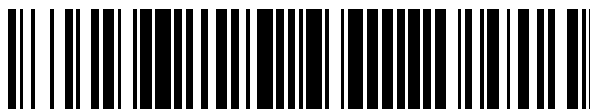


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 957**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2009 PCT/US2009/043874**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2009 WO09140447**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2009 E 09747530 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2296650**

54 Título: **Inmunomodulación mediante inhibidores de IAP**

30 Prioridad:

16.05.2008 US 5394708 P

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

06.11.2020

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)
Novartis AG
4056 Basel, CH y
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZAWEL, LEIGH;
DRANOFF, GLENN;
DOUGAN, MICHAEL;
STRAUB, CHRISTOPHER, S. y
FIRESTONE, BRANT, G.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 791 957 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

Inmunomodulación mediante inhibidores de IAP

5 Antecedentes de la invención

La inmunización es el proceso de administración de material antigénico (*por ejemplo*, una vacuna) para producir o aumentar artificialmente una respuesta inmunitaria. Un problema frecuentemente encontrado es que muchos antígenos utilizados para la inmunización no son lo suficientemente inmunogénicos como para generar un valor de anticuerpos suficiente para proporcionar protección contra futuras exposiciones. Los antígenos débiles también pueden ser deficientes para inducir inmunidad celular.

Para fortalecer la respuesta inmunitaria humoral y/o celular a un antígeno, es común administrar un antígeno junto con un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno. La administración de un adyuvante con un antígeno puede hacer que un individuo responda a un antígeno que de otro modo no respondería en ausencia del adyuvante. Los adyuvantes de uso común incluyen el adyuvante de Freund, la hemocianina de lapa californiana (KLH, de sus siglas en inglés) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, de sus siglas en inglés). Los documentos WO 2005/097791, WO 2008/016893 y WO 2008/045905 describen inhibidores de IAP para el tratamiento de trastornos proliferativos.

El documento WO 2006/091972 describe inhibidores de IAP solos o en combinación con agentes quimioterapéuticos.

El documento FR 2610934 describe análogos de tuftsin que poseen propiedades inmunomoduladoras.

El documento WO 2005/094818 describe inhibidores de IAP para el tratamiento de tumores malignos.

El documento WO 2005/077969 describe inhibidores de la actividad de la serina proteasa para tratar la infección por hepatitis C.

El documento US 2005/197403 describe potenciadores diméricos de moléculas pequeñas de apoptosis.

El documento WO 2008/045905 describe la inhibición de IAP para el tratamiento de trastornos proliferativos y trastornos autoinmunitarios.

A pesar de las propiedades inmunoestimulantes de adyuvantes conocidos, estos adyuvantes siguen siendo insuficientes para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto contra muchos antígenos clínicamente importantes, por ejemplo, antígenos asociados a tumores.

En consecuencia, existe una necesidad de nuevas composiciones de adyuvantes.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a adyuvantes que poseen propiedades inmunogénicas mejoradas. Estos adyuvantes inmunitarios son capaces de potenciar ampliamente la activación de las células inmunitarias. En al menos una realización, la presente invención se refiere al descubrimiento inesperado de que inhibidores de la familia de proteínas IAP (inhibidor de la apoptosis) funcionan como posibles adyuvantes inmunitarios capaces de potenciar las señales de activación fisiológicamente relevantes en diversos linajes de células inmunitarias. En consecuencia, la invención presenta, en un primer aspecto, una vacuna que comprende una cantidad inmunogénica de un antígeno y un adyuvante que comprende un inhibidor de IAP en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otro aspecto, la invención presenta una cantidad inmunoestimulante de un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de la respuesta inmunitaria de un sujeto, en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La invención presenta además una cantidad inmunogénica de un antígeno y una cantidad inmunoestimulante de un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de una respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno, en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En un aspecto relacionado, la invención presenta una cantidad inmunoestimulante del inhibidor de IAP como se describió anteriormente, para usar en la potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, o una cantidad inmunogénica de un antígeno y una cantidad inmunoestimulante del inhibidor de IAP como se describió anteriormente, para usar en la potenciación de una respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno, en donde la respuesta

inmunitaria está mediada por uno o más tipos de células inmunitarias seleccionadas del grupo que consiste en células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T, células NK, células NKT, macrófagos, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+.

La invención presenta además una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y una cantidad inmunogénica de un antígeno para usar en el tratamiento de un cáncer en un sujeto, en donde dicho inhibidor de IAP y dicho antígeno potencian la respuesta inmunitaria del sujeto al cáncer, en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otra realización, la invención presenta una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de IAP como se ha descrito anteriormente y una cantidad inmunogénica de un antígeno para usar en el tratamiento de un cáncer en un sujeto como se ha descrito anteriormente, en donde el cáncer es un tumor sólido o una neoplasia hemática.

La invención presenta además una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de IAP como se ha descrito anteriormente y una cantidad inmunogénica de un antígeno para usar en el tratamiento de un cáncer en un sujeto como se ha descrito anteriormente, en donde el antígeno comprende una célula cancerosa, en donde dicha célula cancerosa se obtiene preferentemente del sujeto. Más preferentemente, la célula cancerosa es incompetente en proliferación.

En otro aspecto, la invención presenta una cantidad inmunoestimulante o una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de IAP como se ha descrito anteriormente y una cantidad inmunogénica de un antígeno para usar en la potenciación de la respuesta inmunitaria a un antígeno o para usar en el tratamiento de un cáncer en un sujeto mediante la potenciación de la respuesta inmunitaria al cáncer, en donde el antígeno y el inhibidor de IAP se administran secuencialmente o simultáneamente. Preferentemente, cuando la administración es simultánea, el antígeno y el inhibidor de IAP se administran como una composición única.

La presente invención proporciona además un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de una actividad inmunitaria de una célula inmunitaria activada, en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Preferentemente, la actividad inmunitaria comprende potenciar la proliferación, potenciar la producción de citocinas o potenciar la producción de anticuerpos. Preferentemente, la célula inmunitaria activada se selecciona del grupo que consiste en una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T, una célula NK, una célula NKT, un macrófago, un linfocito T CD4+ y un linfocito T CD8+.

La presente invención proporciona además el inhibidor de IAP como se ha descrito anteriormente, para usar en la potenciación de la producción de anticuerpos en donde la célula inmunitaria activada se selecciona de un linfocito B activado, una célula plasmática activada y una célula de hibridoma activada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende:

(a) una composición farmacéutica que comprende:

- (i) un inhibidor de IAP que es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;
- (ii) un antígeno; y
- (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable;

- (b) material de embalaje que encierra dicha composición farmacéutica; y
- (c) instrucciones de uso de dicha composición farmacéutica para la potenciación de una respuesta inmunitaria de un sujeto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el inhibidor de IAP como se ha descrito anteriormente y un antígeno para usar de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, en donde el antígeno es una molécula o composición capaz de estimular o potenciar un indicador de una respuesta inmunitaria.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa datos que indican que el desarrollo de células NKT en cultivo de órgano tímico fetal (FTOC, de sus siglas en inglés) está bloqueado por el tratamiento con inhibidores de IAP.

La Figura 2 representa datos que indican que la inhibición de miembros de la familia de IAP no sensibiliza linfocitos T CD4+ maduros a la apoptosis.

La Figura 3 representa datos que indican que la inhibición de miembros de la familia de IAP potencia la secreción de

citocinas a partir de linfocitos T activados.

La Figura 4 representa datos que indican que la secreción potenciada de citocinas a partir de linfocitos T activados causada por la inhibición de miembros de la familia de IAP es independiente de células NKT.

La Figura 5 representa datos que indican que la producción de citocinas a partir de linfocitos T CD8+ activados se ve aumentada por la inhibición de IAP.

La Figura 6 representa datos que indican que los linfocitos T CD4+ humanos responden a inhibidores de IAP.

La Figura 7 representa datos que indican que la inhibición de miembros de la familia de IAP durante la activación de linfocitos T conduce a una señalización potenciada a través de las rutas JNK y NF- κ B.

La Figura 8 representa datos que indican que inhibidores de IAP potencian ampliamente la activación de células inmunitarias.

La Figura 9 representa datos que indican que la inhibición de miembros de la familia de IAP potencia la alorreactividad.

La Figura 10 representa datos que indican que la inhibición de IAP se revierte rápidamente en linfocitos T alorreactivos reestimulados.

La Figura 11 representa datos que indican que la sobreexpresión de la proteína de unión MLIAP a SMAC en linfocitos T CD4+ conduce a una producción disminuida de IL-2 después de la estimulación.

La Figura 12 muestra datos que indican que los linfocitos T desactivados (KO, de sus siglas en inglés) de XIAP son resistentes al tratamiento mimético de SMAC.

La Figura 13 representa datos que indican que los inhibidores de IAP potencian la immunoactivación *in vivo* y mejoran la inmunidad protectora después de la vacunación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento sorprendente de que inhibidores de IAP funcionan como posibles adyuvantes inmunitarios capaces de potenciar las señales de activación fisiológicamente relevantes en diversos linajes de células inmunitarias. Estos compuestos no alteraron la función de las células inmunitarias en reposo, pero potenciaron la activación de células inmunitarias en el contexto de la estimulación. Esta activación se evidencia mediante, por ejemplo, una mayor expansión y producción de citocinas. Esta propiedad de los inhibidores de IAP posiciona a estos compuestos como agentes ideales para la promoción de la inmunidad, con numerosas aplicaciones clínicas.

Diversos aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes subsecciones. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Aunque en la práctica de la invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen ejemplos de métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos descritos en el presente documento son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

I- Inhibidores de IAP

La apoptosis, un proceso de muerte celular programada, está estrechamente orquestada por una serie de acontecimientos moleculares. Los principales efectores de la muerte celular apoptótica son las caspasas, una familia de cisteína proteasas que escinden preferentemente péptidos diana adyacentes a restos de aspartato. En una célula no apoptótica, las caspasas se retienen en un estado inactivo. Un estímulo proapoptótico desencadena la activación de una cascada de caspasas jerárquica, que conduce a la escisión proteolítica de proteínas celulares esenciales y, en última instancia, a la muerte celular.

La activación de caspasas está estrictamente controlada por varios factores celulares. Los miembros de la familia de proteínas IAP (inhibidor de la apoptosis) se unen directamente a las caspasas, y esta unión suprime la actividad de las caspasas. La unión a caspasas está mediada por los dominios BIR (repetición de IAP de baculovirus) de IAP, que son esenciales para la actividad antiapoptótica de los IAP. La familia de IAP contiene los miembros prototípicos de la familia de XIAP, cIAP-1 y cIAP-2, y también incluye, por ejemplo, NAIP (proteína inhibidora de la apoptosis neuronal), ML-IAP (IAP de melanoma), ILP-2 (proteína 2 similar a IAP) y Op-IAP (un IAP baculovírico).

Se han identificado varios factores que median aún más la vía apoptótica mediante la supresión de la actividad de los IAP. Los más destacados entre ellos son Smac (segundo activador mitocondrial de caspasas) y el ortólogo de Smac

murino DIABLO (proteína de unión directa a IAP con bajo pI), que se localiza en las mitocondrias y se libera en el citosol en respuesta a estímulos apoptóticos. Smac/DIABLO inhibe la actividad de las proteínas IAP mediante la unión directamente a IAP y la exclusión de la interacción de IAP con caspasas. El descubrimiento de que los miembros de la familia de IAP están sobreexpresados en numerosos tipos de cáncer llevó a los investigadores a plantear la hipótesis de que los inhibidores de IAP pueden tener importancia clínica como agentes anticancerígenos mediante la promoción de la señalización pro-apoptótica en células cancerosas. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado de que los inhibidores de IAP son adicionalmente útiles como adyuvantes inmunitarios capaces de potenciar una respuesta inmunitaria.

