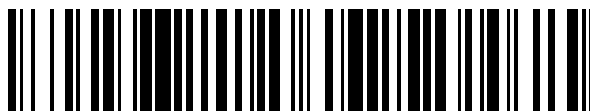


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 644**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2012 PCT/NL2012/050694**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13051936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2012 E 12780309 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 2763697**

54 Título: **Compuesto adyuvante**

30 Prioridad:

05.10.2011 NL 2007536

05.10.2011 US 201161543510 P

26.03.2012 US 201261615566 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2023

73 Titular/es:

ISA PHARMACEUTICALS B.V. (100.0%)

De Limes 7

2342 DH Oegstgeest, NL

72 Inventor/es:

OSSENDORP, FERDINAND ANTONIUS;

MELIEF, CORNELIS JOHANNES MARIA;

KHAN, SELINA;

FILIPPOV, DMITRI VIKTOROVITSJ y

VAN DER MAREL, GIJSBERT ARIE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 952 644 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

Compuesto adyuvante

Campo de la invención

- 5 [0001] La presente invención se refiere a un nuevo compuesto adecuado como adyuvante en una composición de vacuna, un proceso para preparar el compuesto y una composición que comprende el compuesto.

Antecedentes de la invención

- 10 [0002] Las estrategias de vacunación se han utilizado durante décadas principalmente para fomentar una inmunidad protectora para proteger a los pacientes frente al desarrollo de una enfermedad después del contacto con un agente infeccioso. Con este fin, se han administrado a pacientes patógenos vivos atenuados, muertos o alterados, preparaciones de patógenos o componentes purificados o recombinantes de los patógenos para provocar una respuesta inmunitaria específica a los componentes antigénicos del respectivo patógeno. Los componentes que estimulan dicha respuesta inmunitaria pueden ser, por ejemplo, proteínas, polisacáridos o lípidos específicos de patógenos. La respuesta inmunitaria específica contra los antígenos comprendidos en los patógenos puede estimularse aún más mediante la administración conjunta de adyuvantes. Los adyuvantes son conocidos en la técnica para acelerar, prolongar o mejorar la calidad de la respuesta inmunitaria específica al antígeno o antígenos, y actualmente se emplean como parte de las vacunas. Las ventajas propuestas de los adyuvantes incluyen su capacidad para: 1) dirigir y optimizar las respuestas inmunitarias que son apropiadas para la vacuna; 2) permitir la administración de vacunas a través de las mucosas; 3) promover la respuesta inmune mediada por células; 4) potenciar la inmunogenicidad de inmunógenos más débiles, tales como antígenos altamente purificados o recombinantes; 5) reducir la cantidad de antígeno o la frecuencia de inmunización requerida para proporcionar inmunidad protectora; 6) mejorar la eficacia de las vacunas en personas con respuestas inmunitarias reducidas o debilitadas, como recién nacidos, ancianos y pacientes inmunodeprimidos.

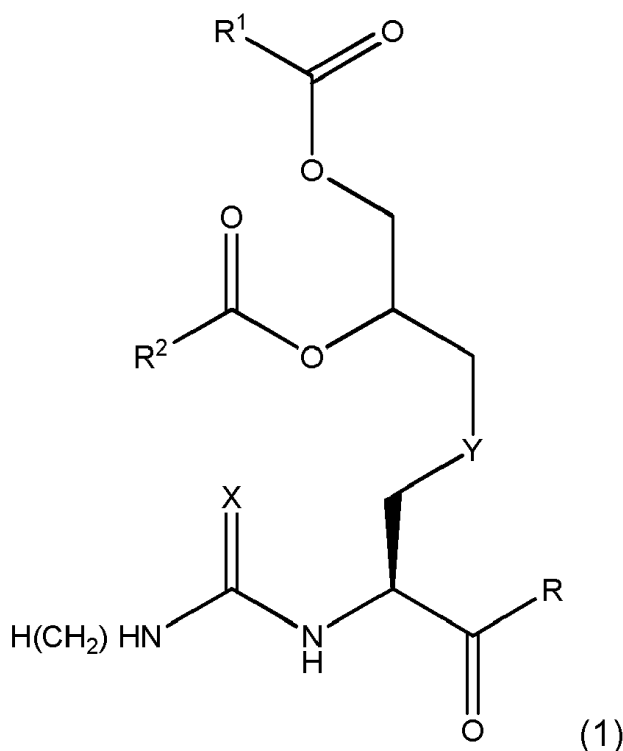
- 25 [0003] Los adyuvantes tienen diversos mecanismos de acción. Un conjunto de adyuvantes actúa a través de receptores tipo Toll. Los receptores tipo Toll (TLR) reconocen patrones específicos de componentes microbianos, especialmente los de patógenos, y regulan la activación de la inmunidad tanto innata como adaptativa. Las células dendríticas inmaduras maduran en respuesta a estos componentes microbianos. Hasta el momento, se han identificado 13 miembros de la familia TLR. Los TLR son expresados por células fagocíticas, como monocitos, macrófagos y células dendríticas. La activación de TLR a través de la unión del ligando conduce a eventos de transducción de señales en una vía dependiente de MyD88 (NF- κ B) o bien en una vía independiente de MyD88 (IRF-3). Un adyuvante lipopeptídico conocido que interacciona con el receptor tipo Toll 2 (TLR2) es el denominado lipopéptido Pam3Cys. De acuerdo con Renate Spohn *et al.* (Vaccine 22 (2004) 2494-2499), se descubrió que la variante Pam3Cys-SK4 era el aditivo más eficaz para elegir una respuesta inmunitaria celular en ratones. Otra ventaja de Pam3Cys-SK4 es que es químicamente estable y se puede producir en grandes cantidades con alta calidad. Un lipopéptido Pam3Cys, Pam3Cys-Ser-(Lys)4(Aca-Aca-Biotina).2trifluoroacetato está disponible comercialmente a través de, por ejemplo, Enzo Life Sciences International Inc, Plymouth Meeting, Pensilvania, EE. UU., para uso como adyuvante.

- 40 [0004] En el documento WO-A-2009/072767 se describe el uso de una mezcla de Pam3Cys-SK4 y ácido poliinosínico:policitidílico como adyuvante para una vacuna.

[0005] El objeto de la presente invención es mejorar la respuesta inmunitaria de un lipopéptido similar a Pam3Cys.

- 45 Sumario de la invención

[0006] La presente invención está dirigida a un lipopéptido similar a Pam3Cys mejorado, que induce una mejor respuesta inmunitaria. El nuevo compuesto se representa mediante



donde R^1 y R^2 son cada uno independientemente un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 17 átomos de carbono, n es de 11 a 18 inclusive, Y es azufre, X es O y R es un grupo orgánico que comprende uno o más péptidos, uno o más ácidos nucleicos, uno o más anticuerpos o combinaciones de estos.

[0007] Los solicitantes descubrieron que el compuesto según la invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria mejorada mediante la estimulación funcional de TLR2 en comparación con el Pam3Cys-SK4 conocido. Sin desear limitarse a la siguiente teoría, los solicitantes creen que el nivel de estimulación más alto se logra intercambiando el grupo puente $-CH_2-$ en el resto palmitoilo N-terminal del compuesto conocido en un grupo puente $-NH-$. Las cadenas grasas del compuesto encajan en los bolsillos definidos en el receptor dimérico y se cree que, al incorporar el grupo puente $-NH-$, se crea un puente de hidrógeno. Esto da como resultado una unión más estrecha del ligando al receptor, lo que a su vez es beneficioso para lograr la actividad adyuvante deseada.

Breve descripción de las figuras

[0008]

La figura 1 muestra el compuesto Pam3Cys-SK4 según el estado de la técnica y dos ejemplos de compuestos según la presente invención.

La figura 2 muestra un esquema de síntesis para la preparación de un compuesto según la presente invención.

La figura 3 muestra los resultados de la prueba en la que se incubaron células HEK transfectadas con TLR2 y células dendríticas con compuestos del estado de la técnica y compuestos según la invención.

La figura 4 muestra los resultados de la prueba para una línea de células DC murinas que se incubaron con compuestos del estado de la técnica, compuestos según la invención o se dejaron sin estimular.

La figura 5 muestra los resultados de la activación de células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC).

La figura 6 muestra la capacidad de cebado de células T *in vivo* del péptido largo sintético conjugado U-Pam del antígeno OVA (que contiene el epítipo SIINFEKL CTL).

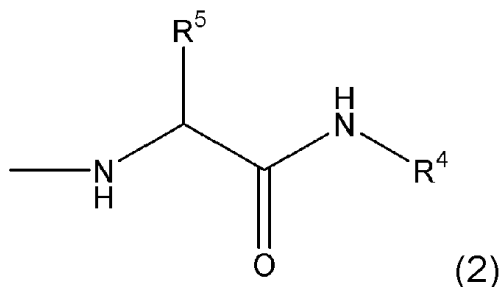
Descripción detallada de la invención

[0009] El compuesto (1) según la presente invención tiene un grupo X que es O. Se prefiere el O de origen natural por su facilidad de síntesis. El átomo de S es una variante conocida por el experto en la materia. Y es azufre.

[0010] R^1 y R^2 son cada uno independientemente un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 17 átomos de carbono. En una forma de realización, R^1 y R^2 son preferiblemente cada uno independientemente grupos alifáticos lineales que tienen hasta 17 átomos (es decir, cada uno 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 átomos) de longitud que contienen carbono. El experto en la materia sabe que la expresión "hasta 17 átomos de longitud" significa en el contexto de la invención que el esqueleto del grupo lineal o ramificado comprende hasta 17 átomos; por tanto, los átomos de hidrógeno de un grupo alifático no se incluyen en el cálculo del número hasta 17 átomos. Otro grupo preferido R^1 y R^2 es un grupo alquilo de cadena lineal con 15 átomos de carbono. Los grupos con menos átomos de carbono, que dan como resultado una versión menos lipófila del compuesto, pueden ser ventajosos porque pueden tener mejores propiedades de solubilidad y, por lo tanto, exhibir un comportamiento más predecible en solución.

[0011] En la fórmula (1), n es de 11 a 18 inclusive, más preferiblemente de 11 a 15 inclusive. Los solicitantes encontraron resultados positivos para compuestos en los que n es 11 y en los que n es 13.

[0012] En una primera forma de realización, R es un grupo orgánico que comprende uno o más péptidos. En este sentido, el compuesto según la invención se denomina conjugado peptídico. Estos péptidos pueden contener sólo aminoácidos naturales, pero también pueden estar comprendidos en estos péptidos aminoácidos sintéticos. Preferiblemente, R es un péptido de hasta 60 aminoácidos. Ejemplos de péptidos adecuados son SSNASK4, SR8, RPDRY-NH₂ y QPDRY-NH₂. Un péptido preferido es SK _{m} , donde m es 1, 2, 3, 4 o 5. Preferiblemente, m es 4. El SK4 también se conoce como SerLysLysLysLys. La parte S del péptido SK _{m} , y más preferiblemente la parte S del péptido SK4, puede modificarse adecuadamente como se describe a continuación y el péptido SK _{m} puede acoplarse opcionalmente, además, a un antígeno. El péptido SK _{m} modificado preferido se presenta mediante:



donde R^4 representa la parte peptídica K _{m} , opcionalmente acoplada además a un antígeno, y R^5 es hidrógeno o un grupo relativamente pequeño que comprende de uno a seis átomos seleccionados de entre carbono, nitrógeno y/u oxígeno. m es preferiblemente 4. Ejemplos de posibles grupos R^5 son hidrógeno, alquilo C1-C6, preferiblemente un alquilo C1-C4, alqueno C2-C6, preferiblemente un alqueno C2-C3, alquino C2-C6, preferiblemente un alquino C2-C3, hidroxialquilo C1-C5, mercaptoalquilo C1-C5, aminoalquilo C1-C5, cianoalquilo C1-C4, azidoalquilo C1-C3, por ejemplo un grupo -CH₂N₃, haloalquilo C1-C6, por ejemplo, un grupo -CH₂X (X = F, Cl, Br), anillos aromáticos de 5 o 6 miembros que contienen uno o más seleccionados de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, y anillos (hetero)cíclicos de 3 a 6 miembros que contienen uno o más seleccionados de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. R^5 es preferiblemente hidrógeno, un grupo -CH₂-OH, grupo -CH₂-CH₃, grupo -(CH₂)₂-CH₃, grupo -(CH₂)₃-CH₃, grupo -CH₂C≡CH, grupo -CH₂CH=CH₂, grupo -(CH₂)₂NH₂, grupo -CH₂-SH, grupo -CH₂-2-tiofeno, grupo 2-tiofeno o un grupo -CH₂-CN, y más preferiblemente R^5 es un grupo -CH₂-OH, grupo -CH₂-CH₃, grupo -(CH₂)₂-CH₃, grupo -(CH₂)₃-CH₃, grupo -CH₂C≡CH, grupo -CH₂CH=CH₂ o un grupo -(CH₂)₂NH₂. La configuración del carbono asimétrico al que se une R^5 puede ser L o D, y preferiblemente la configuración es L.

[0013] El grupo R puede comprender un antígeno, y más preferiblemente el grupo R^4 en la fórmula (2) comprende un antígeno. El antígeno puede acoplarse al péptido, en particular a la parte peptídica K _{m} , ya sea directamente o a través de una molécula espaciadora: un enlazador. En el contexto de la invención, se entiende por un "enlazador" un resto de bajo peso molecular con al menos dos puntos de unión para los restos. A este respecto, un enlazador divalente tiene dos puntos de unión de este tipo y un enlazador multivalente tiene al menos tres puntos de unión de este tipo. A través de uno de estos puntos de unión, el enlazador se une al resto peptídico de R , y cada uno de los uno o más puntos de unión restantes se unen a un antígeno según lo definido anteriormente. Estos puntos de unión se originan a partir de grupos funcionales en el precursor del enlazador y permiten unir al menos un antígeno al compuesto adyuvante según la invención. Un enlazador tiene preferiblemente un peso molecular de como máximo 800 Da. Todo esto es química convencional.

[0014] Ejemplos de enlaces químicos adecuados en los que el antígeno se une al enlazador y/o en los que el enlazador se une al grupo R del compuesto adyuvante según la invención son moléculas orgánicas que contienen una cadena alifática y que incluyen opcionalmente tioéter simple o repetitivo, amida, amina, oxima, disulfuro, tiazolidina, tiourea, éster, tioéster, éter, carbamato, tiocarbamato, carbonato, tiocarbonato, hidrazona, sulfato, sulfamido, sulfona, sulfonamida, fosfato, fosforotioato, glicólico-oxima, o un enlace obtenido mediante

cicloadición de Diels-Alder, ligadura de Staudinger, ligadura nativa o cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen. Los métodos de acoplamiento se describen, entre otros, en Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 2054.

