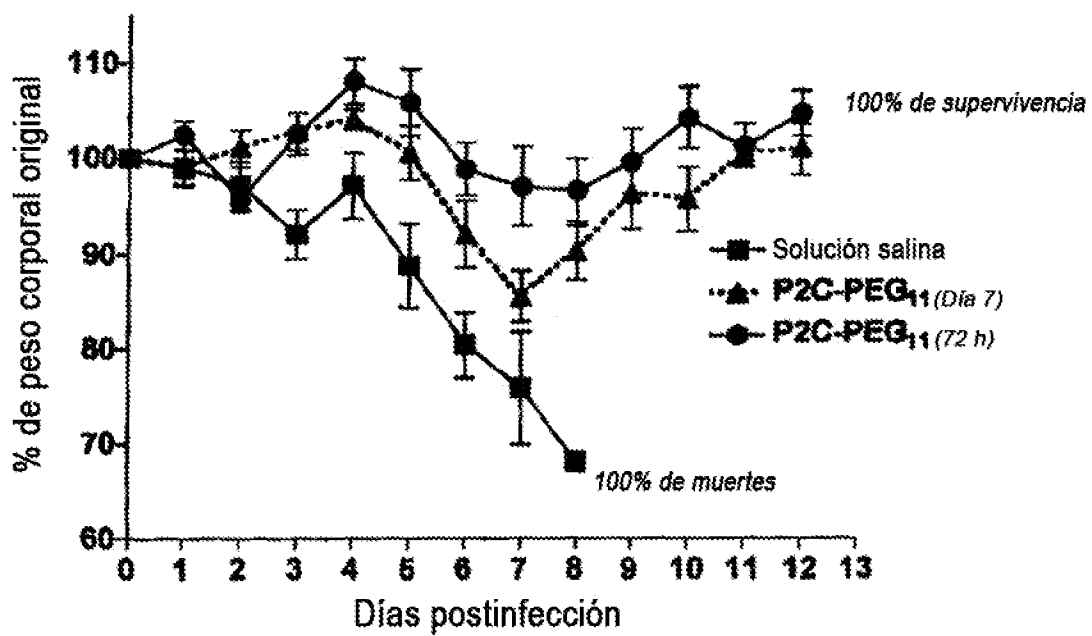


FIGURA 9

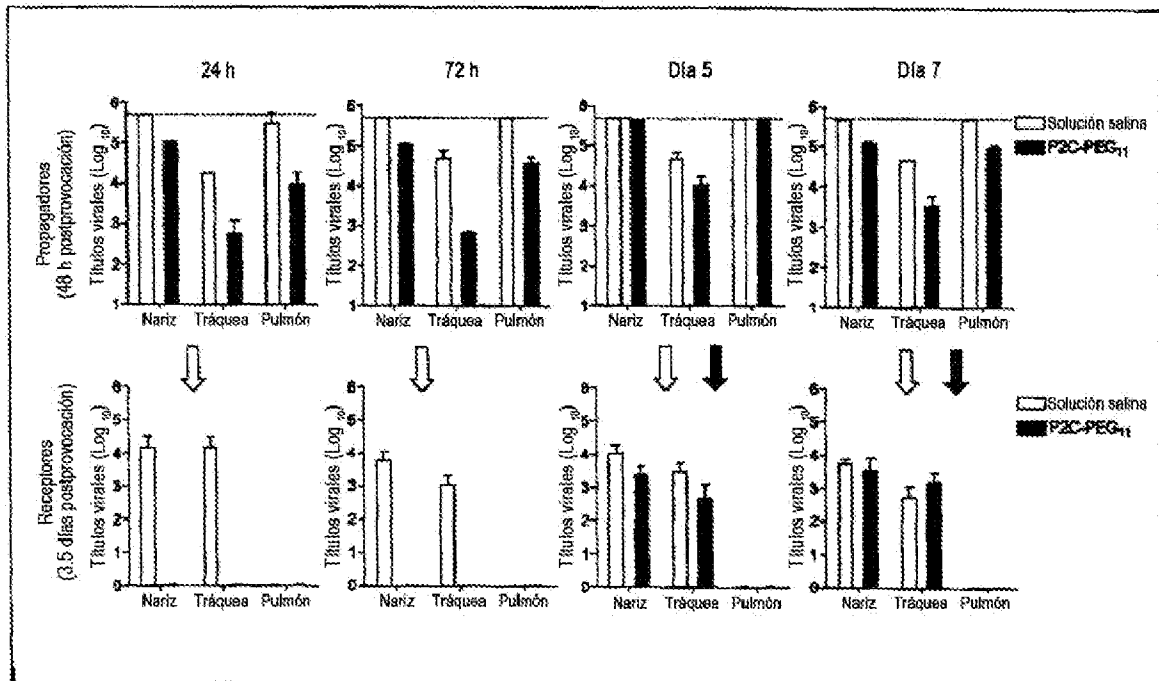


FIGURA 10