Se han desarrollado numerosos inhibidores de IAP, incluidos los miméticos de Smac, que también interactúan con los IAP e inhiben su actividad. En consecuencia, un "inhibidor de IAP" se refiere a cualquier compuesto que inhibe la actividad de un miembro de la familia de IAP. Dichos compuestos pueden incluir, por ejemplo, moléculas pequeñas, polipéptidos (*es decir*, péptidos miméticos de Smac), moléculas de ARN de interferencia dirigidas a proteínas IAP (*por ejemplo*, ARNip o ARN antisentido) y anticuerpos anti-IAP. El inhibidor de IAP de la presente invención es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

II. Propiedades inmunomoduladoras de inhibidores de IAP

Para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto, es común administrar un estímulo inmunitario, un inmunógeno o un antígeno en combinación con un adyuvante inmunitario. Un adyuvante es una sustancia que potencia una respuesta inmunitaria a un estímulo inmunitario, inmunógeno o antígeno. El inhibidor de IAP de la presente invención es un posible adyuvante inmunitario. Los inhibidores de IAP son capaces de potenciar señales de activación fisiológicamente relevantes en diversos linajes de células inmunitarias. Los inhibidores de IAP no alteran la función de las células inmunitarias en reposo, pero potencian la activación de células inmunitarias en el contexto de la estimulación. La activación de células inmunitarias se evidencia mediante, por ejemplo, una mayor expansión, producción de citocinas y alteraciones en la expresión de marcadores de superficie celular. Los tipos de células que responden a los inhibidores de IAP incluyen, pero sin limitación, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T (*por ejemplo*, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células NKT), células NK y macrófagos, células plasmáticas e hibridomas.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, pretende incluir animales, que son capaces de sufrir o experimentar una enfermedad o trastorno, tal como cáncer, o que necesitan potenciar su respuesta inmunitaria. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, ratones, conejos, ratas, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, burros y animales no humanos transgénicos. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que sufre, está en riesgo de sufrir o posiblemente es capaz de sufrir una enfermedad o trastorno, tal como cáncer, o necesita potenciar su respuesta inmunitaria.

El alcance de las señales inmunitarias potenciadas por los inhibidores de IAP excede el de los adyuvantes conocidos actualmente. Además, los inhibidores de IAP son capaces de estimular linajes de células inmunitarias más ampliamente diversos que los adyuvantes conocidos actualmente. Estas propiedades posicionan a los inhibidores de IAP como agentes ideales para la promoción de la inmunidad. Mediante la amplificación de señales inmunitarias débiles, los inhibidores de IAP pueden funcionar como adyuvantes de vacunas y, además, se pueden usar para potenciar la inmunidad en infecciones crónicas o tumores. Los inhibidores de IAP también son útiles en determinadas enfermedades autoinmunitarias donde la estimulación inmunitaria acelera la resolución de la enfermedad. Las aplicaciones terapéuticas adicionales de inhibidores de IAP se describen con mayor detalle a continuación.

III. Composiciones Terapéuticas y Métodos

(A) Adyuvantes y vacunas

Las propiedades inmunomoduladoras de los inhibidores de IAP hacen que los inhibidores de IAP sean adyuvantes ideales. En consecuencia, la presente invención presenta un adyuvante inmunitario que comprende un inhibidor de IAP. Dichos adyuvantes inmunitarios se pueden administrar a un sujeto solo o en combinación con un antígeno o inmunógeno. El antígeno o inmunógeno puede ser una vacuna o un componente de una vacuna. La invención presenta además composiciones farmacéuticas que contienen un antígeno y un inhibidor de IAP. Además, la invención presenta vacunas que contienen un antígeno y un inhibidor de IAP.

La cantidad de un inhibidor de IAP proporcionada en dichas composiciones farmacéuticas y/o vacunas, o administrada en combinación con un antígeno es normalmente una cantidad inmunoestimulante. Una "cantidad inmunoestimulante" de un inhibidor de IAP, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cantidad de un inhibidor de IAP capaz de estimular o potenciar cualquier indicador de respuesta inmunitaria. En realizaciones ejemplares, la cantidad inmunoestimulante de un inhibidor de IAP es terapéuticamente eficaz en el tratamiento o prevención de una enfermedad. La potenciación de una respuesta inmunitaria, como se usa en el presente documento, se refiere a potenciar una respuesta inmunitaria en relación con el nivel de respuesta inmunitaria que ocurriría en ausencia de un inhibidor de IAP de la invención.

La cantidad de antígeno proporcionada en dichas composiciones farmacéuticas y/o vacunas, o administrada en combinación con un inhibidor de IAP, es, preferentemente, una cantidad inmunogénica. El antígeno puede ser inmunogénico cuando se administra solo, o puede ser inmunogénico solo cuando se administra en combinación con un adyuvante, por ejemplo, un inhibidor de IAP. La cantidad de antígeno es normalmente una cantidad que induce una respuesta inmunitaria en un sujeto sin efectos secundarios adversos significativos. La cantidad de un antígeno que es inmunogénico cuando se administra solo puede reducirse cuando se administra en combinación con un adyuvante inmunitario de la invención, o cuando se administra como un componente de una composición farmacéutica o vacuna de la invención. Es deseable reducir la cantidad de antígeno requerida para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, ya que reduce la probabilidad de efectos secundarios no deseados asociados con algunos antígenos actualmente en uso.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a cualquier molécula o composición capaz de estimular o potenciar cualquier indicador de respuesta inmunitaria. Los indicadores de una respuesta inmunitaria incluyen, pero sin limitación, cualquiera de las siguientes actividades inmunitarias: producción de citocinas, producción de anticuerpos, activación de células inmunitarias, expansión de células inmunitarias, proliferación de células inmunitarias, citotoxicidad mediada por células inmunitarias y alteraciones en la expresión de marcadores de superficie de células inmunitarias. El término "antígeno" se usa indistintamente con el término "inmunógeno". Una "cantidad inmunogénica" de un antígeno, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cantidad de un antígeno capaz de estimular o potenciar cualquier indicador de respuesta inmunitaria.

La estimulación o potenciación de una respuesta inmunitaria se puede determinar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye, pero sin limitación, la detección de cambios en la producción de citocinas, producción de anticuerpos, activación de células inmunitarias, expansión de células inmunitarias, citotoxicidad mediada por células inmunitarias y alteraciones en la expresión de marcadores de superficie de células inmunitarias. Las células inmunitarias capaces de una respuesta inmunitaria incluyen, pero sin limitación, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células NKT), células NK, macrófagos, células plasmáticas e hibridomas.

El término "vacuna", como se usa en el presente documento, se refiere en general a cualquier preparación de material antigénico usado para inducir inmunidad.

(B) Métodos para potenciar una respuesta inmunitaria

La presente invención proporciona un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto mediante la administración al sujeto de un inhibidor de IAP. Dicha respuesta inmunitaria está normalmente mediada por uno o más tipos de células inmunitarias, que incluyen, pero sin limitación, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células NKT), células NK, macrófagos, células plasmáticas e hibridomas. Esto puede implicar seleccionar un sujeto que necesite una respuesta inmunitaria potenciada. Un sujeto seleccionado para este método de potenciar una respuesta inmunitaria puede ser un sujeto que exhibe un bajo nivel de respuesta inmunitaria a un antígeno, por ejemplo, un antígeno tumoral o un antígeno vírico.

La presente invención proporciona además un antígeno en combinación con un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de una respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno mediante la administración al sujeto de un antígeno en combinación con un inhibidor de IAP.

El antígeno puede ser inmunogénico cuando se administra solo, o puede ser inmunogénico solo cuando se administra en combinación con un adyuvante, por ejemplo, un inhibidor de IAP. Dicha respuesta inmunitaria está normalmente mediada por uno o más tipos de células inmunitarias, que incluyen, pero sin limitación, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T (*por ejemplo*, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células NKT), células NK, macrófagos, células plasmáticas e hibridomas. El antígeno y el inhibidor de IAP pueden administrarse en composiciones separadas, o pueden ser componentes de una composición única. En el caso de que el antígeno y el inhibidor de IAP se administren como composiciones separadas, las composiciones se pueden administrar de forma simultánea o secuencial. El antígeno y/o el inhibidor de IAP pueden administrarse como una dosis única o como dosis múltiples.

Los antígenos adecuados para usar en la práctica de la invención incluyen, pero sin limitación, antígenos de mamíferos, antígenos de plantas, antígenos tumorales, antígenos microbianos, antígenos víricos y antígenos fúngicos. Estos antígenos pueden aislarse o purificarse de otra manera, o pueden estar presentes dentro de una mezcla de otros compuestos. Los antígenos adecuados incluyen, por ejemplo, proteínas de mamífero, proteínas vegetales, proteínas tumorales, proteínas microbianas, proteínas víricas y proteínas fúngicas. Los antígenos adecuados también incluyen células vivas, atenuadas o destruidas o fragmentos de células, que incluyen células tumorales, células microbianas, células infectadas con un virus y células fúngicas. Antígenos adecuados adicionales incluyen moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, etc.) capaces de inducir una respuesta inmunitaria.

(C) Métodos de tratamiento del cáncer

Los términos "tratado", "tratar" o "tratamiento" incluye la disminución o alivio de al menos un síntoma asociado con la afección que se está tratando. Por ejemplo, el tratamiento puede ser la disminución de uno o varios síntomas de un trastorno o la erradicación completa de un trastorno, tal como cáncer.

La respuesta del sistema inmunitario a células cancerosas y antígenos tumorales es generalmente baja, lo que hace que la vacunación sea un enfoque problemático en el tratamiento del cáncer. La potencia y el alcance de las señales inmunitarias potenciadas por inhibidores de IAP hacen que los inhibidores de IAP (y los adyuvantes, composiciones y vacunas que los comprenden) sean particularmente útiles para mejorar la respuesta inmunitaria al cáncer. Las vacunas contra el cáncer que contienen o se administran conjuntamente con inhibidores de IAP son, por lo tanto, ventajosas para el tratamiento y/o la prevención del cáncer. En consecuencia, la invención proporciona un inhibidor de IAP y un antígeno, para usar en el tratamiento o la reducción de los síntomas de cáncer en un sujeto, mediante la administración a un sujeto que tiene cáncer de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y un antígeno, donde el inhibidor de IAP y el antígeno potencian la respuesta inmunitaria del sujeto al cáncer de manera que se trata el cáncer. La invención proporciona además un inhibidor de IAP y un antígeno, para usar en la prevención de cáncer en un sujeto, mediante la administración a un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y un antígeno, de manera que la respuesta inmunitaria del sujeto al antígeno se potencia, y de manera que se previene el desarrollo de cáncer en el sujeto. El antígeno puede ser inmunogénico cuando se administra solo, o puede ser inmunogénico solo cuando se administra en combinación con un adyuvante, por ejemplo, un inhibidor de IAP. Dicha respuesta inmunitaria está normalmente mediada por uno o más tipos de células inmunitarias, que incluyen, pero sin limitación, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células NKT), células NK, macrófagos, células plasmáticas e hibridomas. El antígeno y el inhibidor de IAP pueden administrarse en composiciones separadas, o pueden ser componentes de una composición única. En el caso de que el antígeno y el inhibidor de IAP se administren como composiciones separadas, las composiciones se pueden administrar de forma simultánea o secuencial. El antígeno y/o el inhibidor de IAP pueden administrarse como una dosis única o como dosis múltiples.