[0015] Ejemplos de enlazadores adecuados son enlazadores de tipo Unylinker, α,ω -dihidroxicanos y derivados de oligoetilenglicol o polietilenglicol. El enlazador puede incluir residuos de aminoácidos naturales y no naturales, compuestos alicíclicos tales como ciclohexano y derivados de ciclopentano y anillos (hetero)aromáticos, como fenilo y triazol sustituidos.

[0016] Cuando no se utiliza un enlazador, el antígeno se acopla directamente al resto del compuesto según la invención, preferiblemente a la parte peptídica Km del grupo R. Ejemplos de enlaces adecuados entre la parte peptídica Km y el antígeno son enlaces tioéter, disulfuro, amida o éster.

[0017] En lugar de la incorporación covalente del antígeno en el compuesto adyuvante según la invención, opcionalmente a través de un enlazador, el acoplamiento también puede realizarse a través de un enlace iónico. Un ejemplo de un enlace iónico adecuado es la interacción coulombica entre un grupo amino cargado positivamente de una cadena lateral de lisina en la parte peptídica Km y un residuo de aminoácido cargado negativamente del antígeno. En formas de realización adicionales, el compuesto adyuvante según la invención, preferiblemente el compuesto según la fórmula (1), puede acoplarse a un antígeno, pero también puede acoplarse a otro compuesto, usando las técnicas descritas en el presente documento, tal como un anticuerpo, un ácido nucleico como un polinucleótido y un oligonucleótido. El otro compuesto puede estar preferiblemente acoplado al grupo R y más preferiblemente al grupo R⁴ en la fórmula (2). El otro compuesto puede acoplarse al péptido de la fórmula (2), en particular a la parte peptídica K_m.

[0018] En una segunda forma de realización, R es un grupo orgánico que comprende uno o más ácidos nucleicos, como uno o más oligonucleótidos o uno o más polinucleótidos, preferiblemente uno o más oligonucleótidos. Un oligonucleótido puede ser un oligonucleótido sentido o antisentido. A este respecto, el compuesto según la invención se denomina conjugado de ácido nucleico. Dicho ácido nucleico puede acoplarse al compuesto de fórmula (1) directamente o a través de un enlazador. Cuando no se utiliza un enlazador, el ácido nucleico se acopla preferiblemente a través de un átomo de oxígeno o un átomo de fósforo del grupo fosfodiéster en el extremo 3' o en el extremo 5' del ácido nucleico al compuesto según la fórmula (1), a través del átomo de carbono del carbonilo al que está unido R. Preferiblemente, se usa un enlazador según lo descrito anteriormente. Un extremo de dicho enlazador se une al compuesto según la fórmula (1) a través del átomo de carbono del carbonilo al que se une R, y el otro extremo del enlazador se une al ácido nucleico, preferiblemente a través de un átomo de oxígeno o un átomo de fósforo del grupo fosfodiéster en el extremo 3' o en el extremo 5' del oligonucleótido.

[0019] En el contexto de esta invención, un "ácido nucleico" tiene preferiblemente una longitud de 5 a 60 nucleótidos (es decir, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 nucleótidos). Un ácido nucleico tal como un polinucleótido y un oligonucleótido puede ser cualquier ácido nucleico conocido por el experto en la materia, tal como un ADN, ARN, APN o combinaciones de estos. Por tanto, un ácido nucleico puede comprender nucleótidos de origen natural, o análogos de nucleótidos, que tienen una o más modificaciones con respecto a los nucleótidos de origen natural. A este respecto, los nucleótidos de origen natural son aquellos que están comprendidos en el ADN o el ARN. Los análogos de nucleótidos comprenden al menos una modificación seleccionada de una nucleobase modificada, un resto de azúcar modificado, un enlace internucleósido modificado y combinaciones de estos. Un ejemplo de modificaciones es un esqueleto modificado, que comprende un resto de azúcar modificado y/o un enlace internucleósido modificado. Por tanto, el esqueleto y las nucleobases del ácido nucleico pueden modificarse según técnicas comúnmente conocidas por el experto en la materia, para aumentar o reducir la especificidad y/o aumentar o reducir la estabilidad. Por consiguiente, un ácido nucleico puede contener un residuo de ARN, un residuo de ADN, un análogo de nucleótido o equivalente, como se detallará más adelante en el presente documento.

[0020] Se prefiere que un ácido nucleico comprenda uno o al menos un residuo que esté modificado para aumentar la resistencia a la nucleasa y/o para aumentar la afinidad de un nucleótido (antisentido) por una secuencia diana. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, un ácido nucleico comprende uno o al menos un análogo de nucleótido o equivalente, donde un análogo de nucleótido o equivalente se define como un resto que tiene una base modificada y/o un esqueleto modificado y/o un enlace internucleósido no natural, o una combinación de estas modificaciones.

[0021] En una forma de realización preferida, un análogo de nucleótido o equivalente comprende un esqueleto modificado. Ejemplos de tales esqueletos se proporcionan por esqueletos de morfolino, esqueletos de carbamato, esqueletos de siloxano, esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona, esqueletos de formacetilo y tioformacetilo, esqueletos de metilenformacetilo, esqueletos de riboacetilo, esqueletos que contienen alqueno, esqueletos de sulfamato, sulfonato y sulfonamida, esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino, y esqueletos de amida. Los oligómeros de fosforodiamidato-morfolino son oligonucleótidos de esqueleto modificado que se han investigado previamente como agentes antisentido. Los oligonucleótidos de morfolino tienen un esqueleto

sin carga donde el azúcar desoxirribosa del ADN se reemplaza por un anillo de seis miembros y el enlace fosfodiéster se reemplaza por un enlace fosforodiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino son resistentes a la degradación enzimática y parecen funcionar como agentes antisentido al detener la traducción o interferir con el empalme del pre-ARNm en lugar de activar la RNasa H. Los oligonucleótidos de morfolino se han administrado con éxito a las células de cultivo de tejidos mediante métodos que rompen físicamente la membrana celular, y en un estudio que comparó varios de estos métodos se observó que la carga por raspado era el método de entrega más eficiente; sin embargo, debido a que el esqueleto de morfolino no está cargado, los lípidos catiónicos no son mediadores efectivos de la captación de oligonucleótidos de morfolino en las células.

[0022] Se prefiere además que el enlace entre un residuo en un esqueleto no incluya un átomo de fósforo, tal como un enlace formado por enlaces internucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos mixtos de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena más corta.

[0023] Un análogo de nucleótido preferido o equivalente comprende un ácido peptidonucleico (APN), que tiene un esqueleto de poliamida modificada (Nielsen, *et al.* (1991) Science 254, 1497-1500). Las moléculas a base de APN son verdaderas imitaciones de las moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. El esqueleto del APN está compuesto por unidades de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos, donde las nucleobases están unidas al esqueleto por enlaces metileno carbonilo. Un esqueleto alternativo comprende un monómero de APN de pirrolidina extendida de un carbono (Govindaraju y Kumar (2005) Chem. Commun, 495-497). Puesto que el esqueleto de una molécula de APN no contiene grupos fosfato cargados, los híbridos de APN-ARN suelen ser más estables que los híbridos de ARN-ARN o ARN-ADN, respectivamente (Egholm *et al.* (1993) Nature 365, 566-568).

[0024] Otro esqueleto preferido comprende un análogo de nucleótido de morfolino o equivalente, donde el azúcar de ribosa o desoxirribosa se reemplaza por un anillo de morfolino de 6 miembros. Un análogo de nucleótido más preferido o equivalente comprende un oligómero de morfolino de fosforodiamidato (PMO), donde el azúcar de ribosa o desoxirribosa se reemplaza por un anillo de morfolino de 6 miembros, y el enlace fosfodiéster aniónico entre los anillos de morfolino adyacentes se reemplaza por un enlace fosforodiamidato no iónico.

[0025] En otra forma de realización más, un análogo de nucleótido o equivalente de la invención comprende una sustitución de al menos uno de los oxígenos que no forman puente en el enlace fosfodiéster. Esta modificación desestabiliza ligeramente el apareamiento de bases, pero agrega una resistencia significativa a la degradación por nucleasas. Un análogo de nucleótido preferido o equivalente comprende fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, H-fosfonato, metilo y otros fosfonatos de alquilo, incluidos fosfonato de 3'-alquileo, fosfonato de 5'-alquileo y fosfonato quiral, fosfinato, fosforamidato, incluido 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidato, tionofosforamidato, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriéster, selenofosfato o boranofosfato.

[0026] Otro análogo de nucleótido preferido o equivalente de la invención comprende uno o más restos de azúcar que están mono o disustituidos en la posición 2', 3' y/o 5', como un -OH; -F; alquilo, alqueno, alquino, alcarilo, alilo, arilo o aralquilo inferior (C1-C10), lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; O-, S- o N-alilo; O-alquil-O-alquilo, -metoxi, -aminopropoxi; aminoxi, metoxietoxi; -dimetilaminoetoxi; y -dimetilaminoetoxietoxi. El resto de azúcar puede ser una piranosa o un derivado de la misma, o una desoxipiranosa o un derivado de la misma, preferiblemente una ribosa o un derivado de la misma, o una desoxirribosa o un derivado de la misma. Dichos restos de azúcar derivatizados preferidos comprenden ácido nucleico bloqueado (LNA), donde el átomo de carbono 2' está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar, formando así un resto de azúcar bicíclico. Un LNA preferido comprende ácido nucleico con puente 2'-O,4'-C-etileno (Morita *et al.* 2001. Nucleic Acid Res Supplement No. 1: 241-242). Estas sustituciones hacen que el análogo de nucleótido o equivalente sea resistente a la RNasa H y a la nucleasa y aumenta la afinidad por el ARN diana.

[0027] Un experto en la materia entiende que no es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido (antisentido) se modifiquen uniformemente. Además, se puede incorporar más de uno de los análogos o equivalentes anteriormente mencionados en un solo oligonucleótido (antisentido) o incluso en una sola posición dentro de un oligonucleótido (antisentido). En ciertas formas de realización, un oligonucleótido (antisentido) de la invención tiene al menos dos tipos diferentes de análogos o equivalentes. En una forma de realización preferida, la modificación se produce en toda la longitud del oligonucleótido.

[0028] Un oligonucleótido preferido es un oligonucleótido inmunomodulador que puede ocurrir de forma natural o ser un oligonucleótido sintético. Preferiblemente, dicho oligonucleótido se inmunomodula actuando sobre un receptor de tipo Toll, preferiblemente el receptor de tipo Toll 9 (TLR9). Preferiblemente, dicho oligonucleótido comprende uno o más, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más, CpG (dinucleótidos de citidina-fosfato-guanosina (CpG) no metilados), más preferiblemente uno o más, CpG de clase B. Un oligonucleótido que comprende CpG de clase B preferido es CpG 7909 con la secuencia 5'-TCGTCGTTTGTCTTTGTCTTTGTCTT-3' (SEQ ID NO: 10) tal como se

describe en Drugs R D. 2006;7(5):312-6. Los oligonucleótidos que comprenden CpG de clase B son potentes estimuladores de la maduración de monocitos y células B humanas. Un oligonucleótido CpG de clase B preferido comprende uno o más, preferiblemente tres, del motivo 6mer CpG 5'-Pu Py C G Py Pu-3', un esqueleto parcial o totalmente fosforotioado, y tiene preferiblemente de 18 a 28 nucleótidos, como 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 nucleótidos de longitud. Otro oligonucleótido que comprende CpG preferido comprende uno o más, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más, CpG de clase A. Los CpG de clase A estimulan la producción de grandes cantidades de interferones de tipo I, especialmente IFN α , inducen la maduración de pDC, y/o son potentes activadores de las células NK a través de la señalización indirecta de citoquinas. Un oligonucleótido CpG de clase A preferido comprende uno o más de una secuencia poli G en el extremo 5', el extremo 3', o ambos, una secuencia de palíndromo interno, uno o más dinucleótidos GC dentro del palíndromo interno, y un esqueleto parcialmente fosforotioado, preferiblemente de 7 a 10 bases fosforotioadas en uno o ambos extremos.

[0029] En una forma de realización preferida, R es un grupo orgánico que comprende un péptido y un ácido nucleico, preferiblemente un péptido y un oligonucleótido según lo descrito anteriormente. En este tercer aspecto de la invención, el compuesto según la invención se denomina conjugado de péptido/ácido nucleico, preferiblemente conjugado de péptido/oligonucleótido. En este sentido, el ácido nucleico se acopla al péptido, ya sea directamente o a través de un enlazador tal y como se describe en este documento, que a su vez se acopla al compuesto según la fórmula (1). En una forma de realización preferida, el ácido nucleico se acopla a R⁴ o R⁵, preferiblemente a R⁴ del péptido (modificado) SK_m representado por la fórmula (2), ya sea directamente o a través de un enlazador, tal y como se describe en este documento. Alternativamente, el ácido nucleico se puede acoplar a la parte K_m del péptido SK_m, preferiblemente el péptido SK₄, ya sea directamente o a través de un enlazador, tal y como se describe en este documento.

[0030] En una forma de realización especialmente preferida, el ácido nucleico se acopla al residuo de lisina terminal del péptido SK_m, preferiblemente el péptido SK₄, ya sea directamente o a través de un enlazador como se describe en este documento. En este sentido, el enlazador es preferiblemente un enlazador que contiene seis átomos de carbono.

[0031] La preparación de conjugados de péptido/ácido nucleico es bien conocida en la técnica, por ejemplo, a partir de Carter y LeBean, J. Nucleic Acids, 2011 (doi:10.4061/2011/926595).

[0032] En una cuarta forma de realización, R es un grupo orgánico que comprende uno o más anticuerpos. A este respecto, el compuesto según la invención se denomina conjugado de anticuerpo. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo conocido por el experto en la materia. Los anticuerpos preferidos se seleccionan de la lista que consiste en 1) anticuerpos dirigidos contra moléculas diana específicas en la superficie de las células cancerosas: antígenos de diferenciación como CD19, CD20, CD30, antígenos sobreexpresados como HER-2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); 2) anticuerpos dirigidos contra las moléculas de superficie de las células T, como el receptor de IL-2, el receptor de IL-7, el receptor de IL-15, con el objetivo de eliminar un subconjunto de células T que causan enfermedades autoinmunes o que participan en la inmunorregulación, como las células T reguladoras no activadas.

[0033] El anticuerpo puede acoplarse al compuesto según la fórmula (1) tal y como se ha descrito anteriormente para los ácidos nucleicos. Como tal, el anticuerpo puede acoplarse directamente o a través de un enlazador como se describe en este documento.