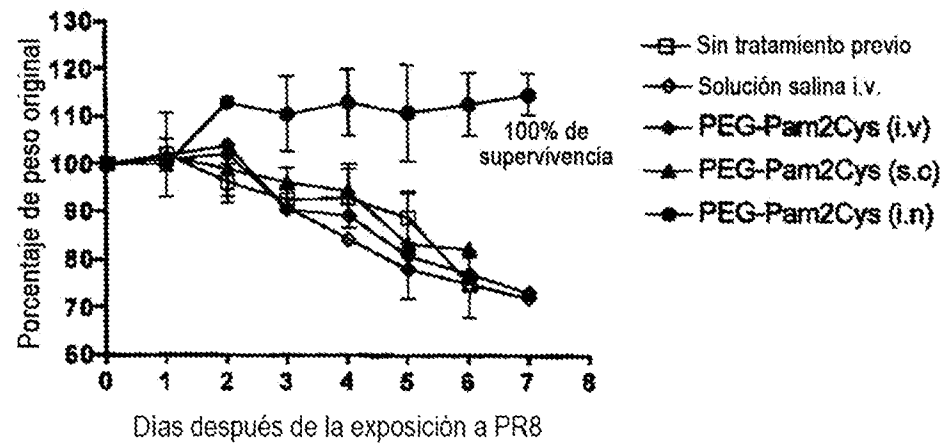
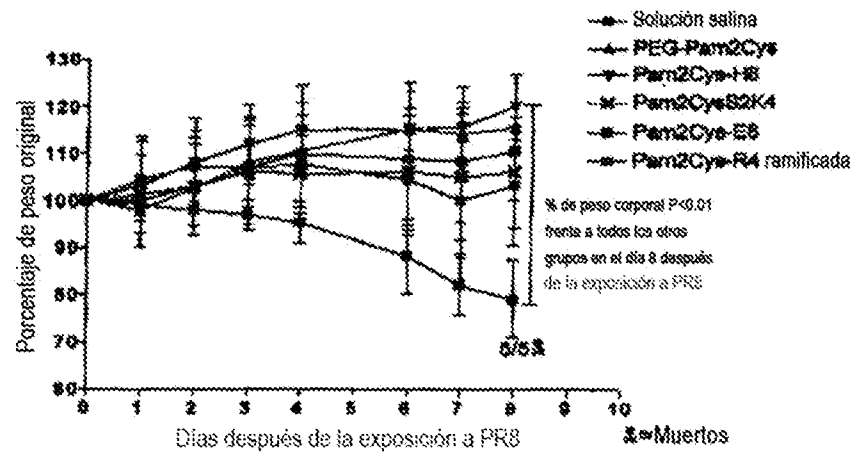


FIGURA 11

A.



B.