Antígenos adecuados para usar en el tratamiento o la reducción de los síntomas de cáncer en un sujeto incluyen cualquier antígeno asociado con el cáncer del sujeto. Dicho antígeno puede estar presente en las células cancerosas y ausente en las células no cancerosas. Como alternativa, dicho antígeno puede estar presente a niveles elevados en las células cancerosas en relación con las células no cancerosas. Los antígenos expresados diferencialmente pueden identificarse usando cualquier técnica adecuada conocida en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, transferencia Northern, transferencia Western, RT-PCR cuantitativa, hibridación *in situ*, análisis de micromatrices de oligonucleótidos, análisis de matriz de anticuerpos, presentación diferencial, hibridación sustractiva y análisis en serie de la expresión génica (SAGE, de sus siglas en inglés). En una realización ejemplar, el antígeno es un antígeno de superficie celular. El antígeno puede ser un antígeno que se sabe que se expresa diferencialmente en las células cancerosas con respecto a las células no cancerosas. Como alternativa, el antígeno puede identificarse mediante la comparación de una célula cancerosa o muestra celular obtenida del sujeto que tiene cáncer con una célula normal o muestra celular obtenida de un sujeto. Los antígenos pueden aislarse o purificarse de otra manera, o pueden estar presentes como componentes de una mezcla.

Los antígenos adecuados también incluyen células cancerosas vivas, destruidas o atenuadas o fragmentos de células cancerosas. Las células cancerosas pueden irradiarse o tratarse de otro modo antes de su uso como antígeno, de manera que sean incapaces de proliferar. Las células también pueden romperse, cortarse, sonicarse o lisarse antes de usarse como antígeno. En una realización preferida, las células cancerosas usadas como antígeno son células autólogas obtenidas de un sujeto al que se administrará el antígeno de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En otra realización, las células cancerosas usadas como antígeno son células alogénicas.

Los antígenos adecuados para usar en la prevención de cáncer en un sujeto incluyen cualquier antígeno que se sabe que está presente con frecuencia en un tipo particular de célula cancerosa y ausente en células no cancerosas, o cualquier antígeno que se sabe que está presente con frecuencia en niveles elevados en células cancerosas en relación con células no cancerosas. Dichos antígenos incluyen, pero sin limitación, mucina-1 (MUC-1), antígeno prostático específico (PSA, de sus siglas en inglés), antígeno carcinoembrionario (CEA, de sus siglas en inglés), fosfatasa ácida prostática (PAP, de sus siglas en inglés) y miembros de la familia de genes de antígeno de melanoma (MAGE, de sus siglas en inglés). Se sabe que la infección por determinados virus aumenta la probabilidad de que un sujeto desarrolle cáncer. Los antígenos asociados con dichos virus también son adecuados para usar en los métodos anteriores para prevenir el cáncer. Dichos antígenos se pueden aislar o purificar de otra manera, o pueden incluir todas o una parte de partículas víricas vivas, destruidas o atenuadas. Los virus asociados con el aumento de la susceptibilidad de un sujeto al cáncer incluyen, pero sin limitación, virus del papiloma humano (VPH), hepatitis B, hepatitis C, herpesvirus, virus de Epstein-Barr, virus linfotrópico de linfocitos T humanos y VIH-I. Potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto a los antígenos anteriores permite que el sujeto resista a la exposición posterior a un virus o una célula cancerosa que contiene el antígeno y, en consecuencia, evita que el sujeto desarrolle un cáncer.

Los métodos adecuados para evaluar la potenciación de una respuesta inmunitaria, que incluye una respuesta inmunitaria a un cáncer, son conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, valoración de anticuerpos, medición de la producción de citocinas, ensayo de dilución limitante, ELISA (para medir la producción de citocinas), ensayos de tetrámero, uso de inmunofenotipado, por ejemplo, el ensayo FastImmune™ (BD Biosciences,

Franklin Lakes, NJ), y ensayos de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas (ELISPOT). Los criterios de valoración clínicos útiles para medir la respuesta al tratamiento del cáncer también se conocen en la técnica e incluyen, pero sin limitación, reducción en el volumen del tumor, supervivencia general, supervivencia libre de enfermedad y tiempo de progresión de la enfermedad.

Debido a que el inhibidor de IAP de la invención potencia ampliamente la respuesta inmunitaria, es útil en el tratamiento de un amplio espectro de tumores, incluidos todos los tumores sólidos y neoplasias hemáticas. Los ejemplos de dichos tumores incluyen, pero sin limitación, leucemias, linfomas, mielomas, carcinomas, carcinomas metastásicos, sarcomas, adenomas, cánceres del sistema nervioso y cánceres genitourinarios. En realizaciones ejemplares, el inhibidor de IAP de la invención es útil en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda adulta y pediátrica, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con SIDA, cáncer de ano, cáncer del apéndice, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, osteosarcoma, histiocitoma fibroso, cáncer de cerebro, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico, cáncer de mama, cáncer de mama masculino, adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, carcinoma de origen desconocido, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, glioma maligno, cáncer de cuello uterino, cánceres en la infancia, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos crónicos mieloproliferativos, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer del conducto biliar extrahepático, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor estromal gastrointestinal, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, tumor de células germinales ováricas, tumor trofoblástico gestacional, glioma, tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer hipofaríngeo, glioma hipotalámico y de la vía óptica, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de células renales, cáncer de laringe, cáncer de labios y de la cavidad oral, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenstrom, histiocitoma fibroso maligno, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, cáncer de cuello escamoso, síndrome múltiple de neoplasia endocrina, mieloma múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, trastornos mieloproliferativos, trastornos crónicos mieloproliferativos, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de la hipófisis, neoplasias de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, rabdomiosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, síndrome de Sezary, cáncer de piel no melanoma, cáncer del intestino delgado, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de testículos, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales, tumores trofoblásticos, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de la vulva y tumor de Wilms.

También se proporciona un inhibidor de IAP para usar en el tratamiento del cáncer *ex vivo*. De acuerdo con la presente realización, se aísla una población de células inmunitarias de un sujeto que tiene cáncer, y las células inmunitarias se estimulan con un antígeno y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP, de modo que las células inmunitarias se activan contra el antígeno. Las células inmunitarias se devuelven al sujeto. Luego dichas células inmunitarias potencian la respuesta inmunitaria de un sujeto contra el cáncer del sujeto. Los antígenos adecuados para usar en el tratamiento, prevención o reducción de los síntomas de cáncer en un sujeto como se describe anteriormente también son adecuados para usar en el tratamiento del cáncer *ex vivo*. Varios protocolos de tratamiento experimental conocidos en la técnica implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores para proporcionar linfocitos T específicos de antígeno contra el tumor de un receptor (véase, por ejemplo, Greenberg, R. y Riddell, S. (1999) *Science* 285:546-551). Estos métodos también se pueden usar para activar respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos, que incluyen agentes infecciosos que aumentan la probabilidad de un sujeto de desarrollar cáncer, como se describe en el presente documento. La activación *ex vivo* en presencia de un inhibidor de IAP de la invención puede aumentar la frecuencia y la actividad de linfocitos T transferidos adoptivamente. También se contempla el uso de inhibidores de IAP para potenciar la maduración de células dendríticas durante la producción de una vacuna de células dendríticas.

(E) Métodos para potenciar la proliferación de células inmunitarias y/o la secreción de citocinas

La inmunoactivación induce la proliferación y expansión de linajes de células inmunitarias. Mediante la mejora de la activación de células inmunitarias, el inhibidor de IAP de la invención aumenta la proliferación y expansión de una amplia gama de células inmunitarias, que incluyen, pero sin limitación, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células NKT), células NK y macrófagos. En consecuencia, la invención presenta un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de la proliferación de células inmunitarias mediante la puesta en contacto de una población celular que incluye una célula inmunitaria con un inhibidor de IAP. En una realización preferida, las células se ponen en contacto con estímulos de inmunoactivación adicionales en combinación con un inhibidor de IAP para potenciar la proliferación de células inmunitarias. En esta realización, las células en contacto con un inhibidor de IAP y estímulos de inmunoactivación adicionales demuestran una mayor expansión de lo que lo harían

de otro modo cuando se ponen en contacto con estímulos de inmunoactivación en ausencia de un inhibidor de IAP. Los estímulos que inician la inmunoactivación son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, α -galcer, anti-CD3, anti-CD28, anti-IgM y anti-CD40. Se describen estímulos inmunitarios adicionales en, por ejemplo, *Advanced Methods in Cellular Immunology*, Fernandez-Botran *et al.*, CRC; Spi edition (26 de mayo de 2000).

La inmunoactivación también induce la expresión y secreción de citocinas en células inmunitarias. Mediante la mejora de la activación de células inmunitarias, el inhibidor de IAP de la invención aumenta la producción y secreción de citocinas en las células inmunitarias. Dichas citocinas incluyen, pero sin limitación, IFN- γ , IFN- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α , TNF β , TGF β y GM-CSF. En consecuencia, la invención presenta un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de la producción de citocinas mediante la puesta en contacto de una población celular que incluye una célula inmunitaria con un inhibidor de IAP. En una realización preferida, las células se ponen en contacto con estímulos de inmunoactivación adicionales en combinación con un inhibidor de IAP para potenciar la producción de citocinas. En esta realización, las células en contacto con un inhibidor de IAP y estímulos de inmunoactivación adicionales demuestran una mayor producción de citocinas de lo que lo harían de otro modo cuando se ponen en contacto con estímulos de inmunoactivación en ausencia de un inhibidor de IAP. Los estímulos que inician la inmunoactivación son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, α -galcer, anti-CD3, anti-CD28, anti-IgM y anti-CD40. Se describen estímulos inmunitarios adicionales en, por ejemplo, *Advanced Methods in Cellular Immunology*, Fernandez-Botran *et al.*, CRC; Spi edition (26 de mayo de 2000), como se señaló anteriormente.

(F) Métodos para mejorar la producción de anticuerpos

Muchos antígenos comercialmente importantes son poco inmunogénicos, y la obtención de anticuerpos que reconocen dichos antígenos ha sido tradicionalmente difícil. La capacidad del inhibidor de IAP de la invención para funcionar como un posible adyuvante inmunitario lo hace particularmente adecuado para potenciar la eficacia de la producción de anticuerpos policlonales y/o monoclonales. Los inhibidores de IAP son especialmente útiles en la producción de anticuerpos que reconocen antígenos poco inmunogénicos. En consecuencia, la invención presenta un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de la producción de anticuerpos mediante la inmunización de un mamífero con un antígeno y un inhibidor de IAP. Los métodos conocidos en la técnica útiles para aislar anticuerpos monoclonales y/o policlonales después de la inmunización son adecuados para poner en práctica la invención. Se produce un mayor número de hibridomas que reconocen el antígeno cuando se aíslan anticuerpos monoclonales de animales inmunizados con un antígeno y un inhibidor de IAP que los que se producirían de otro modo cuando se aíslan anticuerpos monoclonales de animales inmunizados solo con antígeno. De manera análoga, la reactividad de los anticuerpos policlonales aislados del antisero de animales inmunizados con un antígeno y un inhibidor de la IAP es mayor que la de los anticuerpos policlonales aislados del antisero de animales inmunizados solo con antígeno. En consecuencia, el uso de un inhibidor de IAP para potenciar la producción de anticuerpos monoclonales y/o policlonales puede mejorar la eficacia de la producción de anticuerpos en sectores comerciales. Después del aislamiento de un hibridoma que produce un anticuerpo de interés, la producción de anticuerpos se puede potenciar mediante la puesta en contacto del hibridoma con un inhibidor de IAP. En consecuencia, los inhibidores de IAP son útiles para aumentar la producción de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas.