[0034] Alternativamente, el anticuerpo puede acoplarse a un conjugado de péptido como se describe anteriormente, preferiblemente a R⁴ del péptido SK_m (modificado) representado por la fórmula (2), ya sea directamente o a través de un enlazador como se describe en este documento. En dicha quinta forma de realización, R es un grupo orgánico que comprende un péptido y un anticuerpo. A este respecto, el compuesto según la invención se denomina conjugado de péptido/anticuerpo. En este sentido, el anticuerpo se acopla al péptido, ya sea directamente o a través de un enlazador como se describe en el presente documento, que a su vez se acopla al compuesto según la fórmula (1). En una forma de realización preferida, el anticuerpo se acopla a R⁴ o R⁵, preferiblemente a R⁴ del péptido SK_m (modificado) representado por la fórmula (2), ya sea directamente o a través de un enlazador, como se describe en este documento. Alternativamente, el anticuerpo puede acoplarse a la parte K_m del péptido SK_m, preferiblemente el péptido SK₄, ya sea directamente o a través de un enlazador, como se describe en este documento.

[0035] En una forma de realización especialmente preferida, el anticuerpo se acopla al residuo de lisina terminal del péptido SK_m, preferiblemente el péptido SK₄, ya sea directamente o a través de un enlazador, como se describe en este documento. En este sentido, el enlazador es preferiblemente un enlazador que contiene seis átomos de carbono.

[0036] Los compuestos preferidos según la invención están representados por la fórmula (1), en la que R¹ y R² son cada uno independientemente un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 17 átomos de carbono, n es de 11 a 18 inclusive, Y es azufre, X es O y R es un grupo orgánico que comprende uno o más péptidos, uno o más ácidos nucleicos, uno o más anticuerpos o combinaciones de estos. Dicho de otro modo, los compuestos

preferidos según la invención son los conjugados de péptido, los conjugados de ácido nucleico, los conjugados de péptido/ácido nucleico, los conjugados de anticuerpo o los conjugados de péptido/anticuerpo, como se ha descrito anteriormente. Son especialmente preferidos los conjugados de péptido, los conjugados de péptido/ácido nucleico o los conjugados de péptido/anticuerpo, como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, se prefiere especialmente que R sea un grupo orgánico que comprenda uno o más péptidos y, opcionalmente, uno o más ácidos nucleicos o uno o más anticuerpos.

[0037] El compuesto según la invención puede ser una mezcla de epímeros R y S o, de manera adecuada, el epímero R en el C-2 del grupo 2-(OC(O)R²)-3-(OC(O)R¹)propilo.

[0038] La invención también se dirige a un proceso para preparar los nuevos compuestos mediante un protocolo estándar de síntesis de péptidos en fase sólida, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar R-H, que está opcionalmente inmovilizado y/o protegido en la cadena lateral;
- (b) acoplar el bloque de construcción de cisteína sustituida Fmoc-(S-(2-(OC(O)R²)-3-(OC(O)R¹))propil)-Cys-OH a R-H;
- (c) escindir el grupo Fmoc del extremo N-terminal; y
- (d) tratar el péptido resultante con alquilisocianato o alquilisotiocianato H-(CH₂)_n-N=C=X.

[0039] En este proceso, R, R¹, R², X y n se definen como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, el bloque de construcción de cisteína sustituido es Fmoc-Pam₂-Cys-OH, por lo tanto, siendo R¹ y R² grupos alquilo lineales que tienen 15 átomos de carbono. En una forma de realización preferida, el proceso es para preparar los conjugados peptídicos según la invención e implica las siguientes etapas:

- (a) síntesis de péptidos en fase sólida, obteniendo así un péptido R-H inmovilizado y con cadena lateral protegida,
- (b) acoplamiento de Fmoc-(S-(2-(OC(O)R²)-3-(OC(O)R¹))propil)-Cys-OH, preferiblemente Fmoc-Pam₂-Cys-OH con el péptido R-H inmovilizado y protegido en la cadena lateral obtenido en la etapa (a),
- (c) escisión del grupo Fmoc N-terminal del resto Pam₂Cys
- (d) reacción del producto liberado por Fmoc de la etapa (c) con un alquilisocianato o alquilisotiocianato H-(CH₂)_n-N=C=X, preferiblemente alquilisocianato H-(CH₂)_n-N=C=O,
- (e) realización de una desprotección mediada por ácido y escisión de la fase sólida del producto de la etapa (d), y
- (f) realización de una purificación por HPLC de RP.

[0040] El proceso anterior se ilustra en la Figura 2 y a continuación para la síntesis de U-Pam-14 y U-Pam-12. La figura 2 describe la síntesis en fase sólida de los compuestos objetivo U-Pam-14 y U-Pam-12, en la que los siguientes términos se definen como:

TentaGel S RAM es un copolímero funcionalizado de poliestireno y polietilenglicol provisto de un enlazador Rink-amida (una fase sólida común para la síntesis de péptidos)
 NHBoc es un grupo amino protegido con terc-butiloxycarbonilo
 tBu es terc-butilo
 Fmoc-Pam₂Cys-OH es fluorenilmetiloxycarbonil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]-L-cisteína
 PyBOP es (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio; un reactivo activador de fosfonio comúnmente utilizado en la química de péptidos)
 DIPEA es diisopropiletilamina, una base orgánica comúnmente utilizada en la química de péptidos
 TFA es ácido trifluoroacético
 NMP es N-metilpirrolidona, un disolvente
 DCM es diclorometano, un disolvente

[0041] Se conoce la síntesis de péptidos en fase sólida de la etapa (a) y, por ejemplo, se describe en Dick, F. Peptide Synthesis Protocols. En: M.W. Pennington y B. M. Dunn (eds.) Methods in Molecular Biology, Vol. 35, pp. 63-72. Totowa: Humana Press Inc., 1994. En la etapa (a), el péptido 1 inmovilizado y protegido en la cadena lateral se ensambla a partir de la resina TentaGel S equipada con un enlazador de amida Rink (Tentagel S RAM en el Esquema 1). La síntesis, como se ilustra, se realiza adecuadamente de forma completamente automatizada en el sintetizador de péptidos ABI 433A aplicando química Fmoc/OtBu con HCTU como reactivo de acoplamiento y DIPEA como base. Debe entenderse que también pueden usarse otros sintetizadores de péptidos conocidos en la técnica. Tras la escisión final con Fmoc utilizando, por ejemplo, una piperidina al 20 % en NMP, la resina peptídica (1) se retira adecuadamente del instrumento, se lava con DCM y se seca. En la etapa (b) el Fmoc-Pam₂Cys-OH se acopla adecuadamente de forma manual a la resina peptídica 1 para dar una resina peptídica 2 totalmente protegida. En esta etapa de acoplamiento se utiliza el reactivo de acoplamiento de fosfonio PyBOP y la base (DIPEA) se añade adecuadamente en dos porciones para evitar reacciones secundarias catalizadas por la base. Después de la escisión mediada por piperidina del grupo Fmoc en la etapa (c), la resina se lava adecuadamente con NMP y el N-lipohexapéptido inmovilizado resultante con el grupo amino N-terminal libre se trató en la etapa (d) con isocianato de tetradecilo en mezcla de DCM/NMP durante la noche para dar UPam-14

inmovilizado y completamente protegido (3). El producto se escindió en la etapa (e) de la resina con la eliminación concomitante de los grupos protectores de la cadena lateral mediante acidólisis con TFA al 95 % adecuadamente en presencia de H₂O y TIS como captadores de cationes. Posteriormente, en la etapa (f), la purificación por HPLC de RP en la fase C₄ y la liofilización proporcionaron UPam-14 puro (5) como un sólido blanco. Se puede emplear el mismo protocolo a partir de la resina 2 para la preparación de UPam-12 (6), excepto porque se usa isocianato de dodecilo en lugar de isocianato de tetradecilo en la etapa de la introducción de la cadena lipófila N-terminal conectada con urea al lipohexapéptido inmovilizado.

[0042] La síntesis anteriormente descrita para el conjugado de péptido se puede adaptar para proporcionar los otros conjugados de acuerdo con la invención, como se conoce en la técnica. Como tal, el péptido R-H puede reemplazarse por R-H, donde R es un grupo orgánico que comprende uno o más ácidos nucleicos, uno o más anticuerpos o combinaciones de estos con péptidos. En otra forma de realización, los conjugados de péptido se preparan como se ha descrito antes, y posteriormente se conjugan con uno o más ácidos nucleicos o uno o más anticuerpos, obteniendo así conjugados de péptido/ácido nucleico o conjugados de péptido/anticuerpo. Dichos métodos de conjugación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Carter y LeBean, J. Nucleic Acids, 2011 (doi:10.4061/2011/926595).

[0043] Los compuestos según la invención descritos anteriormente se usan adecuadamente como parte de un medicamento o vacuna. Por lo tanto, la invención se dirige a dicho compuesto o a una composición que comprende un compuesto según la invención para su uso como medicamento, preferiblemente un medicamento para tratar una enfermedad o afección como se define en el presente documento. Más preferiblemente, la invención se dirige a un compuesto o una composición que comprende un compuesto según la invención para potenciar una reacción inmunitaria innata mediada por TLR2 en un paciente, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. El compuesto se puede usar en una denominada monoterapia en la que, en un tratamiento independiente, se estimula el sistema inmunitario existente, por ejemplo, para la administración local en el área de drenaje linfático de un tumor. Otras aplicaciones independientes del compuesto según la invención, como se describe anteriormente, son el tratamiento de daños o enfermedades del sistema nervioso central, como la regeneración de axones de los nervios (ópticos), preferiblemente mediante inyección en el ojo, y el tratamiento de isquemia, como la isquemia del corazón o cerebro u otros órganos preferiblemente por inyección sistémica. Otra aplicación independiente es el tratamiento de infecciones, como infecciones virales, bacterianas, fúngicas, protozoarias y parasitarias, como la leishmaniasis visceral y la endoftalmitis visceral.

[0044] En aplicaciones independientes, el compuesto según la invención se puede aplicar en forma de solución en forma líquida, suspensión o emulsión, crema, espray o cualquier otra formulación conocida por el experto en la materia. Para el tratamiento de la isquemia y la regeneración de axones, el compuesto según la invención se encuentra preferiblemente en una formulación inyectable farmacéuticamente aceptable.

[0045] En un aspecto, un compuesto según la invención se usa en un método para el tratamiento de una enfermedad o afección según lo definido en el presente documento.

[0046] Un compuesto ya puede comprender un antígeno y/u otro compuesto como un anticuerpo, un ácido nucleico como un polinucleótido y un oligonucleótido, según lo definido en el presente documento. Como alternativa o en combinación con una forma de realización anterior, una composición que comprende un compuesto como se identifica en el presente documento puede comprender además un antígeno y/u otro compuesto, como un anticuerpo, un ácido nucleico como un polinucleótido y un oligonucleótido, como se define en el presente documento, como una molécula separada. Por lo tanto, la invención también se dirige a un compuesto que comprende un antígeno y/u otro compuesto, como un anticuerpo, un ácido nucleico como un polinucleótido y un oligonucleótido y/o una composición que comprende dicho compuesto o una composición que comprende un compuesto y un antígeno y/u otro compuesto, tal como un anticuerpo, un ácido nucleico, tal como un polinucleótido y un oligonucleótido, como molécula separada para su uso como medicamento, preferiblemente como una composición de vacuna preventiva o terapéutica. En particular, la invención se dirige a una composición de vacuna que comprende el compuesto según la invención como adyuvante y al menos un antígeno y/u otro compuesto, tal como un anticuerpo, un ácido nucleico, tal como un polinucleótido y un oligonucleótido, donde el antígeno u otro compuesto puede estar presente como un compuesto separado o acoplado al compuesto según la invención, como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, el antígeno u otro compuesto forma parte del compuesto según la invención, donde el antígeno u otro compuesto se acopla al compuesto adyuvante descrito anteriormente. Dicho enlace tiene la ventaja de que, en uso, se consigue una respuesta inmunitaria potenciada mediante la estimulación simultánea de células que presentan antígenos, en particular células dendríticas, que internalizan, metabolizan y presentan antígenos.

[0047] Por consiguiente, se proporciona un método para la inducción, mantenimiento y/o potenciación (refuerzo) de una respuesta inmunitaria en un sujeto contra un antígeno y/o para la prevención, retraso y/o tratamiento de una enfermedad o afección asociada con dicho antígeno en un sujeto donde se administra a dicho sujeto un compuesto o una composición según lo definido en el presente documento. Cada característica de dicho método se identifica en el presente documento.

[0048] El antígeno puede ser cualquier material que pueda inducir, mantener o potenciar una respuesta inmunitaria por parte del sistema inmunitario de un sujeto. Un sujeto preferido es un animal. Preferiblemente, un animal es un mamífero, preferiblemente un ser humano. Debe entenderse que dicha respuesta inmunitaria inducida o potenciada es específica para dicho antígeno. Una respuesta inmunitaria específica de antígeno es preferiblemente una respuesta de células T o una respuesta inmunitaria celular. Por lo tanto, dicho antígeno comprende preferiblemente un epítipo de células T: un epítipo T colaborador y/o un epítipo CTL.

[0049] Un antígeno puede ser una biomacromolécula de longitud completa o un fragmento de la misma. El antígeno puede ser, por ejemplo, material sintético, subunidades purificadas de una proteína, un fragmento de proteína, un extracto de una proteína, un péptido, una molécula de ADN, una molécula de ADNc, una molécula de ARN, un oligonucleótido, un oligosacárido, una composición cruda, preferiblemente de origen biológico, tal como un microbio completo, un lisado, sonificado o fijado bacteriano, de levadura o fúngico o una mezcla de estos. En una forma de realización, cuando un antígeno es un péptido, dicho péptido puede tener de 6 a 60 aminoácidos, o 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 aminoácidos o más. En dicha forma de realización, dicho péptido es, por lo tanto, distinto de la proteína de la que se deriva. Un antígeno puede ser un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno parasitario. Un antígeno puede derivar de un agente infeccioso. Dicho agente infeccioso puede provocar cáncer y/o una afección premaligna. Preferiblemente, el antígeno es un péptido, oligonucleótido u oligosacárido sintetizado químicamente o producido enzimáticamente y, más preferiblemente, se ha obtenido después de la purificación. Un antígeno también puede estar en forma de un ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica dicho antígeno o fragmento del mismo. Las moléculas de ARN o ADN pueden ser ADN "desnudo", preferiblemente comprendido en vesículas o liposomas, o puede estar comprendido en un vector. El vector puede ser cualquier vector de ADN o ARN (recombinante) conocido en la técnica, y preferiblemente es un plásmido; donde dicho ADN que codifica dicho antígeno está ligado operativamente a secuencias reguladoras que confieren expresión y traducción de los mensajeros codificados. El vector también puede ser cualquier virus de ADN o ARN, como, entre otros, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), un retrovirus, un lentivirus, el virus Vaccinia Ankara modificado (MVA) o el virus de la viruela aviar, o cualquier otro vector viral capaz de conferir expresión de polipéptidos en un sujeto seleccionado. Los vectores de ADN pueden ser no integrantes, como los vectores que se replican episómicamente, o pueden ser vectores que se integran en el genoma del huésped mediante integración aleatoria o mediante recombinación homóloga.