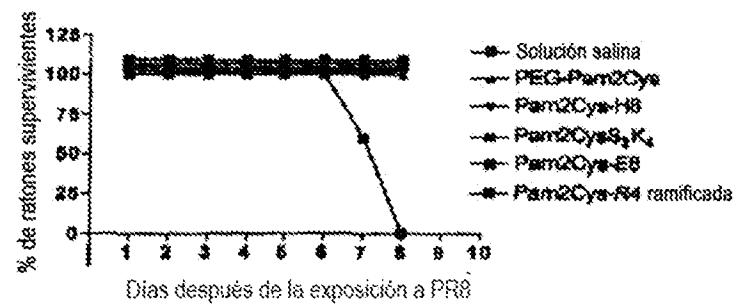


FIGURA 12

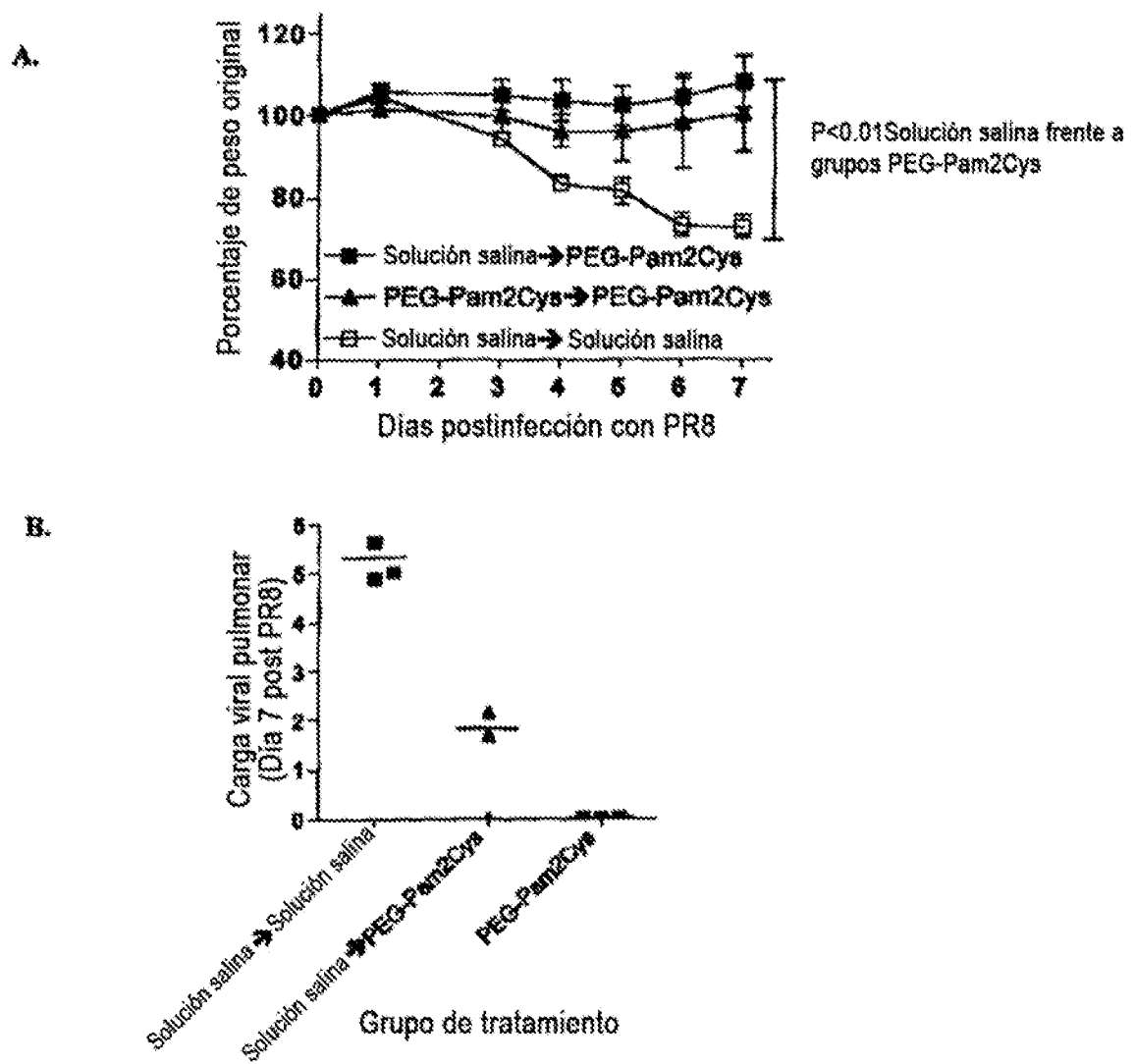