(G) Formulaciones y métodos de administración

Composiciones farmacéuticas

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas como se especifica en las reivindicaciones. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente (o profilácticamente) eficaz de un inhibidor de IAP, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. El vehículo y la composición pueden ser estériles. La formulación ha de ser adecuada para el modo de administración.

La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica e incluye un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, adecuado para la administración de compuestos de la presente invención a mamíferos. Los vehículos pueden incluir rellenos líquidos o sólidos, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicados en portar o transportar el agente objeto de un órgano, o parte del organismo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el sujeto. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tal como lactosa, glucosa, dextrosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etil celulosa, metilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de ricino, tetraglicol y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo, ésteres de polietilenglicol y la laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio, hidróxido sódico, hidróxido de potasio, carbonatos, trietilanolamina, acetatos, lactatos, citrato de potasio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico;

soluciones de tampón de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

5 Los agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden estar también presentes en las composiciones.

10 Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, α -tocoferol y derivados tales como vitamina E tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, citrato de sodio y similares.

15 Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas (*por ejemplo*, NaCl), alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, ciclodextrina, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite esencial, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, *etc.* Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables también pueden incluir un agente de ajuste de la tonicidad tal como dextrosa, glicerina, manitol y cloruro de sodio.

25 La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o un polvo. La composición también se puede formular en forma de un supositorio, con aglutinantes y vehículos convencionales, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir transportadores convencionales, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, *etc.*

30 La composición se puede formular de acuerdo con los procedimientos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para administración oral, subcutánea o intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración subcutánea o intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. De manera general, los ingredientes se suministran tanto por separado o se mezclan conjuntamente en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de principio activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con una botella para infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril, suero salino o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o suero salino para que los componentes se mezclen antes de la administración.

45 Las formulaciones de la invención incluyen aquellas adecuadas para administración subcutánea, intravenosa, oral, nasal, tópica, membrana mucosa, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden estar presentes convenientemente en forma de dosis unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma monodosis será generalmente aquella cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. De manera general, de un cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente el 5 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, más preferentemente desde aproximadamente el 10 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento.

50 Los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de asociar un compuesto de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesaria, dando forma al producto.

60 Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, grageas (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o de tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios y similares, cada una conteniendo una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como principio activo. Un compuesto de la presente invención también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

En formas de dosificación sólida de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el principio activo se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: rellenos o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; agentes retardadores de la disolución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y arcillas de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos; y gentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina de relleno blando y duro usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido se puede crear por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos compactos se pueden preparar usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetil celulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glucolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), tensioactivo o dispersante. Los comprimidos creados por moldeo pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente se pueden ranurar o se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También se pueden formular para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición en la que liberan el (los) principio (s) activo (s) solo, o preferentemente, en una determinada porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones inclusorias que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es adecuado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener un diluyente inerte habitualmente usado en la técnica, como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceite de algodón, de cacahuete, maíz, de germen, oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de sorbitano de ácidos grasos y mezclas de los mismos.

Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma de tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorio o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura corporal y, de esta manera, fundirá en el recto o la cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.

Formulaciones de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal también incluyen óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverización que contienen los vehículos que se sabe en la técnica que son apropiados.

Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto de la presente invención incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón, o propulsor que se pueda requerir.

Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además del compuesto activo de la presente invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además del compuesto de la presente invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos cálcicos y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los pulverizadores pueden contener además propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos sin sustituir volátiles, tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar suministro controlado de un compuesto de la presente invención al cuerpo. Tales formas de dosificación pueden prepararse disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de tal flujo puede controlarse proporcionando una membrana controladora de velocidad o dispersando el compuesto activo en una matriz polimérica o gel.

Las formulaciones oftálmicas, pomadas oculares, polvos, soluciones y similares, también se contempla que están dentro del alcance de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles solo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario pretendido o agentes de suspensión o espesantes.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol de ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma inyectable del fármaco se puede llevar a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco mediante inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende por tanto de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra mediante la disolución o suspensión del fármaco en un vehículo oleoso.

Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas de los compuestos en cuestión en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejido corporal.

Kits

Provechosamente, la presente invención también proporciona kits para usar en el tratamiento o la prevención de enfermedades. El kit comprende:

(a) una composición farmacéutica que comprende:

- (i) un inhibidor de IAP que es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;
- (ii) un antígeno; y
- (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable;

- (b) material de embalaje que encierra dicha composición farmacéutica; y
- (c) instrucciones de uso de dicha composición farmacéutica para la potenciación de una respuesta inmunitaria de un sujeto.

Un "kit", como se usa en la solicitud inmediata, incluye un recipiente para contener las formas de dosificación unitarias separadas, tales como una botella dividida o un paquete de aluminio dividido. El recipiente puede tener cualquier apariencia o forma convencional como se conoce en la técnica que está hecho de un material farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una caja de papel o cartón, una botella o frasco de vidrio o plástico, una bolsa resellable (por ejemplo, para sostener una "recarga" de comprimidos para colocarla en un recipiente diferente), o un envase de tipo blíster con dosis individuales para extraer del paquete de acuerdo con un programa terapéutico. El recipiente empleado puede depender de la forma de dosificación exacta implicada, por ejemplo, una caja de cartón convencional generalmente no se usaría para contener una suspensión líquida. Es factible que se pueda usar más de un recipiente en un solo paquete para comercializar una sola forma de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar contenidos en una botella que a su vez está contenida dentro de una caja.

Un ejemplo de dicho kit es el denominado envase de tipo blíster. Los envases de tipo blíster son bien conocidos en la industria del envasado y se usan ampliamente para el envasado de formas farmacéuticas unitarias (comprimidos, cápsulas y similares). Los envases de tipo blíster consisten en una lámina de material relativamente rígido cubierta con una hoja de un material plástico preferentemente transparente. Durante el proceso de envasado, se forman rebajes en la hoja de plástico. Los rebajes tienen el tamaño y la forma de los comprimidos o cápsulas individuales para ser empacados o pueden tener el tamaño y la forma para acomodar múltiples comprimidos y/o cápsulas para ser empacados. A continuación, los comprimidos o cápsulas se colocan en los rebajes en consecuencia y la lámina de material relativamente rígido se precinta contra la hoja de plástico en la cara de la hoja que es opuesta a la dirección en la que se formaron los rebajes. Como resultado, los comprimidos o cápsulas se sellan individualmente o colectivamente, según se desee, en los rebajes entre la hoja de plástico y la lámina. Preferentemente, la resistencia de la lámina es tal que los comprimidos o las cápsulas se pueden extraer del envase blíster aplicando manualmente presión sobre los rebajes, mediante la cual se forma una abertura en la lámina en el lugar de los rebajes. El comprimido o la cápsula se puede entonces extraer a través de dicha abertura.

Puede ser deseable proporcionar un recordatorio escrito, donde el recordatorio escrito es del tipo que contiene información y/o instrucciones para el médico, farmacéutico o sujeto, por ejemplo, en forma de números al lado de los comprimidos o cápsulas mediante las cuales los números corresponden con los días del régimen en que se deben ingerir los comprimidos o cápsulas así especificadas o una tarjeta que contenga el mismo tipo de información. Otro ejemplo de este tipo de recordatorio es un calendario impreso en la tarjeta, por ejemplo, como sigue: "Primera semana, lunes, martes", ...etc. ... "Segunda semana, lunes, martes,..." etc. Otras variaciones de los recordatorios serán fácilmente aparentes. Una "dosis diaria" puede ser un solo comprimido o cápsula o varios comprimidos o cápsulas para tomar en un día determinado.

Otra realización específica de un kit es un dispensador diseñado para dispensar las dosis diarias de una en una. Preferentemente, el dispensador está equipado con un recordatorio, para facilitar aún más el cumplimiento del régimen. Un ejemplo de dicho recordatorio es un contador mecánico, que indica el número de dosis diarias que se han dispensado. Otro ejemplo de dicho recordatorio es un recordatorio de microchips alimentada por batería junto con una lectura de cristal líquido o una señal de recordatorio audible que, por ejemplo, lee la fecha en que se tomó la última dosis diaria y/o le recuerda a uno cuándo se debe tomar la siguiente dosis.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: El desarrollo de células NKT en cultivo de órgano tímico fetal (FTOC) está bloqueado por el tratamiento con inhibidores de IAP

Con el fin de investigar el papel de los miembros de la familia de IAP en el desarrollo de células NKT, se obtuvieron miméticos farmacológicos del segundo activador mitocondrial de apoptosis (SMAC) del inhibidor de IAP endógeno. Se usaron tres inhibidores químicamente distintos para la mayoría de los experimentos. Uno de dichos inhibidores, LBW-242, es un posible inhibidor de los miembros de la familia de IAP que se une al dominio BIR de XIAP a concentraciones submicromolares ($IC_{50} = 280 \text{ nM}$). LBW-242 se utilizó para la mayoría de las réplicas experimentales.

El desarrollo de células NKT se estudió utilizando cultivos de órgano tímico fetal (FTOC). Se cultivaron embriones de 16,5 días de ratones C57BL/6 en presencia de tres inhibidores de IAP distintos, un compuesto de control o vehículo (PBS). Después de 14 días, se recogieron las células y se analizaron mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la Figura 1, el desarrollo de células NKT en cultivo de órgano tímico fetal (FTOC) se bloquea mediante el tratamiento con inhibidores de IAP. La Figura 1A representa una cuantificación de poblaciones tímicas en FTOC tratadas durante 14 días con inhibidores de IAP (miméticos de SMAC). Como se indica en la Figura 1A, el tratamiento de FTOC con inhibidores de IAP condujo a una disminución moderada en linfocitos T CD4+, sin un efecto constante sobre el tamaño del cultivo o sobre los linfocitos T CD8+ y doble positivos. En múltiples experimentos, la inhibición de miembros de la

familia de IAP durante el cultivo en FTOC evitó completamente el desarrollo de células NKT de una manera dependiente de la dosis, como se muestra en las Figuras 1B-D. La Figura 1B representa el desarrollo de timocitos positivos únicos en el día 14 en función de la concentración de LBW-242. La Figura 1C presenta el análisis de citometría de flujo de los FTOC el día 14 usando tetrámeros CD1d cargados con α -galcer y anti-CD3. El tratamiento utilizado para cada cultivo se escribe sobre la representación correspondiente. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes. La Figura 1D presenta una cuantificación del desarrollo de células NKT a partir de varios experimentos independientes usando inhibidores de IAP. La Figura 1E representa el porcentaje de células NKT recuperadas a partir de FTOC el día 14 en función de la dosis de LBW-242. La inhibición de miembros de la familia de IAP no tuvo un efecto constante sobre la expresión de CD1d, o sobre el desarrollo de linfocitos T positivos para FOXP3 o linfocitos T $\gamma\delta$. Como se usa en la Figura 1, el mimético 3 de SMAC es LBW-242; los miméticos 1 y 2 de SMAC son compuestos inhibidores de IAP adicionales con mayor potencia que LBW-242. LBW-242 y el compuesto de control se usaron a 500 nM. Los miméticos de SMAC 1 y 2 se usaron a 100 nM. Se utilizaron embriones de 16,5 días C57BL/6 para todos los cultivos.