[0050] El antígeno se selecciona preferiblemente como componente único o múltiple del grupo que consiste en una proteína de un patógeno, una proteína recombinante, un péptido, un hapteno, un polisacárido, una glicoproteína, un lipopolisacárido, una molécula de ADN, una molécula de ADNc, un polinucleótido de ARN (todos polinucleótidos), una célula cancerosa y un microorganismo. Una composición preferida comprende un compuesto según la invención como adyuvante y al menos un antígeno viral o bacteriano, por ejemplo TBC; tétanos y *Helicobacter Pylori*, o antígeno parasitario o antígeno tumoral adecuado para tratar o prevenir infecciones víricas, parasitarias o bacterianas o tratar o prevenir el cáncer, o comprende un compuesto según la invención, donde el grupo R comprende un antígeno viral o bacteriano, por ejemplo TBC y tétanos, o antígeno parasitario o antígeno tumoral adecuado para tratar o prevenir infecciones víricas, parasitarias o bacterianas o para tratar o prevenir el cáncer.

[0051] Los antígenos virales adecuados son el antígeno del virus de la gripe, como, por ejemplo HA: antígeno de hemaglutinina o neuraminidasa; antígeno del virus del papiloma humano (VPH), tal como E2, E6, E7; antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), como, por ejemplo, GP120, GP140, GP160; antígeno del virus de la estomatitis vesicular, por ejemplo, glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular; antígeno de citomegalovirus (CMV); antígenos del virus de la hepatitis, como por ejemplo hepatitis A (HAV), B (HBV), C (HCV), D (HDV) y G (HGV): L-HBsAg, S-HBsAg, M-HBsAg, pre S; antígeno del virus sincicial respiratorio (RSV); antígeno del virus SV40, como T grande, T pequeña; antígeno de EBV, como EBNA, antígeno del virus del sarcoma de Kaposi (KSV), antígeno del virus linfotrópico T humano-1 (HTLV-1), antígeno del virus de células de Merkel (MCV) o antígeno del virus del herpes simple.

[0052] Las cepas de VPH de las que deriva el antígeno o péptido utilizado es preferiblemente un serotipo de VPH de alto riesgo, como los serotipos 16, 18, 31, 33 o 45, más preferiblemente del serotipo 16, 18, 31 o 33, más preferiblemente del serotipo 16 o 18, de los cuales 16 es el más preferido. La secuencia de aminoácidos de las proteínas E2, E6 y E7 del serotipo 16 de VPH se representa en SEQ ID NO 1-3, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las proteínas E2, E6 y E7 del serotipo 18 de VPH se representa en SEQ ID NO 4-6, respectivamente.

[0053] Los antígenos de parásitos adecuados pueden derivarse de protozoos, nematodos, trematodos o cestodos, tales como *Cryptosporidium hominis* o *parvum*; *Schistosoma haematobium*, *mansoni* o *japonicum*; *Plasmodium falciparum*, *malariae*, *vivax* u *ovale*; *Leishmania major*, *tropica*, *aethiopica*, *mexicana*, *donovani*, *infantum* o *braziliensis*; *Toxoplasma gondii*.

[0054] Los antígenos bacterianos adecuados pueden ser antígenos derivados de *Mycobacterium Tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus Aureus*, *Vibrio cholera*, *Neisseria meningitides*.

[0055] Los antígenos tumorales son antígenos expresados en células tumorales. Se dice preferiblemente que este grupo de antígenos está asociado con el cáncer en los siguientes casos ilustrativos y no limitativos: antígenos derivados de proteínas que se expresan únicamente en tumores y no solo en una cantidad limitada en células adultas normales, antígenos derivados de proteínas que se expresan en exceso en tumores en comparación con células adultas normales, antígenos derivados de proteínas que se han mutado en tumores, antígenos que se expresan de manera aberrante en un tejido determinado de pacientes con cáncer en comparación con el tejido correspondiente de un sujeto que no tiene cáncer. Un antígeno expresado de forma aberrante puede ser expresado *de novo* en un tejido donde normalmente no se expresa. Un antígeno mutado puede ser una variante de empalme. Un antígeno mutado puede producirse además como una proteína de fusión aberrante como resultado de una translocación.

Ejemplos de antígenos que se sabe que están asociados con el cáncer son p53, MDM-2, HDM2 y otras proteínas que desempeñan un papel en la vía p53, moléculas como survivina, telomerasa, citocromo P450 isoforma 1B1, Her-2/neu y CD19 y todas las llamadas proteínas caseras.

[0056] Los antígenos adecuados incluyen antígenos derivados de agentes infecciosos que causan enfermedades tales como cánceres y/o afecciones premalignas. Ejemplos de dichos agentes infecciosos son el VPH, que causa enfermedades como verrugas genitales, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pene, cáncer de vulva, cáncer anal, cáncer nasofaríngeo, CIN, VIN, PIN, VAIN y AIN, HCV y HBV, que están implicados en el carcinoma de hígado, SV40, que está implicado en el mesotelioma, HTLV-1, que está implicado en la leucemia/linfoma de células T, el virus de células de Merkel, que está implicado en el carcinoma de células de Merkel y KSV, que está implicado en el sarcoma de Kaposi.

[0057] Las composiciones de vacunas anteriores pueden usarse como una composición de vacuna preventiva (es decir, profiláctica) o terapéutica (es decir, curativa) para infecciones o enfermedades agudas o persistentes causadas por ellas.

[0058] La composición de vacuna también se usa preferiblemente como una composición de vacuna preventiva o terapéutica diseñada para provocar respuestas inmunitarias específicas contra una enfermedad o afección determinada con la que dicho antígeno está asociado o vinculado. Una enfermedad o afección preferida es un cáncer. Un cáncer puede ser un cáncer no viral o un cáncer viral tal como un cáncer inducido por VPH. Una composición de vacuna preferida comprende un compuesto según la invención como adyuvante y al menos un antígeno tumoral asociado a cáncer no viral o comprende un compuesto según la invención, donde el grupo R comprende un antígeno tumoral asociado a cáncer no viral. El cáncer por tratar o prevenir puede ser un cáncer de cerebro, un carcinoma de células renales, un melanoma, una leucemia, un cáncer de pulmón, un cáncer de estómago, un cáncer de esófago, un cáncer de tiroides, un cáncer de páncreas, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un cáncer de ovario, un cáncer de útero, un cáncer de testículo, un colangioma, un cáncer de hígado, un cáncer de colon, un cáncer gastrointestinal, un cáncer de vejiga o un cáncer de recto. Además, las lesiones premalignas pueden tratarse o prevenirse mediante el uso de la composición de vacuna. Las lesiones premalignas son lesiones que han sufrido cambios genéticos que predisponen a las células a convertirse en células cancerosas. Estas lesiones premalignas pueden convertirse en cánceres con el tiempo. Ejemplos de antígenos tumorales adecuados son gp100, MART-1, MAGE-1, BAGE, GAGE, HAGE, tirosinasa, CEA (antígeno embrionario de cáncer), p53, PSA (antígeno prostático específico), PSMA (antígeno prostático específico de membrana); PRAME, HER2/neu, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, NY-ESO-1, MUC-1, SART-1 o SART-3, XAGE-1B, tirosinasa, TERT (telomerasa transcriptasa inversa), WT1, Survivin-2B, gp75, MDM2, telomerasa, fetoproteína al[rho]h-1, CA125, CA15-3, CA19-9, G250, HER2, BCR-ABL, Ras, PML-RAR α , PR1, SSX-2, HSP70 o un análogo peptídico derivado de cualquiera de los antígenos virales, no virales, tumorales, bacterianos o parasitarios mencionados anteriormente.

[0059] Un antígeno preferido comprende un péptido que comprende un epítipo de células T, es decir, epítipos de células T CD4 y/o CD8 que se derivan de cualquiera de los antígenos virales, no virales, tumorales, bacterianos o parasitarios antes mencionados, pero preferiblemente de las oncoproteínas E6 y E7 específicas del virus del papiloma (VPH) de alto riesgo, como se describe en los documentos WO02/070006 y WO2008/147187.

[0060] Un péptido preferido que se origina a partir del serotipo 16 E6 de VPH, como se identificó anteriormente por SEQ ID NO: 2, se selecciona del grupo que consiste en un péptido que comprende, consiste en o se superpone con:
E6 1-32, E6 19-50, E6 41-65, E6 55-80, E6 71-95, E6 85-109, E6 91-122, E6 109-140 y E6 127-158.

[0061] Un péptido preferido que se origina a partir del serotipo 16 E7 de VPH, como se identificó anteriormente por SEQ ID NO: 3, se selecciona del grupo que consiste en un péptido que comprende, consiste en o se superpone con:
E7 1-35, E7 22-56, E7 43-77 y E7 64-98.

[0062] Un péptido preferido que se origina a partir del serotipo 16 E6 o E7 del VPH, como se identificó anteriormente por SEQ ID NO: 2 o 3, se selecciona del grupo que consiste en un péptido que comprende, consiste en o se superpone con:

E6 1-32, E6 19-50, E6 41-65, E6 55-80, E6 71-95, E6 85-109, E6 91-122, E6 109-140, E6 127-158, E7 1-35, E7 22-56, E7 43-77 y E7 64-98. La invención también abarca un péptido que se origina en el VPH según lo identificado en estos párrafos anteriores y que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más aminoácidos adicionales en total derivados de las posiciones correspondientes de la proteína del VPH E6 o E7. Estos aminoácidos adicionales pueden estar presentes en el terminal N y/o C de dicho péptido. Sin embargo, dichos péptidos son preferiblemente distintos de una proteína E6 o E7 de longitud completa.

[0063] En otra forma de realización, un péptido procedente de VPH tiene una longitud de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos y preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos contiguos que comprende un epítipo que se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos 11-32 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 13-22 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 29-38 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 37-68 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 52-61 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 51-72 de una proteína VPH6, aminoácidos 55-86 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 61-82 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 71-92 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 73-105 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 91-112 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 101-122 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 121-142 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 129-138 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 137-146 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 149-158 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 1-32 de una proteína E7 de VPH, aminoácidos 11-19 de una proteína E7 de VPH, aminoácidos 21-42 de una proteína E7 de VPH, aminoácidos 51-72 de una proteína E7 de VPH, aminoácidos 76-86 de una proteína E7 de VPH; aminoácidos 13-22 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 29-38 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 52-61 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 129-138 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 137-146 de una proteína E6 de VPH, aminoácidos 149-158 de una proteína E6 de VPH y aminoácidos 11-19 de una proteína E7 de VPH. Las proteínas E6 y E7 son preferiblemente de VPH16 o VPH18, como se identificó anteriormente por SEQ ID NO: 2, 3.

[0064] Cada uno de los péptidos o epítopos de VPH identificados en el presente documento se identifica proporcionando el primer aminoácido correspondiente y el último aminoácido correspondiente, según lo identificado en la proteína E6 o E7 correspondiente.

[0065] Un antígeno preferido comprende un péptido que comprende epítopos de células T CD4 y/o CD8 que se derivan del antígeno tumoral no viral p53, como se describe en el documento WO2008/147186.

[0066] La secuencia de aminoácidos de la p53 humana se representa en SEQ ID No.7. Preferiblemente, la longitud de la secuencia de aminoácidos contiguos derivada de la proteína p53 no es superior a 45 aminoácidos y comprende al menos 19 aminoácidos contiguos derivados de la secuencia de aminoácidos de p53. La longitud de la secuencia de aminoácidos contiguos derivada de p53 comprendida dentro del péptido, es preferiblemente 19-45, 22-45, 22-40, 22-35, 24-43, 26-41, 28-39, 30-40, 30-37, 30-35, 32-35, 33-35, 31-34 aminoácidos. En otra forma de realización preferida, un péptido comprende 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 o más de 45 residuos de aminoácidos contiguos de un p53, preferiblemente de p53 humano según lo identificado anteriormente por SEQ ID NO:7. Por lo tanto, el experto en la materia entenderá que un péptido es distinto de una proteína p53, preferiblemente de la p53 humana como se identificó anteriormente por SEQ ID NO:7.

En una forma de realización preferida, cuando la proteína es p53 humana, como se identificó anteriormente por SEQ ID NO: 7, el péptido se selecciona de los siguientes péptidos, cada péptido comprende o consiste en o se superpone con cualquiera de las siguientes secuencias: p53 86-115, p53 102-131, p53 142-171, p53 157-186, p53 190-219, p53 224-248, p53 225-254, p53 257-286, p53 273-302, p53 305-334, p53 353-382 y p53 369-393.

[0067] Aún más preferiblemente, cuando la proteína es p53 humana, como se identificó anteriormente por SEQ ID NO: 7, el péptido se selecciona de los siguientes péptidos, cada péptido comprende o consiste en o se superpone con cualquiera de las siguientes secuencias: p53 142-171, p53 157-186, p53 190-219, p53 224-248, p53 225-254, p53 241-270, p53 257-286 y p53 273-302.

[0068] Cada uno de los péptidos p53 identificados en el presente documento se identifica proporcionando el primer aminoácido correspondiente y el último aminoácido correspondiente como se identifican en la proteína p53 humana correspondiente, tal y como se ha identificado anteriormente por SEQ ID NO:7.

[0069] Los antígenos preferidos incluyen al menos dos o al menos tres de los siguientes péptidos p53: p53 142-171, p53 157-186, p53 190-219, p53 224-248, p53 225-254, p53 241-270, p53 257-286 y p53 273-302, p53 305-334, p53 353-382 y p53 369-393. Los antígenos más preferidos incluyen, además, p53 86-115 y/o p53 102-131.

[0070] Un antígeno preferido comprende un péptido que comprende epítopos de células T CD4 y/o CD8 que se derivan del antígeno tumoral no viral PRAME, como se describe en el documento WO2008/118017.