FIGURA 13

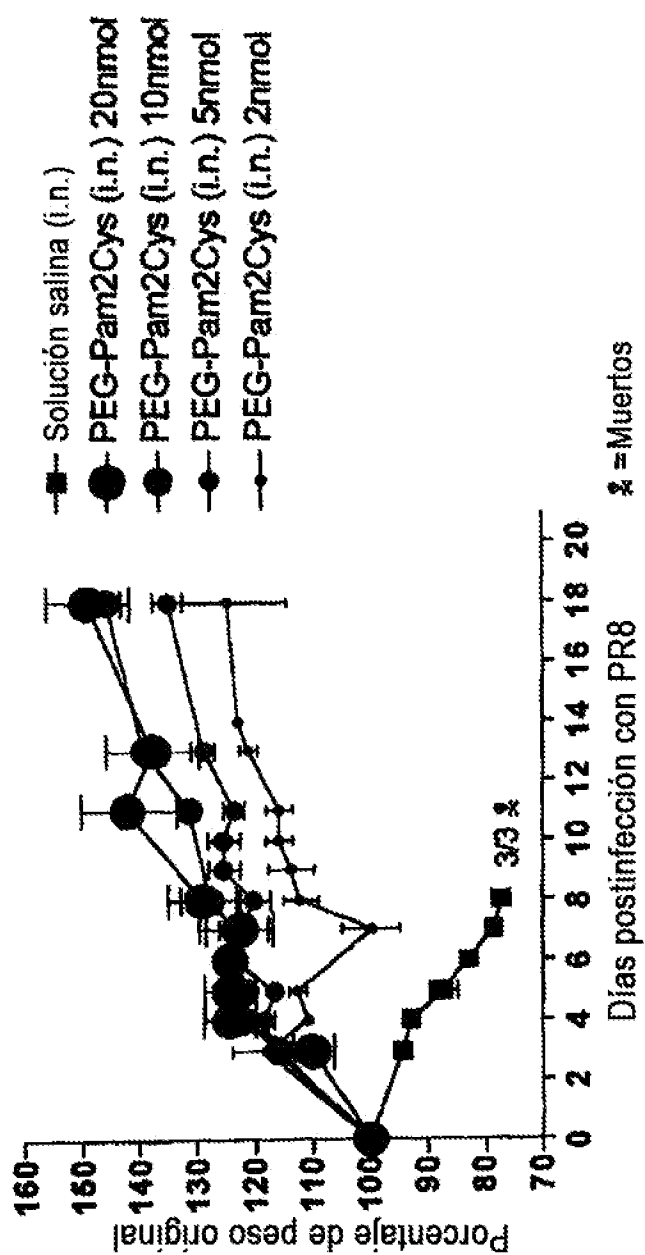
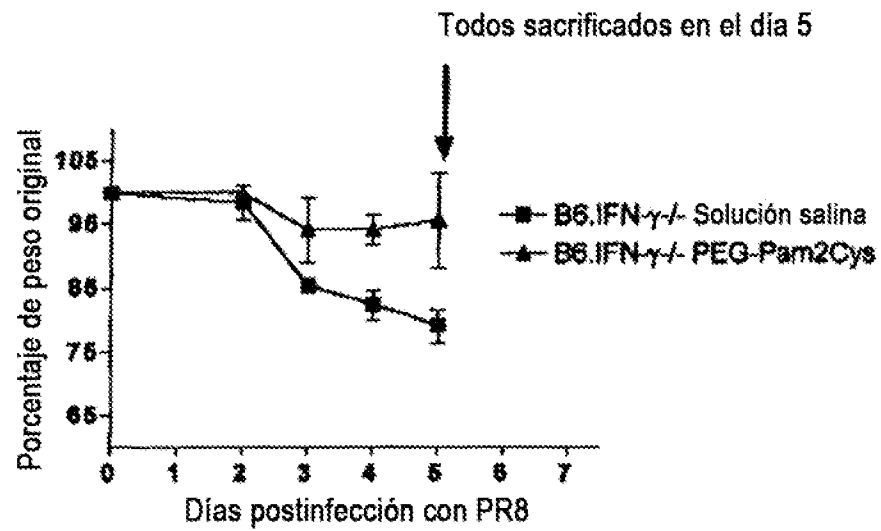