Ejemplo 2: La inhibición de miembros de la familia de IAP no sensibiliza a linfocitos T CD4+ maduros a la apoptosis

Se evaluó el papel de los miembros de la familia de IAP en la supervivencia de células NKT maduras. Los linfocitos T CD4+ procedentes del bazo de ratones BALB/c se activaron con anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas y luego se analizaron mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la Figura 2, la inhibición de miembros de la familia de IAP no sensibiliza a los linfocitos T CD4+ maduros a la apoptosis. Se estimularon 2×10^6 linfocitos T CD4+ esplénicos BALB/c con anti-CD3 y anti-CD28 en RPMI. Después de 24 horas, las células viables se cuantificaron por exclusión con azul de tripano, y los recuentos de células resultantes se representan en la Figura 2A. Las células apoptóticas se cuantificaron en los cultivos de la Figura 2A usando citometría de flujo con anexina V y 7-AAD (los resultados se representan en la Figura 2B). Tanto LBW-242 como el compuesto de control se usaron a 500 nM. El tratamiento de linfocitos T CD4+ con inhibidores de IAP no alteró el número total de linfocitos T, ni contribuyó a la apoptosis, como se muestra en las Figuras 2A-B. Se identificaron células NKT en los cultivos de la Figura 2A usando tetrámeros CD1d cargados con anti-CD3 y α -galcer. Las células NKT todavía eran detectables en cultivo a frecuencias normales, como se muestra en la Figura 2C. En ausencia de estimulación, la inhibición de miembros de la familia de IAP tampoco tuvo un efecto discernible sobre la apoptosis.

Ejemplo 3: La inhibición de miembros de la familia de IAP potencia la secreción de citocinas a partir de linfocitos T activados

Con el fin de determinar las consecuencias funcionales de la inhibición de IAP en células NKT, se estimularon células del bazo de ratones BALB/c con el agonista específico de células NKT α -galactosilceramida (α -galcer). Sorprendentemente, las células de bazo estimuladas con α -galcer tratadas con inhibidores de IAP mostraron una mayor secreción tanto de IFN- γ (interferón γ) como de IL-2 (interleucina-2), como se muestra en las Figuras 3A-B. Se cultivaron 5×10^5 células de bazo BALB/c de tres ratones separados en RPMI con α -galcer en presencia de LBW-242 o un compuesto de control. Después de 48 horas, se midieron los niveles de citocinas en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA, y los resultados se representan en la Figura 3A (IFN γ) y la Figura 3B (IL-2). Se observó un efecto similar dependiente de la dosis sobre la producción de IL-2 en linfocitos T CD4+ BALB/c o C57BL/6 no fraccionados estimulados con anti-CD3 y anti-CD28, como se muestra en las Figuras 3C-D. Se cultivaron 10^5 linfocitos T CD4+ esplénicos de ratones BALB/c en RPMI con anti-CD3 y anti-CD28 o control de isotipo durante 48 horas en presencia de LBW-242 o un compuesto de control. Los niveles de IL-2 se midieron en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA, como se muestra en la Figura 3C. Una curva de respuesta a la dosis para LBW-242 usando las condiciones descritas en la Figura 3C se representa en la Figura 3D. LBW-242 y el compuesto de control se usaron a 500 nM. No se observaron efectos de la inhibición de IAP en ausencia de estimulación. Es importante destacar que, el tratamiento con miméticos de SMAC de linfocitos T CD4+ condujo a una producción potenciada de citocinas incluso en presencia de todos los inhibidores ZVAD-FMK de las caspasas, lo que indica que el efecto observado no es el resultado de la liberación de la inhibición de la caspasa.

Debido a que el efecto observado de la inhibición de IAP en linfocitos T aún podría depender de alteraciones en la función de células NKT, las consecuencias de la inhibición de IAP se evaluaron en ratones C57BL/6 desactivados para CD1d deficientes en células NKT. La estimulación de linfocitos T CD4+ desactivados para CD1d con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de inhibidores de IAP condujo a una producción de IL-2 que era indistinguible de la de los animales TS, lo que indica que la secreción de citocinas potenciada a partir de linfocitos T activados causada por la inhibición de miembros de la familia de IAP es independiente de las células NKT (Figura 4). Los linfocitos T CD4+ de bazos de ratones de tipo silvestre (TS) y C57BL/6 desactivados (KO) para Cd1d se cultivaron en RPMI con anti-CD3 y anti-CD28 o durante 48 horas en presencia de LBW-242, M2 o un compuesto de control. Los niveles de IL-2 se midieron en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA, como se indica en la Figura 4. El efecto de la inhibición de IAP no se limitó a linfocitos T CD4+, ya que los linfocitos T CD8+ produjeron de manera similar el exceso de IFN- γ e IL-2 después de la estimulación en presencia de inhibidores de IAP (Figura 5). Los linfocitos T CD8+ de ratones C57BL/6 se cultivaron en RPMI con anti-CD3 y anti-CD28 o durante 48 horas en presencia de LBW-242 o un compuesto de control. Los niveles de citocinas se midieron en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA. Tal como se muestra en la Figura 5, la producción de citocinas a partir de linfocitos T CD8+ activadas se ve aumentada por la inhibición de IAP.

Ejemplo 4: Los linfocitos T CD4+ humanos responden a los inhibidores de IAP

La mayoría de los miembros de la familia de IAP están altamente conservados entre el ratón y el ser humano, lo que sugiere que las observaciones anteriores en el ratón también pueden aplicarse a las células humanas activadas. Para abordar esta posibilidad, se purificaron linfocitos T CD4+ de la sangre periférica de varios voluntarios sanos y se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de inhibidores de IAP. Como se observó en el ratón, la inhibición de miembros de la familia de IAP condujo a un aumento dependiente de la dosis en la secreción de IL-2 a partir de los linfocitos T CD4+ activados; También como se observó en el ratón, la inhibición de IAP no tuvo un efecto aparente en las células en reposo (Figuras 6A-B). Se purificaron 10^5 linfocitos T CD4+ de la sangre periférica de un donante sano y se estimularon durante 48 horas con anti-CD3 y anti-CD28, o un anticuerpo de control de isotipo en presencia de inhibidores de IAP (M2, M3 y M4) o un compuesto de control (M1). La IL-2 se midió por ELISA, como se indica en la Figura 6A. Se usaron M1 y M4 (LBW-242) a 500 nM. M2 y M3 se usaron a 100 nM. La Figura 6B presenta una curva dosis-respuesta para LBW-242 usando linfocitos T CD4+ de un donante diferente y la configuración descrita para la Figura 6A.

El bloqueo farmacológico de la calcineurina con ciclosporina fue capaz de bloquear la producción potenciada de IL-2 asociada con la inhibición de IAP. En cambio, la inhibición de la vía Akt con rapamicina fue capaz de reducir la producción total de IL-2, pero no impidió la potenciación de la producción de IL-2 durante la inhibición de IAP (Figura 6C). Los linfocitos T CD4+ humanos se estimularon en presencia de inhibidores de IAP o un compuesto de control con sirolimus (rapamicina) o ciclosporina, y los niveles de IL-2 resultantes se muestran en la Figura 6C.

Ejemplo 5: La inhibición de miembros de la familia de IAP durante la activación de linfocitos T conduce a una señalización potenciada a través de las rutas JNK y NF- κ B

Para investigar el mecanismo que une la inhibición de IAP con la producción potenciada de citocinas dependiente de la activación, se evaluó mediante transferencia Western el efecto de la inhibición de IAP sobre la fosforilación de JNK y la degradación de I κ B en linfocitos T CD4+ estimulados. Tanto las rutas JNK como NF- κ B se activaron más rápidamente en linfocitos T inhibidos por IAP, como se muestra en la Figura 7. Se estimularon cultivos replicados de 2×10^6 linfocitos T CD4+ durante los períodos de tiempo indicados con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de 500 nM de LBW-242 o un compuesto de control (LCV-843). Las réplicas se combinaron y los lisados celulares se analizaron mediante transferencia Western para las proteínas indicadas. PDI se utilizó como control de carga. Aunque se ha informado que cIAP2 es una ubiquitina ligasa para bcl-10, la inhibición de IAP no condujo a un cambio detectable en los niveles de bcl-10 en los linfocitos T activados. No se observaron cambios en la fosforilación de JNK y la degradación de I κ B en los linfocitos T tratados con inhibidores de IAP en ausencia de estimulación.

Ejemplo 6: Los inhibidores de IAP potencian ampliamente la activación de las células inmunitarias

Debido a que las rutas JNK y NF- κ B juegan un papel importante en la señalización cadena abajo de una amplia gama de receptores inmunitarios, se analizó el efecto de los inhibidores de IAP en varias poblaciones inmunitarias adicionales. Los linfocitos B inhibidos por IAP estimulados con anti-IgM y anti-CD40 produjeron IL-6 aumentada en comparación con las células de control, como se muestra en la Figura 8A. Se cultivaron 2×10^6 linfocitos B con anti-IgM y anti-CD40 durante 96 horas en presencia de LBW-242 o un compuesto de control. La IL-6 se midió en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA. Además, las células dendríticas (CD) procedentes de médula ósea parcialmente activadas (es decir, por disrupción del grupo) produjeron un aumento de IL-12 p40 después de la inhibición de IAP; este efecto también se observó en CD inhibidas por IAP estimuladas con LPS o CpG (Figura 8B). Se cultivaron 4×10^4 células dendríticas procedentes de médula ósea parcialmente activadas con los estímulos indicados en la Figura 8B durante 24 horas en presencia de LBW-242 o un compuesto de control. La p40 se midió en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Para ambos experimentos representados en la Figura 8, LBW-242 y el compuesto de control se usaron a 500 nM. También se descubrió que los macrófagos peritoneales tratados con LPS secretaban IL-6 aumentada cuando se trataban conjuntamente con inhibidores de IAP.

Ejemplo 7: La inhibición de miembros de la familia de IAP potencia la alorreactividad

Dada la amplia capacidad de la inhibición de IAP para potenciar la activación de las células inmunitarias, se examinó el efecto de los inhibidores de IAP en una respuesta alotópica. Se cultivaron 4×10^5 células de bazo de ratones BALB/c con 8×10^5 células de bazo C57BL/6 irradiadas en presencia de LBW-242 o un compuesto de control (LCV-843). Después de seis días, se recogieron los cultivos y se analizó la producción de citocinas y la proliferación de células del bazo. Los cultivos tratados con LBW-242 mostraron una secreción de IFN- γ significativamente potenciada; sin embargo, los niveles de IL-2 se redujeron significativamente, como se ilustra en la Figura 9A. Las citocinas se midieron en sobrenadantes celulares mediante ELISA. Tanto LBW-242 como el compuesto de control se usaron a 500 nM. Al concluir los cultivos descritos en la Figura 9A, se contaron las células viables totales mediante exclusión con azul de tripano y se identificaron subconjuntos de células inmunitarias mediante citometría de flujo utilizando los marcadores indicados en la Figura 9B. Dado que los cultivos descritos en la Figura 9A también exhibieron una proliferación significativa de linfocitos T CD4 (Figura 9B), la disminución de IL-2 probablemente se deba al consumo de la citocina. Se produjo una proliferación sustancial de linfocitos B en cultivos inhibidos por IAP (Figura 9B).

Los efectos potenciadores de la activación de la inhibición de IAP se revirtieron fácilmente; en linfocitos T alorreactivos, las estimulaciones secundarias con anti-CD3 en ausencia de inhibidores condujeron a respuestas equivalentes independientemente de las condiciones de cultivo previas (Figura 10). Las células estimuladas en una reacción mixta de linfocitos de seis días se recuperaron y se reestimularon con anti-CD3 durante 48 horas. Las citocinas se midieron en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Los marcadores de muestra indicados en la Figura 10 se refieren al tratamiento utilizado durante la estimulación primaria.