[0071] Dicho péptido puede comprender una secuencia de aminoácidos contiguos seleccionada de la secuencia de 509 aminoácidos de la proteína PRAME humana, representada en SEQ ID No. 8, donde el péptido comprende preferiblemente al menos un epítipo de células Th HLA clase II y preferiblemente también al menos un epítipo de células T citotóxicas HLA clase I. Preferiblemente, la longitud de la secuencia de aminoácidos contiguos de la proteína PRAME humana, preferiblemente identificada por SEQ ID NO: 8, comprendida dentro del péptido es 19-45, incluso más preferiblemente 30-40 aminoácidos, incluso más preferiblemente 30-35 y lo más preferiblemente 33-35 aminoácidos. Los péptidos más preferidos comprenden una secuencia de aminoácidos contiguos de la proteína PRAME humana identificada preferiblemente por SEQ ID NO: 8 y seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos, aa. 19-53, aa. 47-79, aa. 69-101, aa. 80-114, aa. 94-126, aa. 112-144, aa. 133-166, aa. 173-207, aa. 190-223, aa. 234-268, aa. 247-279, aa. 262-294, aa. 284-316, aa. 295-327, aa. 353-387, aa. 399-431, aa. 417-450, aa. 447-480, aa. 477-509. La divulgación también abarca un péptido que se origina en PRAME, tal y como se identifica en este párrafo, y que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más aminoácidos adicionales en total derivados de las posiciones correspondientes de la proteína PRAME correspondiente. Estos aminoácidos adicionales pueden estar presentes en el terminal N y/o C de dicho péptido. Sin embargo, tales péptidos son preferiblemente distintos de una proteína PRAME de longitud completa identificada por SEQ ID NO:8.

[0072] Cada uno de los péptidos PRAME identificados en el presente documento se identifica proporcionando el primer aminoácido correspondiente y el último aminoácido correspondiente como se identifica en la proteína PRAME humana correspondiente.

[0073] Un antígeno preferido comprende péptidos que comprenden epítopos de células T CD4 y/o CD8 que se derivan del antígeno tumoral no viral NY-ESO-1 como se describe en el documento WO98/14464.

[0074] Un antígeno preferido comprende péptidos que comprenden epítopos de células T CD4 y/o CD8 que se derivan del antígeno tumoral no viral XAGE-1B como se describe en los documentos US6,630,574, US6,504,010, US7,425,607, US6,686,447.

[0075] Un antígeno preferido comprende un péptido que comprende epítopos de células T CD4 y/o CD8 que se derivan del antígeno tumoral no viral PSMA como se describe en el documento EP11172914.1.

[0076] Dicho péptido puede comprender una secuencia de aminoácidos contiguos seleccionada de la secuencia de 750 aminoácidos de la proteína PSMA humana, representada en SEQ ID No. 9, donde el péptido comprende preferiblemente al menos un epítipo de células Th HLA clase II y preferiblemente también al menos un epítipo de células T citotóxicas HLA clase I. Preferiblemente, la longitud de la secuencia de aminoácidos contiguos de la proteína PSMA humana, preferiblemente identificada por SEQ ID NO: 9, comprendida dentro del péptido, es 19-45, incluso más preferiblemente 30-40 aminoácidos, incluso más preferiblemente 30-35 y lo más preferiblemente 33-35 aminoácidos. Los péptidos más preferidos comprenden una secuencia de aminoácidos contiguos de la proteína PSMA humana preferiblemente identificada por SEQ ID NO: 9 y seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos, aa. 3-35, aa. 31-65, aa. 53-88, aa. 94-130, aa. 156-188, aa. 207-242, aa. 253-289, aa. 302-333, aa. 341-371, aa. 393-426, aa. 432-464, aa. 451-485, aa. 469-500, aa. 507-539, aa. 547-579, aa. 565-600, aa. 603-636, aa. 648-681, aa. 679-713, aa. 716-749. La invención también abarca un péptido que se origina a partir de PSMA como se identifica en este párrafo y que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más aminoácidos adicionales en total derivados de las posiciones correspondientes de la proteína PSMA correspondiente. Estos aminoácidos adicionales pueden estar presentes en el terminal N y/o C de dicho péptido. Sin embargo, tales péptidos son preferiblemente distintos de una proteína PSMA de longitud completa identificada por SEQ ID NO:9.

[0077] Cada uno de los péptidos de PSMA identificados en el presente documento se identifica proporcionando el primer aminoácido correspondiente y el último aminoácido correspondiente como se identifica en la proteína PSMA humana correspondiente.

[0078] Un antígeno preferido comprende péptidos que comprenden epítopos de células T CD4 y/o CD8 que se derivan de los antígenos no virales derivados de *Mycobacterium tuberculosis* según lo descrito en WO06/04389.

[0079] Un antígeno derivado de *Mycobacterium tuberculosis* se selecciona preferiblemente del grupo de polipéptidos que comprende proteínas codificadas por regulón NRP / latencia (DosR) de *Mycobacterium* que son capaces de provocar una respuesta inmune *in vivo* en vertebrados que tienen una infección por *Mycobacterium*. Más preferiblemente, tal antígeno es del grupo de polipéptidos que comprende proteínas codificadas por regulón NRP / latencia (DosR) de *Mycobacterium* que son capaces de provocar una respuesta de IFN- γ en líneas de células T humanas, que consisten en Rv079, Rv0569, Rv0572c, Rv1733c, Rv1738, Rv1813c, Rv1996, Rv2007c (FdxA), Rv2029c (PfkB), Rv2030c, Rv2031c (HspX, Acr, homólogo de alfacristalina de 16 kDa), Rv2032, Rv2623, Rv2624c, Rv2626c, Rv2627c, Rv2628, Rv3126c, Rv3127, Rv3129, Rv3130c, Rv3131, Rv3132c, Rv3133c (DosR), Rv3134c, Rv0080, Rv1737c (NarK2), Rv1735c y Rv1736c (NarX). La nomenclatura Rv para antígenos micobacterianos y las secuencias de ADN y proteínas del regulón NRP/latencia (DosR) son bien conocidas en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en: <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/> o en

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez> (Número de acceso AL123456). La nomenclatura de Rv, tal como se usa en el presente documento, puede referirse a la secuencia de aminoácidos del antígeno o bien a la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno.

[0080] La longitud de la secuencia de aminoácidos contiguos derivada de la proteína de *Mycobacterium* es preferiblemente de no más de 45 aminoácidos y comprende al menos 19 aminoácidos contiguos derivados de la secuencia de aminoácidos de dicha proteína de *Mycobacterium*. La longitud de la secuencia de aminoácidos contiguos derivada de dicha proteína de *Mycobacterium* comprendida dentro del péptido, preferiblemente es 19-45, 22-45, 22-40, 22-35, 24-43, 26-41, 28-39, 30-40, 30-37, 30-35, 32-35, 33-35, 31-34 aminoácidos. En otra forma de realización preferida, un péptido comprende 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 o más de 45 residuos de aminoácidos contiguos de dicha proteína de *Mycobacterium*. La longitud de la secuencia de aminoácidos contiguos derivada de dicha proteína de *Mycobacterium* comprendida dentro del péptido puede ser la longitud de dicho péptido. Por lo tanto, el experto en la materia comprenderá que un péptido puede ser distinto de dicha proteína de *Mycobacterium*.

[0081] La divulgación también abarca un péptido que se origina a partir de la proteína identificada en este párrafo y que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más aminoácidos adicionales en total derivados de las posiciones correspondientes de la proteína correspondiente. Estos aminoácidos adicionales pueden estar presentes en el terminal N y/o C de dicho péptido. Sin embargo, dichos péptidos son preferiblemente distintos de una proteína de *Mycobacterium* de longitud completa.

[0082] El péptido puede comprender aminoácidos adicionales a los que se originan a partir de un antígeno o puede consistir o estar hecho completamente de una secuencia de aminoácidos que se origina a partir de dicho antígeno. La longitud de la secuencia de aminoácidos contiguos de uno de los antígenos definidos anteriormente comprendidos dentro del péptido, es preferiblemente al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 aminoácidos y/o preferiblemente no más de 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 60, 50, 45, 40, 35, 33 o 30 aminoácidos, más preferiblemente la longitud de la secuencia de aminoácidos contiguos de uno de los antígenos definidos anteriormente comprendidos dentro del péptido es de 19-45, incluso más preferiblemente 22-40 aminoácidos, incluso más preferiblemente de 30-35 y lo más preferiblemente de 33 a 35 aminoácidos. En otra forma de realización preferida, el péptido consta de cualquiera de las secuencias de aminoácidos contiguos del antígeno tal como se define en el presente documento, por lo que se entiende que no se añaden aminoácidos a ninguno de los extremos de la secuencia de aminoácidos contiguos del antígeno que no son contiguos con esta secuencia de aminoácidos en la secuencia del antígeno nativo. Estos péptidos se pueden sintetizar fácilmente y son lo suficientemente grandes para ser captados por células presentadoras de antígenos profesionales, procesados por el proteosoma y otras proteasas y peptidasas del sistema de procesamiento intracelular, y tienen la suficiente capacidad física y longitud para contener al menos un epítipo HLA de clase I y/o al menos un epítipo HLA de clase II. Opcionalmente, un péptido puede comprender extensiones N- o C-terminales, que pueden ser aminoácidos adicionales, aminoácidos modificados u otros grupos funcionales que pueden, por ejemplo, mejorar la biodisponibilidad, la captación celular, la orientación a las células T, el procesamiento y/o la solubilidad o comprenden o liberan sustancias inmunomoduladoras que proporcionan funciones adyuvantes o (co)estimuladoras.

[0083] Preferiblemente, se espera que el compuesto de la invención se comporte como un adyuvante. Un adyuvante se define en el presente documento como una molécula que es capaz de estimular el sistema inmunitario de tal manera que se provoca una respuesta inmunitaria, o un aumento de la misma, contra dicho antígeno cuando el antígeno se administra en combinación con el adyuvante (como un solo compuesto o como dos moléculas separadas según lo definido en el presente documento). Para analizar o evaluar la respuesta inmunitaria provocada específica de antígeno, dicha respuesta inmunitaria se compara con la respuesta inmunitaria inducida en presencia del antígeno sin el adyuvante o en presencia del antígeno con un adyuvante conocido. Un adyuvante conocido puede ser otro adyuvante de TLR2 identificado en la parte experimental como Pam3CysSK4. La inducción se evalúa en un sujeto o en células de un sujeto.

[0084] Sin pretender limitarse a ninguna teoría, se cree que un compuesto de la invención actúa a través de TLR2.

[0085] Una respuesta inmunitaria inducida o provocada puede ser una respuesta de células B y/o T. Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de células B, es decir, la producción de un anticuerpo dirigido específicamente contra dicho antígeno. Un anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo IgG. Dicha respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de células T. Dicha respuesta de células B y/o T puede detectarse midiendo la producción de anticuerpo y/o citoquina usando un ELISA según lo descrito en el ejemplo. Las citoquinas preferidas son IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, TNF α o IL-10.

[0086] En una forma de realización preferida, la detección de la respuesta inmune provocada específica de antígeno significa que dicha detección ocurre después de al menos una, diez, once, doce horas o más o después de al menos un día de administración de dicho adyuvante y antígeno, o al menos dos días, o al menos tres días,

o al menos cuatro días, o al menos cinco días, o al menos seis días, o al menos siete días, o al menos dos semanas, o al menos tres semanas, o al menos 4 semanas o más. La detección se evalúa en un sujeto o en células de un sujeto.

[0087] La respuesta inmunitaria provocada específica de antígeno significa preferiblemente un aumento detectable de una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno. Dicho aumento detectable puede evaluarse por comparación con la respuesta inmune inducida o provocada cuando el antígeno se usa solo o cuando dicho antígeno se usa con un adyuvante conocido. Un adyuvante conocido puede ser otro adyuvante de TLR2 identificado en la parte experimental (Pam3CysSK4). Un aumento detectable es preferiblemente un aumento de al menos el 5 % de la cantidad de una citoquina, como ya se ha identificado en el presente documento, o 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 150 %, 200 % o más después de al menos una, diez, once, doce horas o más o después de al menos un día de la administración de dicho adyuvante y antígeno, o al menos dos días, o al menos tres días, o al menos cuatro días o más. La detección se evalúa en un sujeto o en células de un sujeto.

[0088] La funcionalidad del compuesto de la invención también puede evaluarse según lo descrito en la parte experimental utilizando una célula que expresa TLR2.

[0089] Sorprendentemente, parece que el compuesto de la invención es capaz de inducir al menos una respuesta inmune similar o incluso más potente contra un antígeno determinado usando una dosis de dicho compuesto que es más baja que la dosis de adyuvante usada tradicionalmente. Inferior puede significar una dosis que es al menos 1 vez, al menos 10 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 150 veces o al menos 200 veces menor que la de un adyuvante clásico como Pam3CysSK4.

[0090] Asimismo, la composición de vacuna de la presente invención puede incluir, además del adyuvante y un antígeno, uno o más ingredientes efectivos que tengan un efecto igual o similar con ellos. Por ejemplo, la composición de vacuna según la invención puede comprender uno o más adyuvantes, además del adyuvante según la presente invención. Estos otros adyuvantes pueden mezclarse con la composición de vacuna según la invención o pueden administrarse por separado al mamífero o al ser humano por tratar. Ejemplos de otros adyuvantes adecuados para usar en combinación con el compuesto adyuvante según la invención son adyuvante de Montanide, tal como Montanide ISA-51 o Montanide ISA 720 (Seppic France), adyuvante de Freund o IFA, Resiquimod; imiquimod; Poli IC:LC (Hiltonol); ISCOMS; CpG y GLA; MPL. Otro adyuvante es un inhibidor de la adhesión de células T, más preferiblemente un inhibidor de un receptor de endotelina, como BQ-788 (Buckanovich RJ *et al.*, Ishikawa K, PNAS (1994) 91:4892). BQ-788 es N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L-gamma-metileucil-D-1-metoxicarbonilriptofanil-D-norleucina. Sin embargo, cualquier derivado de BQ-788 o compuesto BQ-788 modificado también está incluido dentro del alcance de esta invención.

[0091] La composición de vacuna también puede comprender compuestos como, por ejemplo, lípido A desintoxicado, CpG de grado clínico u otro agente o anticuerpo inmunomodulador apropiado, como anticuerpos agonistas de CD40 o bloqueantes de CTLA-4 o anticuerpos agonistas contra otros miembros de la familia de receptores de TNF, como OX40, CD27, 4-1-BB (CD137) o ligandos 4-1-BB y/o CD40, ligandos OX40 o fragmentos funcionales y derivados de estos, así como compuestos sintéticos con actividad agonista similar. Estos compuestos se pueden mezclar o conjugar con el compuesto según la invención y/o con el antígeno específico de la vacuna.