FIGURA 14

A.



B.

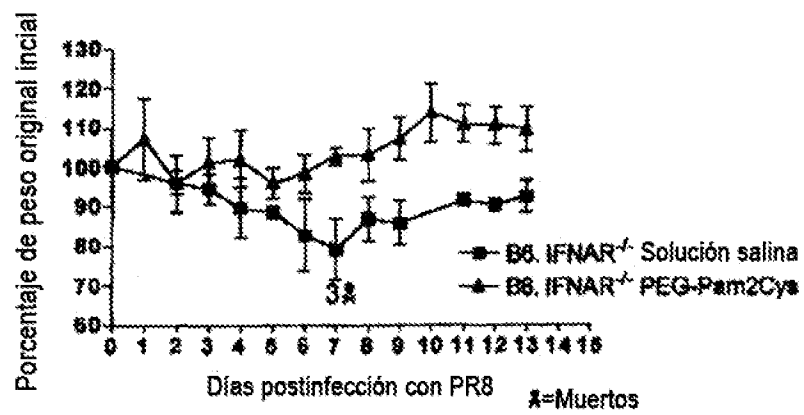


FIGURA 15

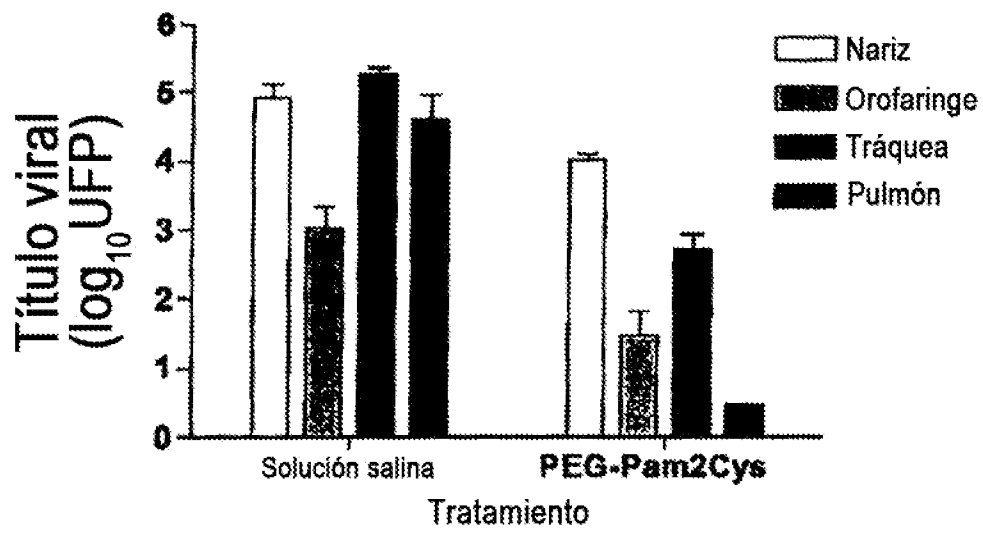


FIGURA 16