Ejemplo 8: La sobreexpresión de la proteína de unión MLIAP a SMAC en linfocitos T CD4+ conduce a una producción disminuida de IL-2 después de la estimulación

También se examinó si la sobreexpresión de ML-IAP, una proteína de unión a SMAC endógena, podría alterar la respuesta de los linfocitos T a los estímulos activadores. Los linfocitos T BALB/c transgénicos para ML-IAP secretaron niveles reducidos de IL-2 en respuesta a la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28, y este efecto podría modularse a través de la inhibición de IAP, como se muestra en la Figura 11. Se cultivaron 10^5 linfocitos T CD4+ de ratones transgénicos BALB/c TS o MLIAP (IAP) en RPMI con anti-CD3 y anti-CD28 durante 48 horas en presencia de LBW-242 o un compuesto de control. Los niveles de IL-2 se midieron en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA.

Ejemplo 9: Los linfocitos T desactivados (KO) para XIAP son resistentes al tratamiento con miméticos de SMAC

Con el fin de establecer la especificidad para el efecto dependiente de IAP sobre la activación de linfocitos T, los linfocitos T de ratones deficientes en XIAP se activaron en presencia de LBW-242 o el compuesto de control LCV-843. Al inicio, los linfocitos T deficientes en XIAP secretaban IL-2 y niveles comparables a animales TS; sin embargo, los células deficientes en XIAP fueron resistentes al tratamiento con miméticos de SMAC, mostrando solo un pequeño aumento en la secreción de citocinas tras el tratamiento con LBW-242 (Figura 12). Como se muestra en la Figura 12A, se cultivaron 10^5 linfocitos T CD4+ de ratones C57BL/6 TS o KO para XIAP en RPMI con anti-CD3 y anti-CD28 durante 48 horas en presencia de LBW-242 o el compuesto de control LCV-843. Los niveles de IL-2 se midieron en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA. La Figura 12B representa la proporción de IL-2 producida a partir de linfocitos T CD4+ estimulados en presencia de LBW-242 en comparación con LCV-843. Estos resultados indican que XIAP juega un papel importante en la sensibilización de los linfocitos T al tratamiento con miméticos de SMAC.

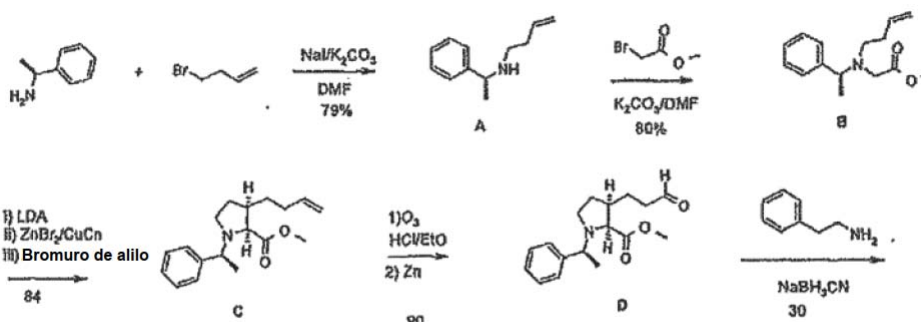
Ejemplo 10: Los inhibidores de IAP potencian la immunoactivación y mejoran la inmunidad protectora después de la vacunación *in vivo*

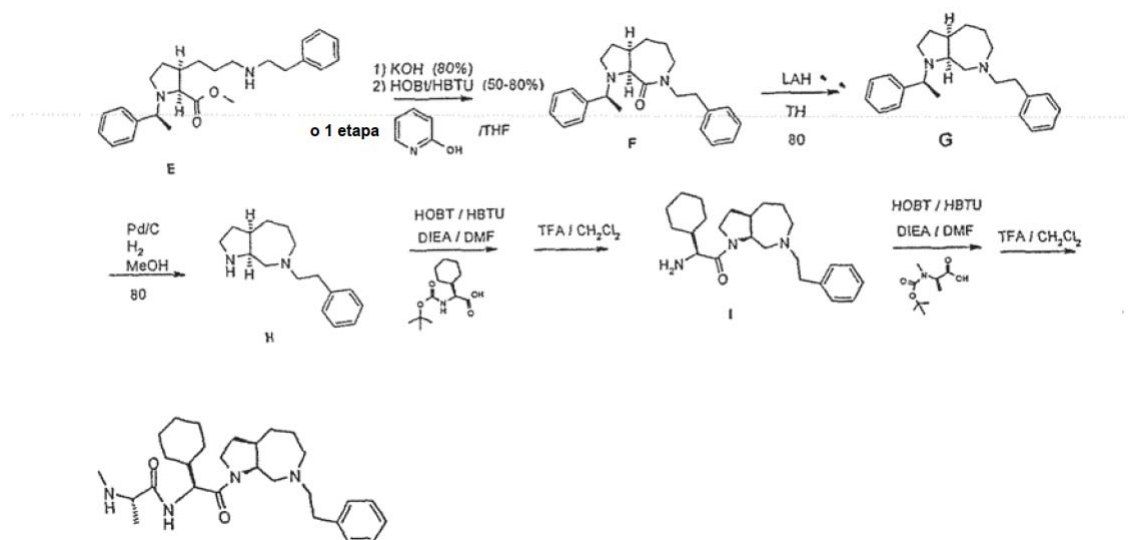
Examinar el efecto de los inhibidores de IAP sobre la immunoactivación *in vivo*. Se administró LBW-242 a ratones en combinación con una vacuna antes de la exposición posterior. Se administraron células de melanoma de ratón B 16 irradiadas (vacuna) a ratones en los días -14 y -7 con o sin una dosis oral única de LBW-242 (150 mg/kg). Se implantaron células tumorales B 16 vivas en los ratones el día 0 (exposición). El volumen tumoral se midió a los 7, 10, 13 y 16 días después del implante de células vivas. Tal como se muestra en la Figura 13, los ratones que recibieron el inhibidor de IAP LBW-242 en combinación con la vacuna B 16 tuvieron una carga tumoral reducida después de la exposición con linfocitos B 16 vivas, en comparación con los ratones que recibieron solo la vacuna LBW-242 o B 16. Estos datos indican que la administración de un inhibidor de IAP en combinación con un antígeno mejora la immunoactivación, potenciando la inmunidad protectora.

Ejemplo 11: Síntesis del inhibidor de IAP de la invención

A continuación se describe un procedimiento de síntesis para LBW 242 (N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidropirrol[2,3-c]piridin-1-il)-etil]-2-metilaminopropionamida).

Se pueden usar procedimientos de síntesis análogos para preparar el inhibidor de IAP de la invención.





But-3-enil-((S)-1-fenil-etil)-amina (A): A una solución de S-(-)-1-fenil etilamina (15,75 g, 130 mmol) en 150 ml de DMF a 0 °C se añade K₂CO₃ (53,9 g, 390 mmol) en pequeñas porciones. Después de agitar a 0 °C durante 10 minutos, se añade 4-bromobuteno (13,5 g, 100 mmol) gota a gota y seguido de NaI (58,5 g, 390 mmol) en pequeñas porciones. La mezcla de reacción, una suspensión blanca, se calienta a 95 °C y se agita durante la noche/16 horas. La solución se enfría a TA y se diluye con 200 ml de éter, y se lava con 3 x 100 ml de agua. La capa orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra. El producto en bruto se purifica mediante destilación (65 ~ 70 °C en alto vacío) para producir un líquido incoloro (13,5 g, 76,7 %).

Éter etílico del ácido [but-3-enil-((S)-1-fenil-etil)-amino]-acético (B): A una solución de But-3-enil-((S)-1-fenil-etil)-amina (6,37 g, 36,4 mmol) en 150 ml de DMF a 0 °C se añade K₂CO₃ (10,0 g, 72,8 mmol) en pequeñas porciones. Después de agitar a 0 °C durante 10 minutos, se añade lentamente bromoacetato de etilo (8,35 g, 54,6 mmol). La mezcla de reacción, una suspensión blanca, se agita a TA toda la noche/16 horas. La solución se diluye con 200 ml de éter y se lava con 3 x 100 ml de agua. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía (hexano/CH₂Cl₂: 50/50) para dar un líquido pálido (8,5 g, 94,5 %).

Éster etílico del ácido (2S,3R)-3-but-3-enil-1-((S)-1-fenil-etil)-pirrolidina-2-carboxílico (C): A una solución de diisopropilamina (3,6 g, 35,7 mmol) en THF (80 ml) a -40 °C se añade BuLi (14,28 ml, 35,7 mmol, 2,5 M en hexano) lentamente. La solución se calienta a 0 °C y se agita durante 30 minutos para formar una solución de LDA. La solución de LDA se enfría a -70 °C y se añade lentamente a una solución de éster etílico del ácido [But-3-enil-((S)-1-fenil-etil)-amino]-acético (7,8 g, 29,8 mmol) en THF (80 ml) a -70 °C. La solución de reacción amarillenta clara se agita a -20 °C durante 30 minutos para convertirse en una solución de color amarillo intenso, y luego se enfría a -70 °C. A la solución se añade ZnBr₂ (16,76 g, 74,5 mmol) en éter (50 ml) gota a gota a -70 °C. Después de agitar a TA durante 1,5 horas, la solución de reacción se enfría a 0 °C y se añade lentamente una solución de CuCN (3,47 g, 38,74 mmol) y LiCl (3,29 g, 77,48 mmol) en THF (80 ml). Después de agitar a 0 °C durante 10 minutos, se añade bromuro de alilo (7,26 g, 60 mmol) gota a gota a la solución de reacción, y se calienta muy lentamente a TA. Después de agitar durante una noche a TA, la reacción se interrumpe mediante la adición de 60 ml de NH₄Cl saturado y se extrae con 3 X 150 ml de éter. Las capas orgánicas combinadas se concentran. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía (hexano/EtOAc: 85/15) para dar un líquido incoloro (7,4 g, 82,6 %). (El ZnBr₂ se seca a 150 °C en alto vacío durante 1 hora antes de su uso).

Ester etílico del ácido (2S,3R)-1-((2E,4Z)-(S)-1,2-Dimetil-hexa-2,4-dienil)-3-(3-oxo-propil) pirrolidina-2-carboxílico (D): El éster etílico del ácido (2S,3R)-3-But-3-enil-1-((S)-1-fenil-etil)-pirrolidina-2-carboxílico (1,0 g, 3,32 mmol) se disuelve en EtOH (10 ml) con HCl (0,5 ml, 37 %) y enfriado a -70 °C. Se burbujea gas ozono a través de la solución durante aproximadamente 10 minutos o hasta que la solución se vuelve de color azul muy claro. Se burbujea el gas nitrógeno a través de la solución durante 15 minutos para eliminar el exceso de ozono en la solución. A la solución fría se añade polvo de Zn (0,43 g, 6,6 mmol) y HCl (0,5 ml, 37 %), y se agita a TA durante 20 minutos. Después de la filtración, la solución se diluye con 50 ml de CH₂Cl₂ y se lava con NaHCO₃ saturado (10 ml) y 2 x 20 ml de agua. Después de secar y concentrar, se obtiene un líquido incoloro (1,0 g) sin purificación adicional para la reacción de la siguiente etapa.