[0092] La composición de vacuna también puede incluir, además de los ingredientes efectivos mencionados anteriormente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración. El vehículo farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar o preparar mezclando más de un ingrediente seleccionado de un grupo que consiste en solución salina, agua esterilizada, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de dextrosa, solución de maltodextrosa, glicerol y etanol. Se pueden añadir otros aditivos generales como agente antioxidante, solución tampón, agente bacteriostático, etc. Para preparar soluciones inyectables como solución acuosa, suspensión y emulsión, se pueden agregar adicionalmente diluyentes, agentes dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes.

[0093] La formulación específica de la composición de vacuna de la presente invención, las formas de administración y el uso de excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica y, por ejemplo, se describen en Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 21.^a edición de 2005, Universidad de Ciencias de Filadelfia. Las composiciones de vacunas y los medicamentos de la invención se formulan preferiblemente para que sean adecuados para la administración intravenosa, subcutánea o intramuscular, aunque se pueden contemplar otras vías de administración, como la administración en las mucosas o la administración intradérmica y/o intracutánea, p. ej., por inyección o a través de un parche. En el presente documento, se prefiere la administración intradérmica.

[0094] En una forma de realización preferida, la composición de la vacuna se formula para que sea adecuada para la administración o aplicación intradérmica. La intradérmica es conocida por el experto en la materia. En el contexto de la invención, intradérmico es sinónimo de intracutáneo y se diferencia de subcutáneo. La aplicación

más superficial de una sustancia es epicutánea (sobre la piel), luego vendría una aplicación intradérmica (en o dentro de la piel), luego una aplicación subcutánea (en los tejidos justo debajo de la piel), luego una aplicación intramuscular (en el cuerpo del músculo).

[0095] La administración intradérmica de la composición de la vacuna es muy atractiva, ya que la inyección de la vacuna se realiza en el sitio de la enfermedad o lo más cerca posible del mismo, lo que da como resultado la activación local del ganglio linfático que drena la enfermedad, dando como resultado una activación local más intensa del sistema inmune. En una forma de realización preferida, la administración intradérmica se realiza directamente en el sitio de la lesión o enfermedad. En el presente documento, se entiende por lugar de la lesión el que está a menos de 5, 2, 1, 0,5, 0,2 o 0,1 cm del lugar de la lesión.

[0096] Además, una forma de realización preferida comprende la administración del antígeno y el compuesto adyuvante como parte de la composición de la vacuna en un vehículo de liberación lenta como aceite mineral (p. ej., Montanide ISA 51), partículas o estructuras a base de PLGA, partículas o estructuras a base de dextrano, partículas o estructuras a base de poliactivos, liposomas, virosomas. Preferiblemente, para la administración intradérmica, la composición de la vacuna se administra en una composición que comprende, además, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables e inmunológicamente inertes, p. ej., soluciones acuosas tamponadas con fuerza iónica fisiológica y/u osmolaridad (como, por ejemplo, PBS).

[0097] Además, se contempla que la administración de al menos una composición de vacuna de la invención pueda llevarse a cabo como una sola administración. También puede ser posible que los diversos compuestos activos de la vacuna se administren secuencialmente y/o utilizando diferentes vías o diferentes sitios de administración. Alternativamente, la administración de al menos una composición de vacuna puede repetirse si es necesario.

Definiciones

[0098] En el contexto de la invención, un antígeno puede definirse por un péptido. La presente invención también abarca cualquier péptido que se superponga con dicho péptido inicial. Superposición significa que la secuencia del péptido se superpone parcial o completamente con una secuencia determinada. Preferiblemente, superposición significa superposición parcial. Preferiblemente, parcial significa que la superposición es de uno o más aminoácidos en el extremo N y/o en el extremo C de la secuencia peptídica, más preferiblemente de dos o más aminoácidos en el extremo N y/o en el extremo C, o más. También se prefiere que la superposición sea de uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal y/o dos o más aminoácidos en el extremo C-terminal de la secuencia peptídica o viceversa. El experto en la materia comprenderá que la presente invención abarca todo tipo de superposiciones, siempre que el péptido obtenido muestre la actividad deseada según lo definido anteriormente en el presente documento.

[0099] En el contexto de la invención, un péptido se representa mediante una secuencia de aminoácidos.

[0100] En el contexto de la invención, una molécula de ácido nucleico está representada por una secuencia de ácido nucleico o de nucleótidos que codifica un péptido. Una molécula de ácido nucleico puede comprender una región reguladora.

[0101] Debe entenderse que cada molécula de ácido nucleico o proteína o péptido, según lo identificado en el presente documento por un Número de Identidad de Secuencia dado (SEQ ID NO), no se limita a esta secuencia específica según lo descrito.

[0102] A lo largo de esta solicitud, cada vez que se hace referencia a una secuencia de aminoácidos específica SEQ ID NO de un péptido, esta se puede reemplazar por un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia o similitud con la secuencia de aminoácidos con una SEQ ID NO determinada.

[0103] En una forma de realización preferida, la identidad o similitud de la secuencia se determina comparando la longitud total de las secuencias según lo identificado en el presente documento.

[0104] En el presente documento, se define como "identidad de secuencia" a una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptido o proteína o péptido) o dos o más secuencias de ácido nucleico (polinucleótido), según se determina comparando las secuencias. En una forma de realización preferida, la identidad de secuencia se calcula en base a la longitud total de dos SEQ ID NO determinadas o en parte de estas. Parte del mismo significa preferiblemente al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de ambas SEQ ID NO. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, según sea el caso, determinado por la coincidencia entre cadenas de tales secuencias.

[0105] La "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. La "identidad" y la "similitud" se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos, incluidos, entre otros, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

[0106] Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, p. ej., el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible públicamente en NCBI y otras fuentes (Manual BLAST, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S. *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El conocido algoritmo de Smith Waterman también se puede utilizar para determinar la identidad.

[0107] Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992); Penalización de espacio: 12; y Penalización de longitud de espacio: 4. Un programa útil con estos parámetros está disponible públicamente como el programa "Ogap" de Genetics Computer Group, ubicado en Madison, Wisconsin, EE. UU. Los parámetros antes mencionados son los parámetros predeterminados para las comparaciones de aminoácidos (junto con ninguna penalización por los espacios finales).

[0108] Los parámetros preferidos para la comparación de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: coincidencias=+10, desajuste=0; Penalización de espacio: 50; Penalización de longitud de espacio: 3. Disponibles en el programa Gap de Genetics Computer Group, ubicado en Madison, Wisconsin, EE. UU. Los parámetros predeterminados para las comparaciones de ácidos nucleicos se proporcionan arriba.

[0109] Opcionalmente, al determinar el grado de similitud de aminoácidos, el experto en la materia también puede tener en cuenta las llamadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras", como quedará claro para el experto en la materia. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Las variantes de sustitución de la secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo de las secuencias descritas y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Preferiblemente, el cambio de aminoácido es conservador. Las sustituciones conservadoras preferidas para cada uno de los aminoácidos naturales son las siguientes: Ala por Ser; Arg por Lys; Asn por Gln o His; Asp por Glu; Cys por Ser o Ala; Gln por Asn; Glu por Asp; Gly por Pro; His por Asn o Gln; Ile por Leu o Val; Leu por Ile o Val; Lys por Arg; Gln o Glu; Met por Leu o Ile; Phe por Met, Leu o Tyr; Ser por Thr; Thr por Ser; Trp por Tyr; Tyr por Trp o Phe; y Val por Ile o Leu.

[0110] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente.

[0111] Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" generalmente significa "al menos uno/a".

[0112] La invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

[0113] Para ilustrar las ventajas de los compuestos de acuerdo con la invención, se prepararon dos variantes del ligando establecido Pam₃CysSK₄ de TLR2/TLR1 que contiene la sustitución de CH₂ por NH. Estos dos compuestos denominados U-Pam-14 y U-Pam-12 difieren en la longitud de la cadena grasa unida al extremo N del residuo de Cys, siendo U-Pam-14 un isómero exacto del resto palmitoilo del ligando natural, mientras que U-Pam-12 contiene una cadena acortada. La figura 1 muestra el ligando Pam₃CysSK₄ del estado de la técnica y el ligando U-Pam-14 y U-Pam-12 según la invención. Un círculo muestra dónde se ha sustituido el puente -CH₂- por el puente -NH-.

[0114] Todos los reactivos y disolventes usados en la síntesis de péptidos en fase sólida se adquirieron de Bachem y Biosolve y se usaron tal como se recibieron. Fmoc-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-OH (en este documento, (RS) denota una mezcla de epímeros R y S en C-2 del grupo dipalmitoiloiloxipropilo) se adquirió de Bachem, los aminoácidos Fmoc, HCTU y PyBOP de Novabiochem. Las resinas basadas en Tentagel se encargaron a Rapp Polymere. La LC/MS se realizó en un sistema JASCO utilizando una columna analítica Vidac C4 (4,6 × 50 mm, tamaño de partícula de 5 µm, flujo de 1,0 ml/min.) o una columna analítica Alltima CN (4,6 × 50 mm, tamaño de partícula de 3 µm, caudal de 1,0 ml/min.). La absorbancia se midió a 214 y 256 nm.

[0115] Sistema disolvente:

A: 100 % agua,
B: 100 % acetonitrilo,
C: 1 % TFA/H₂O.

[0116] Se aplicaron gradientes de B en 10 % C durante 15 minutos a menos que se indique lo contrario. Las purificaciones se realizaron en el sistema HPLC preparativo Gilson, provisto de una columna Vidac C4 semipreparativa (10 × 250 mm, tamaño de partícula de 5 µm, flujo de 5,0 ml/min).

[0117] Sistema disolvente:

A: 100 % agua,
B: 100 % acetonitrilo,
C: 1 % TFA/H₂O.

[0118] Se aplicaron gradientes de B en 10 % C sobre 3 CV a menos que se indique lo contrario. La absorción UV se midió con 214 y 256 nm. La síntesis de péptidos en fase sólida se realizó en un instrumento automatizado ABI (Applied Biosystems) 433A aplicando un protocolo basado en Fmoc a partir de resina Tentagel-RAM según métodos establecidos. Las etapas consecutivas realizadas en cada ciclo aplicado para Fmoc-Lys(Boc)-OH fueron:

- 1) Desprotección del grupo Fmoc con piperidina al 20 % en NMP durante 15 min;
- 2) Lavado con NMP;
- 3) Acoplamiento del aminoácido apropiado usando un exceso de cinco veces.
En resumen, el aminoácido Fmoc (0,25 mmol) se disolvió en HCTU 0,25 M en NMP (1 ml), la solución resultante se transfirió al recipiente de reacción seguido de 0,5 ml de DIPEA 1,0 M en NMP para iniciar el acoplamiento. A continuación, el recipiente de reacción se agitó durante 45 min;
- 4) Lavado con NMP;
- 5) Protección con anhídrido acético 0,5 M en NMP en presencia de 0,5 mmol de DIPEA;
- 6) Lavado con NMP;
- 7) Eliminación final de Fmoc con piperidina al 20 % en NMP durante 15 min;
- 8) Lavado con NMP;
- 9) Lavado con DCM.

H-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Rink-Tentagel (1)

[0119] La síntesis de péptidos se realizó en una escala de 1 mmol usando un instrumento automatizado ABI 433A aplicando un protocolo basado en Fmoc a partir de Rink Amide S Tentagel (cargando 0,26 mmol/g). La resina, después de la desprotección final con Fmoc, se lavó con NMP y DCM y se secó. La resina 1 resultante se usó en el siguiente paso.

Procedimiento general de acoplamiento Fmoc-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-OH

[0120] La resina Tentagel S Ram 1 cargada con H-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Rink-Tentagel se trató con una solución madre de 0,5 ml de 0,18 M Fmoc-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-OH en PyBop

0,22 M en DCM:NMP (2:1). La mezcla resultante se activó con $2 \times 44 \mu\text{mol}$ de Dipea durante 15 min y se hizo reaccionar mediante agitación durante 18 h seguido de lavado con NMP y DCM. La resina se hinchó de nuevo en DCM:NMP y se dividió en porciones de $10 \mu\text{mol}$.

Procedimiento general para la adición de isocianato

- 5 [0121] La resina de $10 \mu\text{mol}$ cargada con Fmoc-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc) 2 se hinchó en DCM:NMP (1:1) y se trató con $3 \times 3 \text{ min } 20 \%$ de piperidina en NMP para la desprotección de Fmoc. Después de un lavado completo con NMP, la resina se suspendió en 1 ml de DCM:NMP (1:1) y se trató con isocianato de tetradecilo o isocianato de dodecilo ($25 \mu\text{l}$). La mezcla se agitó durante 18 h, se lavó con NMP y DCM y se secó al aire. La resina se trató durante 104 minutos con un cóctel de escisión
- 10 TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5). La solución se filtró y precipitó con Et₂O (50 ml) y se almacenó a -200°C durante 18 h. El Et₂O se centrifugó, se eliminó y el precipitado se disolvió por sonicación en 1 ml de MeCN:H₂O:tBuOH (1:1:1). De cada $50 \mu\text{l}$ de producto se diluyó con $50 \mu\text{l}$ de MeCN:H₂O:tBuOH (1:1:1) para análisis LCMS (columna
- 15 Vidac C4). Las secuencias obtenidas se diluyeron con otros $0,5 \text{ ml}$ de MeCN:H₂O:tBuOH (1:1:1) y se purificaron en una columna Vidac C4 semipreparativa ($10 \times 250 \text{ mm}$, tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$, flujo de $5,0 \text{ ml/min}$, 60-100 % B.).

[0122] Los compuestos obtenidos de este modo según la invención tenían las siguientes propiedades:

Upam-14:
Se obtuvo 1-tetradecil-urea-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH ₂ (*):
0,89 mg ($0,59 \mu\text{mol}$, 6 %),
LCMS: 50-90 % B,
rt 8,23 min.
Bruto fórmula C ₈₀ H ₁₅₆ N ₁₂ O ₁₂ S calculada 1509,17, encontrado ESI-MS: [M+H] ⁺ : 1510,6 (calculado 1510,2), [M+H] ₂ ⁺ : 756,0 (calculado 755,8). HRMS [M+H] ⁺ calculado para C ₈₀ H ₁₅₆ N ₁₂ O ₁₂ S 1510,17592, encontrado 1510,17670.

- 20 (*) RS indica una mezcla de epímeros en C-2 del grupo dipalmitoiloxipropilo.

Upam-12
1-dodecadecil-urea-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH ₂ (*)
0,89 mg ($0,59 \mu\text{mol}$, 6 %),
LCMS: 50-90 % B
rt 8,06 min.
Bruto fórmula C ₇₉ H ₁₅₄ N ₁₂ O ₁₂ S calculada 1495,15, encontrado ESI-MS: [M+H] ⁺ : 1496,3 (calculado 1496,16).
(*) RS indica una mezcla de epímeros en C-2 del grupo dipalmitoiloxipropilo.

Ejemplo 2

- 25 [0123] Los dos compuestos U-Pam-12 y U-Pam-14 obtenidos en el Ejemplo 1 se analizaron en comparación con Pam3CysSK4 sin modificar en cuanto a su capacidad funcional para activar una línea celular reportera que expresa TLR2 humana HEK-TLR2 (Figura 3A) y una línea celular dendrítica murina (Figura 3B).

- 30 [0124] En el ensayo, se incubaron células HEK transfectadas con TLR2 vivas y células dendríticas (5×10^4 células/pocillo) con concentraciones de titulación de los respectivos compuestos de Pam en medio de cultivo y se incubaron a 37°C . Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midió la presencia de citoquinas IL-8 o IL-12, respectivamente, mediante ensayos ELISA tipo sándwich específicos.

- 35 [0125] Ambos tipos de células fueron significativamente más estimulados por los compuestos U-Pam que por Pam3CysSK4 sin modificar. Ambos compuestos aumentaron el nivel máximo de estimulación al menos dos veces, y se calculó que eran al menos 100 veces más efectivos según la concentración del compuesto necesaria para alcanzar niveles de estimulación similares.

[0126] Se observó que el compuesto según la invención puede estimular funcionalmente TLR2 tanto de origen humano como de ratón en concentraciones bajas (pM a nM). Las concentraciones activas son inferiores a las del ligando TLR2 no modificado. Además, las células dendríticas fisiológicamente importantes pueden activarse para producir la citoquina IL-12 inmunológicamente relevante. Esta citoquina es de vital importancia para facilitar el cebado eficaz de linfocitos T específicos frente a virus y/o antígenos tumorales. Por lo tanto, una composición que comprende dicho compuesto como adyuvante se puede usar de forma eficaz para aumentar la inmunogenicidad del antígeno y mejorar así la eficacia de una vacuna.

[0127] Se cree que el uso de un compuesto según la invención dará como resultado una respuesta inmunitaria mejorada, lo que significa una activación más robusta del sistema inmunitario innato, así como una activación más robusta del sistema inmunitario adaptativo, expresada en una mayor respuesta de células T y/o una mayor respuesta de anticuerpos, en comparación con la estimulación inmunológica con el conocido Pam3Cys-SK4.

Ejemplo 3

[0128] Este ejemplo ilustra la síntesis de un derivado de UPam-14 donde el grupo R⁵ (CH₂-OH) se sustituye por CH₂-CH₃. Este compuesto se denomina aquí Upam-14-Abu.

H-Abu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Rink-Tentagel (2)

[0129] La síntesis de péptidos se realizó tal y como se describe en el Ejemplo 1 para H-Ser(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Rink-Tentagel (1) con la única diferencia de que se aplicó Fmoc-Abu-OH en lugar de Fmoc-Ser(OtBu)-OH para introducir un residuo de ácido 2-aminobutírico en lugar del residuo de serina de Upam-14. Las etapas posteriores de síntesis y purificación fueron idénticas a las descritas en el Ejemplo 1.

[0130] El compuesto obtenido de este modo según la invención tenía las siguientes propiedades:

Upam-14-Abu
1-tetradecil-urea-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-Abu-Lys-Lys-Lys-Lys-NH ₂
3,22 mg (2,13 μmol, 21 %),
LCMS: 50-90 % B
rt 8,31 min.
Fórmula de Bruto C ₈₁ H ₁₅₈ N ₁₂ O ₁₁ S calculada 1507,19, encontrado ESI-MS: [M+H] ⁺ : 1508,5 (calculado 1508,2), [M+H] ²⁺ : 755,1 (calculado 754,6). HRMS [M+H] ⁺ calculado para C ₈₁ H ₁₅₈ N ₁₂ O ₁₁ S 1508,19665, encontrado 1508.19725.

Ejemplo 4

[0131] El compuesto U-Pam se probó además funcionalmente en células dendríticas (Figuras 4 y 5) e *in vivo* en ratones (Figura 6).

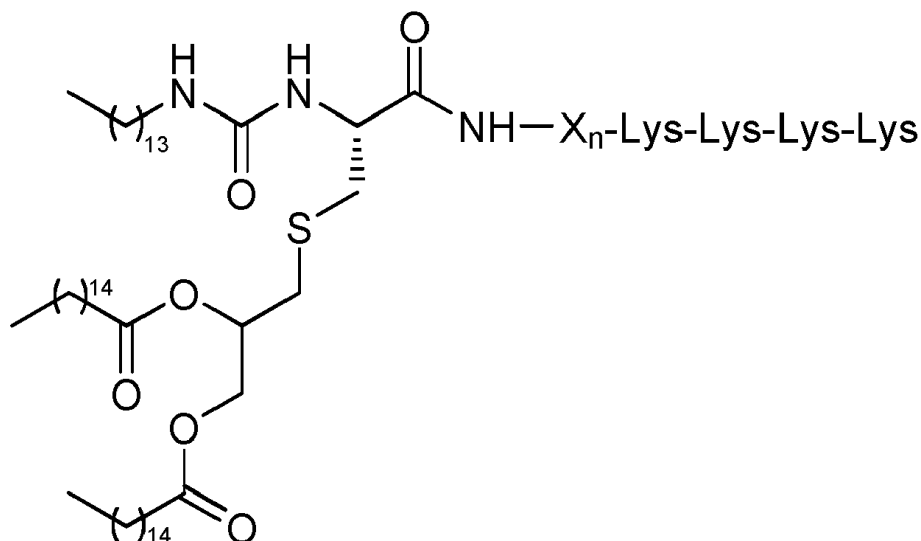
[0132] La figura 4 muestra una línea de células DC murinas que se incubó durante 48 horas con 30 nM de U-Pam3CSK4 (U-Pam14) o bien Pam3CSK4, o se dejó sin estimular. Posteriormente, las DC se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra las moléculas CD40, CD86 y MHC de clase II. La intensidad de fluorescencia media se determinó mediante análisis FACS. Estos datos muestran que U-Pam es superior a wt Pam, no solo en la producción de citoquinas IL-12 (véase el ejemplo 2), sino también en la expresión de moléculas de superficie celular que son características de una maduración óptima de DC relacionada con una capacidad óptima de cebado de células T.

[0133] En la figura 5, se muestra el análisis de la activación de U-Pam de células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC). El día 5 de cultivo de la fracción CD14⁺ de las PBMC donadoras en medio de crecimiento con IL-4 y GM-CSF, estas moDC se incubaron con wt Pam3CSK4, U-Pam14, péptido largo sintético conjugado con Pam3CSK4 o conjugado con U-Pam14 (Pam-SLP o uPam14-SLP), o se dejó sin estimular. Después de 48 horas de incubación, se tomó el sobrenadante de los cultivos de moDC, el cual se sometió a análisis ELISA IL12p40 (Fig. 5A) e IL12p70 (Fig. 5B). Después de 48 horas de incubación, las moDC se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra CD86 (Fig. 5C). Este análisis muestra que el compuesto U-Pam también mejora la activación de las células dendríticas humanas. Es importante destacar que no solo el compuesto libre, sino también el U-Pam conjugado con el antígeno de péptido largo, mejoró la actividad de DC.

[0134] La capacidad de cebado de células T *in vivo* del péptido largo sintético conjugado con U-Pam del antígeno OVA (que contiene el epítipo SIINFEKL CTL) se muestra en la Figura 6. Se vacunaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con 5 nmol de conjugado U-Pam14-SLP, 5 nmol de conjugado Pam3CSK4-SLP, 5 nmol de U-Pam14 libre mezclado con 5 nmol de SLP, 5 nmol de Pam3CSK4 libre mezclado con 5 nmol de SLP, o solo con PBS. Después de 14 días, se sacrificaron los ratones, se recogieron los bazo y se preparó una suspensión de células individuales. Los esplenocitos se tiñeron intracelularmente con anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos contra el interferón- γ y con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie celular CD3 y CD8 β . Se muestra el porcentaje de células T CD8 específicas del péptido OVA que producen IFN γ (Fig. 6A). En otro experimento independiente, se vacunaron C57BL/6 según lo descrito anteriormente y, de nuevo, después de 14 días, se recogieron los bazo. Una fracción de los esplenocitos se volvió a estimular durante 7 días con células de linfoma EG7 que expresan OVA irradiadas. Los esplenocitos cultivados se tiñeron con tetrámeros MHC clase I Kb-SIINFEKL-APC y con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie celular CD3 y CD8 β . El porcentaje de células T CD8 específicas de OVA se muestra en la (Fig. 6B). Ambos experimentos *in vivo* muestran un cebado mejorado de células T CD8 específicas de antígeno mediante la conjugación de Upam14 con SLP que alberga un epítipo de células T.

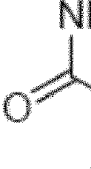
Ejemplo 5

[0135]



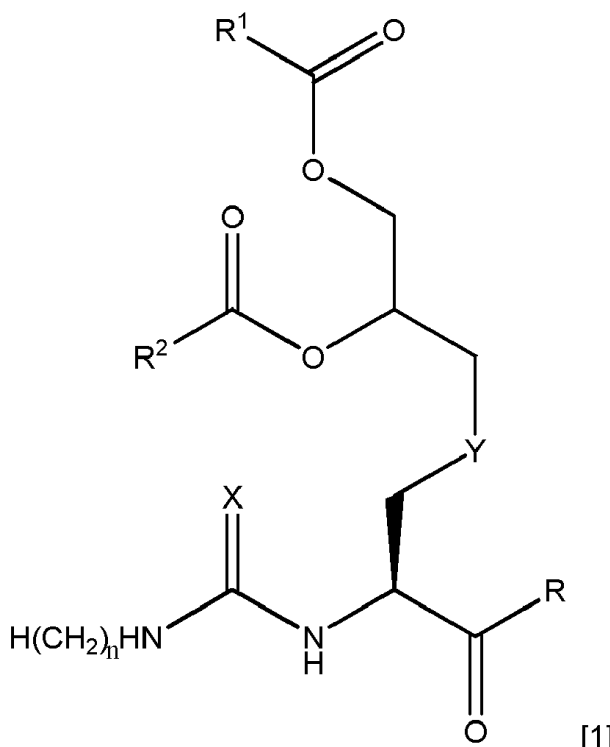
[0136] Las variantes de UPam en las que X_n se modificó se compararon midiendo la producción de IL-12 y la regulación al alza de los marcadores de superficie celular CD40, CD86 y MHC Clase II a 3 μ M y 30 nM. En el presente documento, X_n toma el lugar de la serina en la parte peptídica SK₄ según la fórmula (2), que contiene diferentes grupos para R⁵. Los compuestos X1 hasta X8 que contienen estos diferentes grupos R⁵, que se estudiaron, se enumeran en la siguiente tabla, en la que X1 es UPam-14 como se preparó en el Ejemplo 1 y X2 es UPam-14-Abu como se preparó en el Ejemplo 3. La potencia de los compuestos para regular al alza CD40 siguió la tendencia observada en el ensayo de maduración DC. Los compuestos X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7 o X8 mostraron una mayor cantidad de regulación al alza en comparación con los resultados obtenidos con el Pam₃Cis-SK₄ del estado de la técnica. En la regulación al alza del marcador de superficie celular CD86 y MHC clase II, se observó una tendencia corroborada.

Compuesto	R ⁵
X1	

Compuesto	R ⁵
X2	
X3	
X4	
X5	
X6	
X7	
X8	

REIVINDICACIONES

1. Compuesto representado por



5 donde R^1 y R^2 son cada uno independientemente un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 17 átomos de carbono, n es de 11 a 18 inclusive, Y es azufre, X es O y R es un grupo orgánico que comprende uno o más péptidos, uno o más ácidos nucleicos, uno o más anticuerpos o combinaciones de estos.

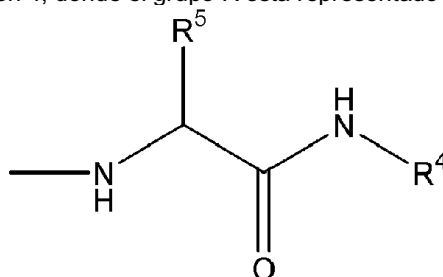
10 2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R^1 y R^2 son cada uno un grupo alquilo lineal que tiene 15 átomos de carbono.

3. Compuesto según las reivindicaciones 1 o 2, donde n es 11 hasta 15 inclusive.

15 4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde R es SK_m , donde m es 1, 2, 3, 4 o 5, y donde R está opcionalmente acoplado a un antígeno.

5. Compuesto según la reivindicación 4, donde R^1 y R^2 son grupos alquilo lineales que tienen 15 átomos de carbono, m es 4 y n es 12 o 14.

20 6. Compuesto según la reivindicación 4, donde el grupo R está representado por



25 donde R^4 es una parte peptídica K_m , donde m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5, y en la que R^4 está opcionalmente acoplado a un antígeno y donde R^5 es hidrógeno o un grupo que comprende de uno a seis átomos elegidos entre carbono, nitrógeno y oxígeno.

7. Compuesto según la reivindicación 6, donde R^5 es un grupo $-CH_2-OH$, un grupo $-CH_2-CH_3$, un grupo $-(CH_2)_3-CH_3$, un grupo $-CH_2C=CH$, un grupo $-CH_2CH=CH_2$ o un grupo $-(CH_2)_2NH_2$.

30 8. Compuesto según la reivindicación 6 o 7, donde R^5 no es hidrógeno y el carbono asimétrico al que se une R^5 tiene la configuración L.

9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, donde la parte peptídica K_m se acopla a un antígeno, un ácido nucleico y/o un anticuerpo.

10. Proceso de síntesis de péptidos en fase sólida para preparar un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende

- (a) proporcionar R-H, que está opcionalmente inmovilizado y/o protegido en la cadena lateral;
- (b) acoplar el bloque de construcción de cisteína sustituida $\text{Fmoc-(Y-(2-(OC(O)R)^2)-3-(OC(O)R^1))propil)-Cys-OH}$ a R-H; y
- (c) escindir el grupo Fmoc del extremo N-terminal del péptido resultante;
- (d) tratar el péptido liberado por Fmoc con $\text{H-(CH}_2)_n\text{-N=C=X}$, y
- (e) opcionalmente conjugar un anticuerpo o un ácido nucleico al péptido tratado con $\text{H-(CH}_2)_n\text{-N=C=X}$

donde R, R^1 , R^2 , X, Y y n son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. Proceso según la reivindicación 10, donde R es un grupo orgánico que comprende uno o más péptidos y R-H está inmovilizado y/o protegido en la cadena lateral.