Éster etílico del ácido (2S,3R)-3-(3-fenetilamino-propil)-1-((S)-1-fenil-etil)-pirrolidina-2-carboxílico (E): A una solución de éster etílico del ácido (2S,3R)-1-((2E,4Z)-(S)-1,2-Dimetil-hexa-2,4-dienil)-3-(3-oxo-propil)pirrolidina-2-carboxílico (1 g, en bruto) en EtOH (10 ml) se añade fenetilamina (0,44 g, 3,65 mmol) a TA. Después de agitar a TA durante 30 minutos, se añade NaBH₃CN (0,3 g, 4,87 mmol) en una porción. Después de agitar a TA durante 1,5 horas, la solución

de reacción se diluye con 50 ml de éter y se lava con 20 ml de salmuera. La capa de éter se concentra y el producto en bruto se purifica mediante cromatografía ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 97/3) para dar un líquido pálido (405 mg, 30,0 %).

(3aS57aS)-6-Fenetil-1-((S)-1-fenil-etil)-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-7-ona (F): El éster etílico del ácido (2S,3R)-3-(3-fenetilamino-propil)-1-((S)-1-fenil-etil)-pirrolidina-2-carboxílico (340 mg, 0,83 mmol) se disuelve en 20 ml de $\text{MeOH}/\text{KOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10 ml/5 g/5 ml). Después de agitar a 80 °C durante 2 horas, la solución se enfría a 0 °C y se neutraliza mediante la adición de HCl (37 %) a pH = 5. Después de la concentración, el producto en bruto se disuelve en 1 ml de CH_2Cl_2 , se filtra a través de un tapón de gel de sílice corto y se eluye con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (93/7) para dar un sólido vítreo pálido (250 mg, 78,9 %) como ácido.

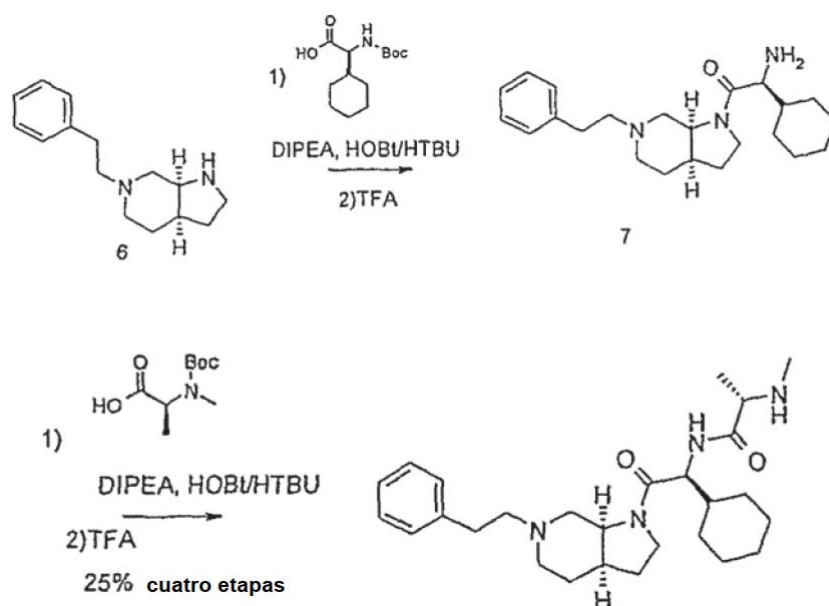
A una solución (0,05-0,1 M) de ácido (1 equivalente) en DMF a TA se añade diisopropiletilamina (5 equivalentes). Después de agitar a TA durante 20 minutos, se añade una solución (0,05 ~ 0,1 M) de HOBT (1,2 equivalentes) y HBTU (1,2 equivalentes) en DMF a la mezcla de reacción, y se continúa agitando durante 1,5 horas (o se controla mediante TLC). La solución de reacción se diluye con éter (1x5 ~ 10 veces el volumen de la solución) y se lava con agua (dos veces X3 el volumen de la solución). La solución orgánica combinada se concentra. El producto en bruto se diluye con CH_2Cl_2 y se seca sobre Na_2SO_4 , y se purifica mediante cromatografía ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 97/3) para dar un producto puro (70-95 % de rendimiento).

Procedimiento para el compuesto F usando 2-hidroxil piridina: Una solución de éster metílico del ácido (2S,3R)-3-(2-fenetilamino-etil)-1-((S)-1-fenil-etil)-pirrolidina-2 carboxílico (400 mg, 1,05 mmol) y 2-hidroxil piridina (100 mg, 1,05 mmol) en THF (10 ml) se agita a 40 °C durante 24 horas. La reacción se diluye con 50 ml de éter y se lava con 2 x 120 ml de agua. Después de secar y concentrar para dar un líquido pálido (350 mg) sin purificación adicional para la reacción de la siguiente etapa.

(3aR,8aS)-7-fenetil-1-((S)-1-fenil-etil)-decahidro-pirrol[2,3-c]azepina (G): A una solución (0,02 M) de lactama (1 equivalente) en THF a -20 °C se añade lentamente una solución (0,02 M) de LiAlH_4 (2 equivalentes) en THF. Después de agitar a TA durante 1,5 horas, la solución se diluye con éter (1x5 veces el volumen de la solución) y se lava con agua (2 veces el volumen de la solución), se seca y se concentra. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 97/3) para dar el producto (rendimiento 70-90 %).

(3aR,8aS)-7-fenetil-decahidro-pirrol[2,3-c]azepina (H): Una solución/suspensión de reactivo (< 1 g) y Pd al 10 % en carbono (20 % en peso) en MeOH (10 ml, con 2 gotas de ácido acético) en un matraz redondo de 1000 ml se agita vigorosamente a TA en hidrógeno gaseoso (a presión atmosférica) desde un globo durante 4-8 horas. Después de desgasificar por vacío doméstico durante 10 minutos, la mezcla de reacción se filtra para eliminar el catalizador y se concentra. El producto en bruto se diluye con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (8/2, cantidad razonable) y se neutraliza con NH_4OH al 10 % a pH = 7-8. Después de secar y concentrar para dar el producto (80 % de rendimiento cuantitativo) sin purificación para la reacción de la siguiente etapa.

LBW 242: Preparado a partir del compuesto H utilizando el esquema que se describe a continuación:



Compuesto (7): A una solución de 6 en diclorometano (25 ml) se añade secuencialmente diisopropiletilamina (4,17 ml, 24 mmol), t-Boc-L-ciclohexilglicina (1,54 g, 6 mmol) y una solución de 0,45 M de HOBT/HBTU en DMF (16 ml, 7,19

mmol). La mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente, luego se diluye con EtOAc (200 ml) y se lava secuencialmente con ácido cítrico ac. 1 M (50 ml), agua (50 ml), NaHCO₃ ac. sat. (50 ml) y salmuera (2x50 ml). La capa orgánica se seca y se concentra al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice; Hexano/EtOAc 1:9) para proporcionar un aceite de color amarillo. El aceite de color amarillo se disuelve en diclorometano (20 ml), se añade TFA (10 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se concentra y el residuo se disuelve en diclorometano (100 ml) y se neutraliza con bicarbonato de sodio saturado. La solución se extrae con diclorometano (3x50 ml). Los extractos orgánicos se combinan, se secan y se concentran al vacío para proporcionar 1,75 g (79 % en dos etapas) del compuesto base que se usa en la siguiente etapa sin purificación o caracterización adicional.

LBW 242: A una solución de 7 (1,75 g, 4,74 mmol) en diclorometano (25 ml) se añade secuencialmente diisopropiletilamina (3,30 ml, 19 mmol), t-Boc-N-metil-L-alanina (0,97 g, 4,74 mmol) y una solución de 0,45 M de HOBt/HBTU en DMF (13 ml, 5,691 mmol). La mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se diluye con EtOAc (200 ml) y se lava secuencialmente con ácido cítrico 1 M (50 ml), agua (50 ml), NaHCO₃ ac. sat. (50 ml) y salmuera (2x50 ml). La capa orgánica se seca y se concentra al vacío. El residuo se disuelve en diclorometano (20 ml), se añade TFA (10 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se concentra y el residuo se disuelve en diclorometano (100 ml) y se neutraliza con bicarbonato de sodio saturado. La solución se extrae con diclorometano (3x50 ml). Los extractos orgánicos se combinan, se secan y se concentran al vacío. El residuo se purifica mediante HPLC (gel de sílice C-18, CH₃CN/H₂O al 20 % en TFA al 0,5 %) para proporcionar g (36 % en dos etapas) del compuesto de base como sal de TFA.

EQUIVALENTES

La invención se ha descrito en el presente documento con referencia a determinados ejemplos y realizaciones solamente. No se ha hecho ningún esfuerzo para describir exhaustivamente todos los posibles ejemplos y realizaciones de la invención. De hecho, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar diversas adiciones, eliminaciones, modificaciones y otros cambios a los ejemplos y realizaciones descritos anteriormente, sin apartarse del alcance previsto de la invención como se menciona en las siguientes reivindicaciones. Se pretende que todas esas adiciones, eliminaciones, modificaciones y otros cambios se incluyan dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende una cantidad inmunogénica de un antígeno procedente de tumor o antígeno tumoral y un adyuvante que comprende un inhibidor de IAP en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoyl)-thiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
2. Una cantidad inmunoestimulante de un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de la respuesta inmunitaria de un sujeto, en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoyl)-thiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
3. Una cantidad inmunogénica de un antígeno y una cantidad inmunoestimulante de un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de una respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno, en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoyl)-thiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
4. Una cantidad inmunoestimulante de un inhibidor de IAP de acuerdo con la reivindicación 2 para usar de acuerdo con la reivindicación 2 o una cantidad inmunogénica de un antígeno y una cantidad inmunoestimulante de un inhibidor de IAP de acuerdo con la reivindicación 3 para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la respuesta inmunitaria está mediada por uno o más tipos de células inmunitarias seleccionadas del grupo que consiste en células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T, células NK, células NKT, macrófagos, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+.
5. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y una cantidad inmunogénica de un antígeno para usar en el tratamiento de un cáncer en un sujeto, en donde dicho inhibidor de IAP y dicho antígeno potencian la respuesta inmunitaria del sujeto al cáncer, en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoyl)-thiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
6. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y una cantidad inmunogénica de un antígeno de acuerdo con la reivindicación 5 para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el cáncer es un tumor sólido o una neoplasia hemática.
7. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y una cantidad inmunogénica de un antígeno de acuerdo con la reivindicación 5 para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el antígeno comprende una célula cancerosa, en donde dicha célula cancerosa se obtiene preferentemente del sujeto.
8. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y una cantidad inmunogénica de un antígeno de acuerdo con la reivindicación 7 para usar de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la célula cancerosa es incompetente en proliferación.
9. Una cantidad inmunoestimulante o cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y una cantidad inmunogénica de un antígeno de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 5 para usar de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 5, en donde el antígeno y el inhibidor de IAP se administran secuencialmente.
10. Una cantidad inmunoestimulante o cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y una cantidad inmunogénica de un antígeno de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 5 para usar de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 5, en donde el antígeno y el inhibidor de IAP se administran simultáneamente, preferentemente como una composición única.
11. Un inhibidor de IAP para usar en la potenciación de una actividad inmunitaria de una célula inmunitaria activada en un sujeto, en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoyl)-thiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
12. Un inhibidor de IAP de acuerdo con la reivindicación 11 para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la actividad inmunitaria comprende potenciar la proliferación.
13. Un inhibidor de IAP de acuerdo con la reivindicación 11 para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la actividad inmunitaria comprende potenciar la producción de citocinas o potenciar la producción de anticuerpos.
14. Un inhibidor de IAP de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13 para usar de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde la célula inmunitaria activada se selecciona del grupo que consiste en una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T, una célula NK, una célula NKT, un macrófago, un linfocito T CD4+ y un linfocito T CD8+.
15. Un inhibidor de IAP de acuerdo con la reivindicación 13 para usar de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la actividad inmunitaria comprende potenciar la producción de anticuerpos y la célula inmunitaria activada se

selecciona del grupo que consiste en un linfocito B, una célula de plasma y una célula de hibridoma.