12. Composición que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un antígeno, en la que el antígeno está presente como compuesto separado o como parte del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o composición según la reivindicación 12 para su uso como medicamento.

14. Composición según la reivindicación 12 para su uso como vacuna preventiva o terapéutica frente al antígeno.

15. Compuesto o composición para su uso según la reivindicación 13 para la prevención, retraso y/o tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un antígeno en un sujeto.

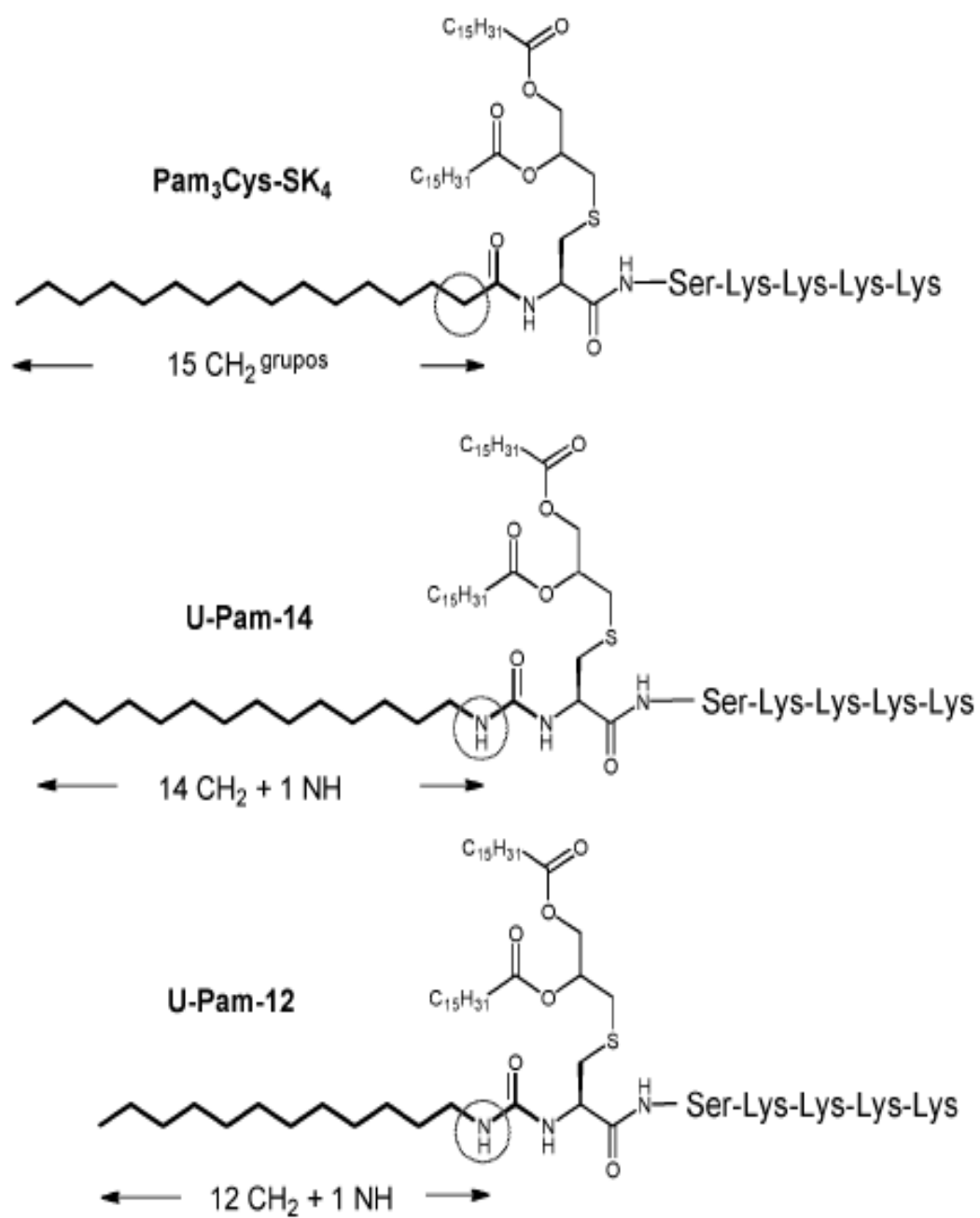
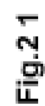


Fig. 1



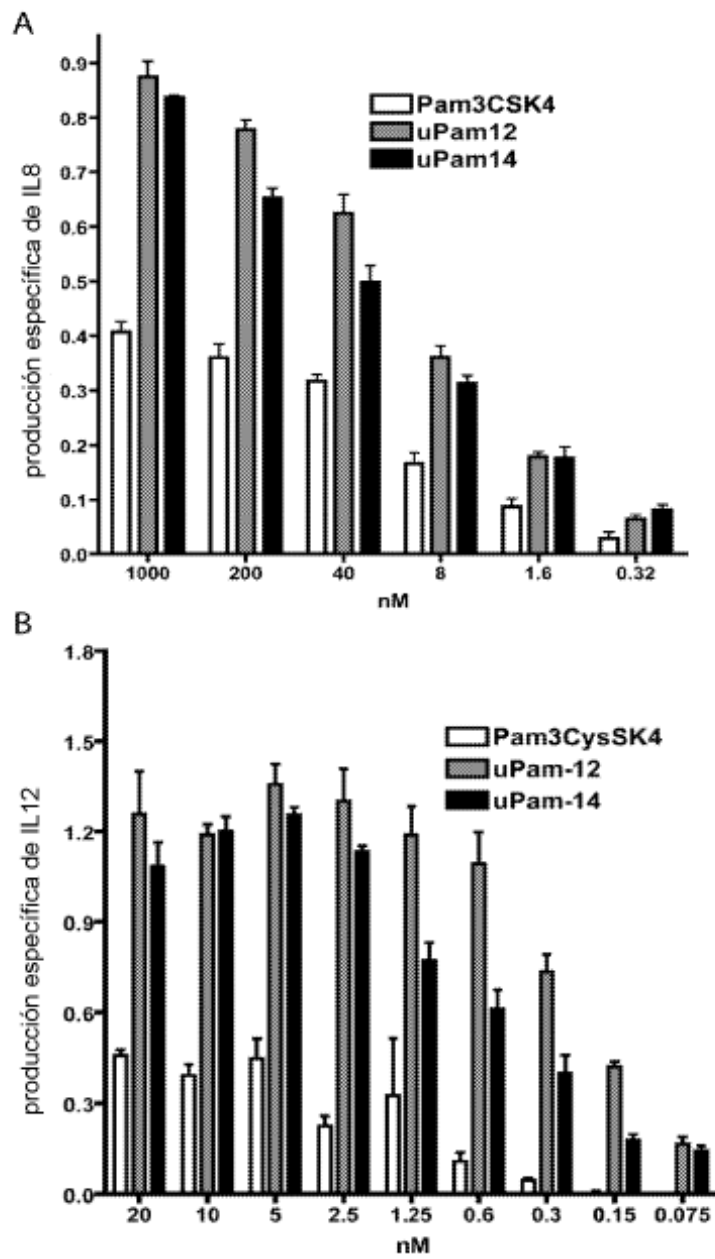


Fig. 3

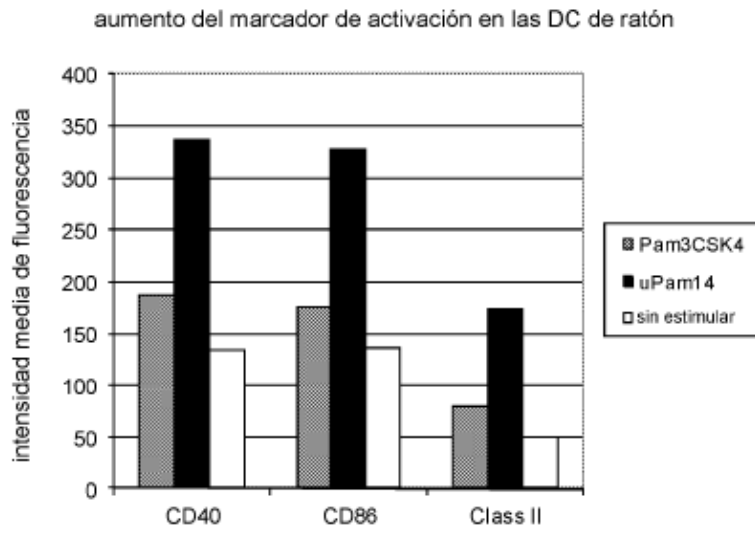


Fig 4

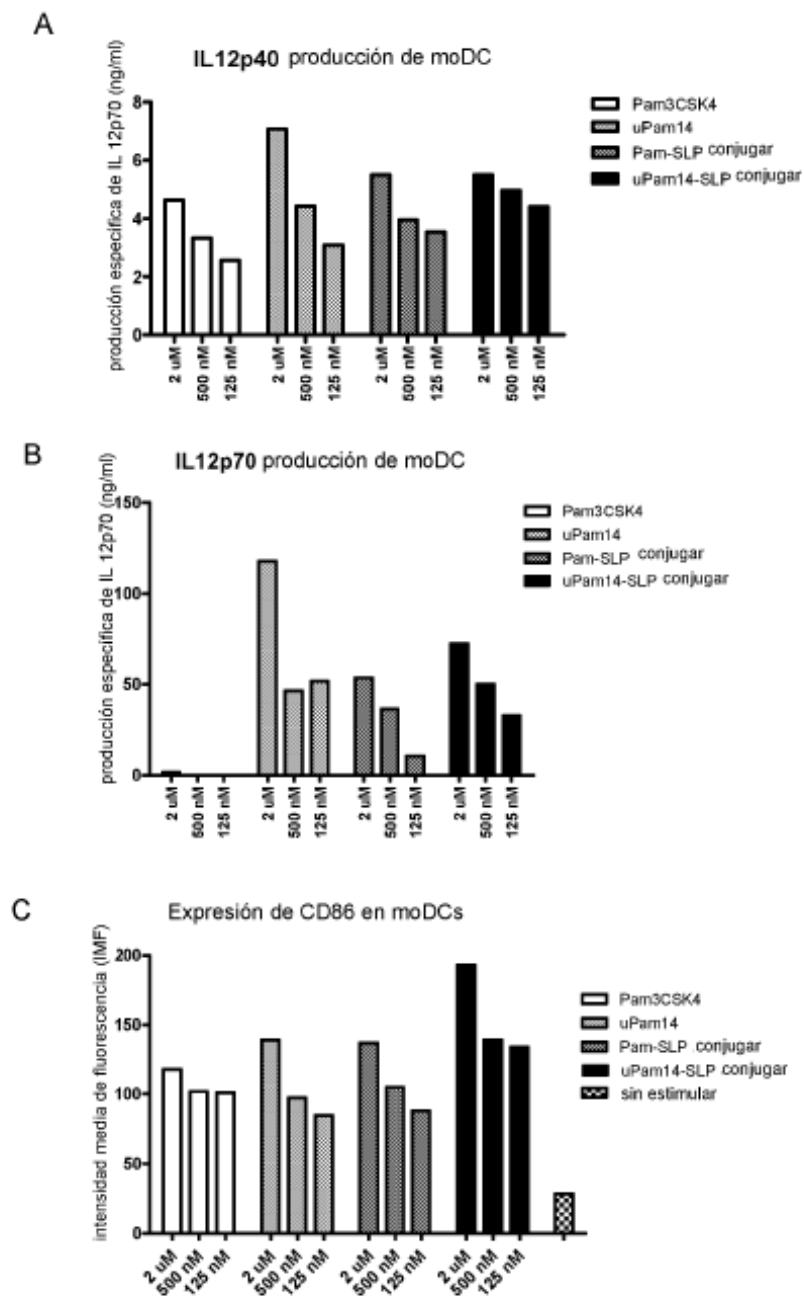
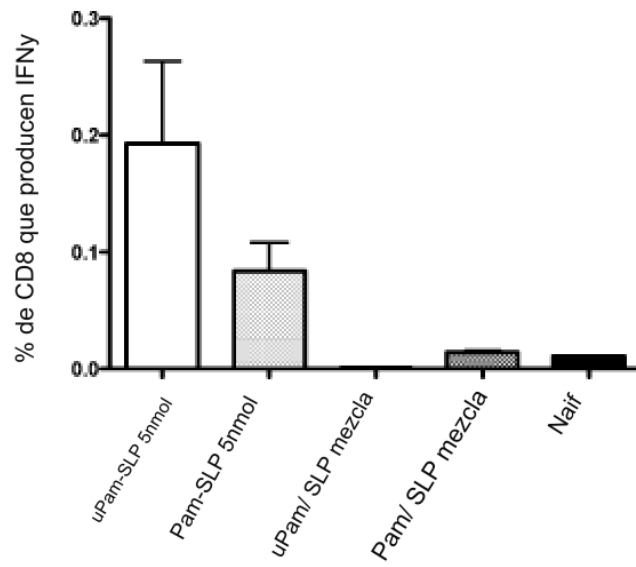


Fig 5

A Cebado de células T mediante conjugados de uPam;
respuesta IFN γ ex vivo



B Cebado de células T CD8 específicas mediante conjugados de uPam

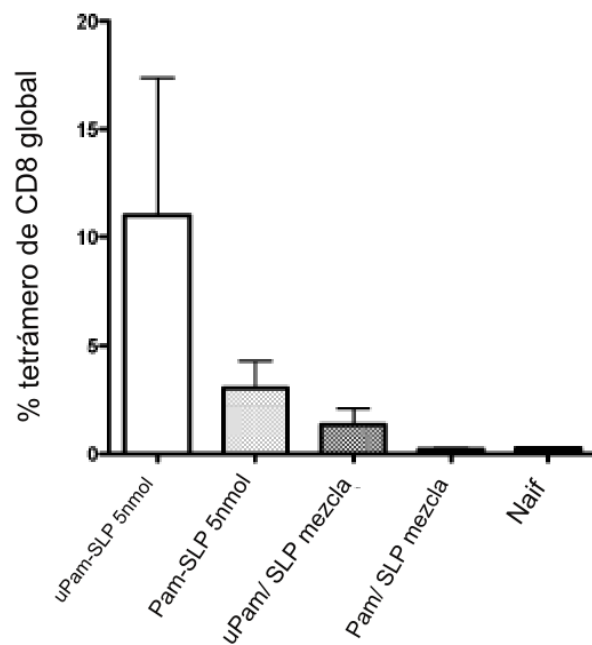


Fig 6