16. Un kit que comprende:

5 (a) una composición farmacéutica que comprende:

- (i) un inhibidor de IAP que es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoyl)-thiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;
- (ii) un antígeno procedente de tumor o antígeno tumoral; y
- 10 (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable;

(b) material de embalaje que encierra dicha composición farmacéutica; y

(c) instrucciones de uso de dicha composición farmacéutica para la potenciación de una respuesta inmunitaria de un sujeto.

15 17. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, o una cantidad inmunogénica de un antígeno y una cantidad inmunoestimulante de un inhibidor de IAP para usar de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP y una cantidad inmunogénica de un antígeno para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, o un kit de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el

20 antígeno es una molécula o composición capaz de estimular o potenciar un indicador de una respuesta inmunitaria.

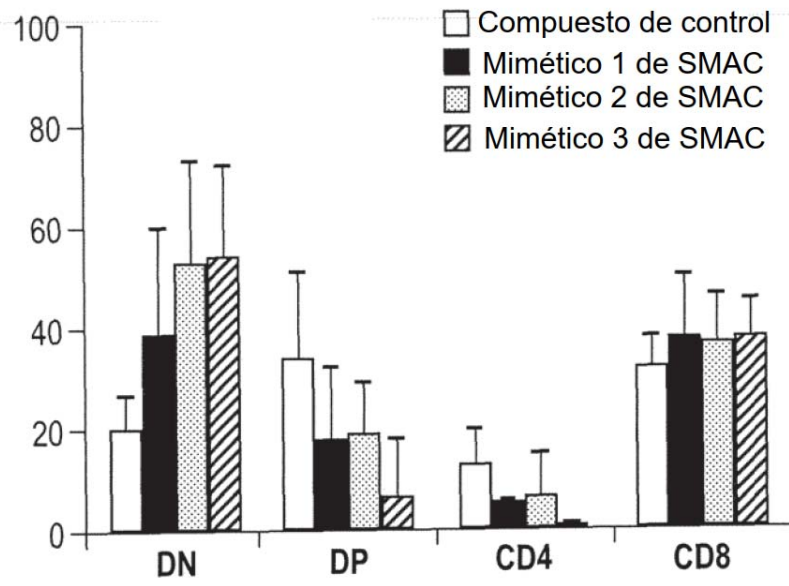


Fig. 1A

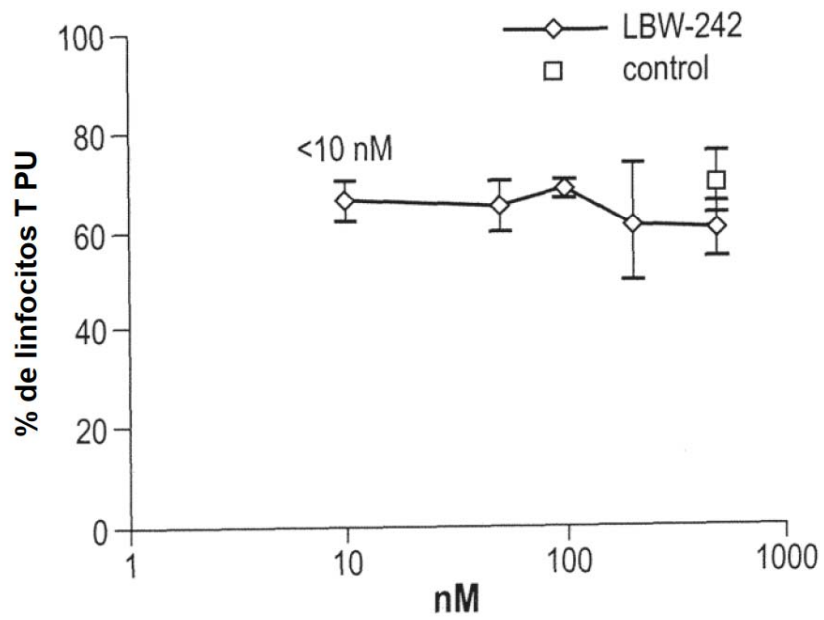


Fig. 1B



Fig. 1C

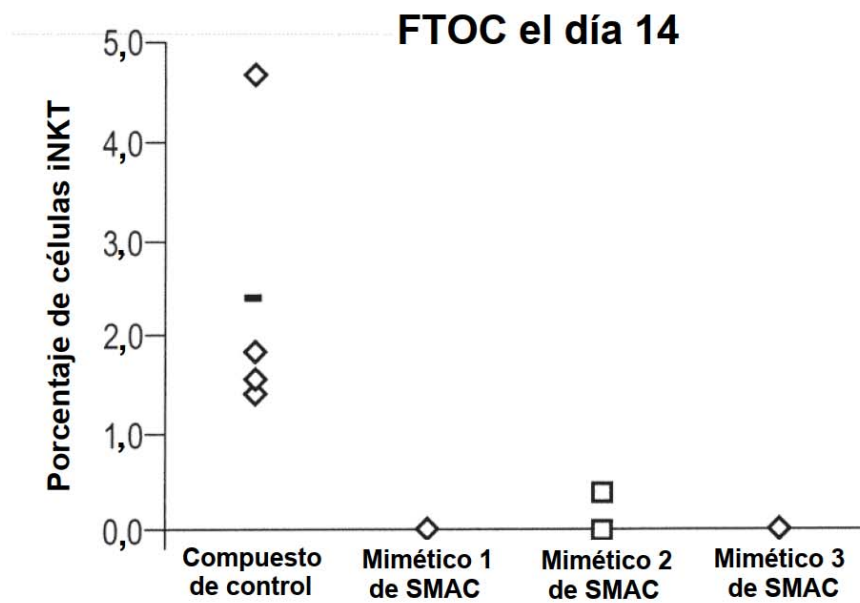


Fig. 1D

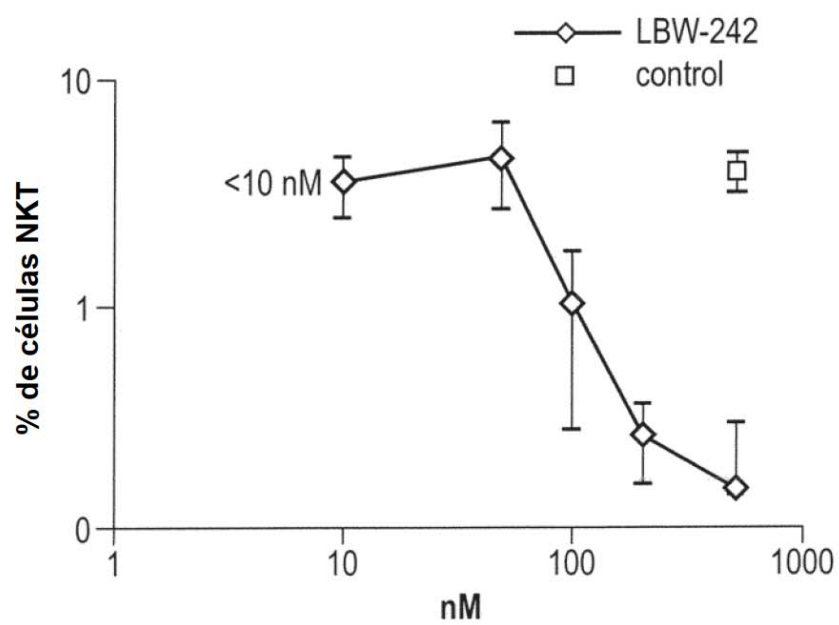


Fig. 1E

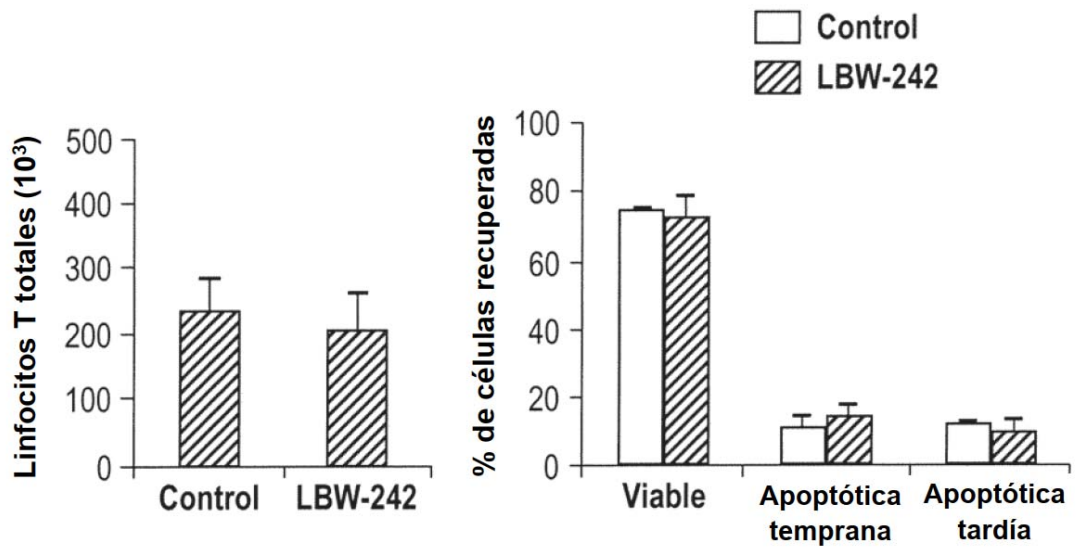


Fig. 2A

Fig. 2B

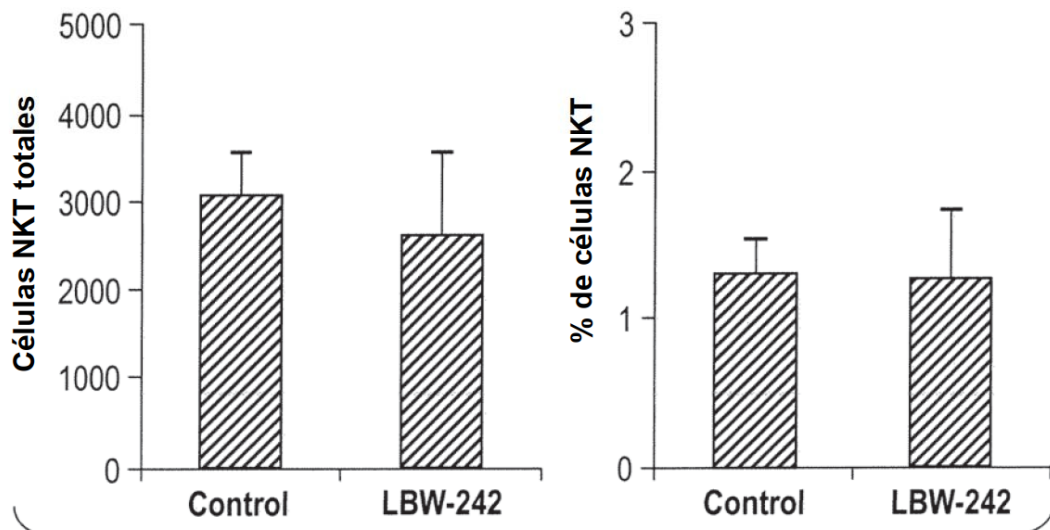


Fig. 2C

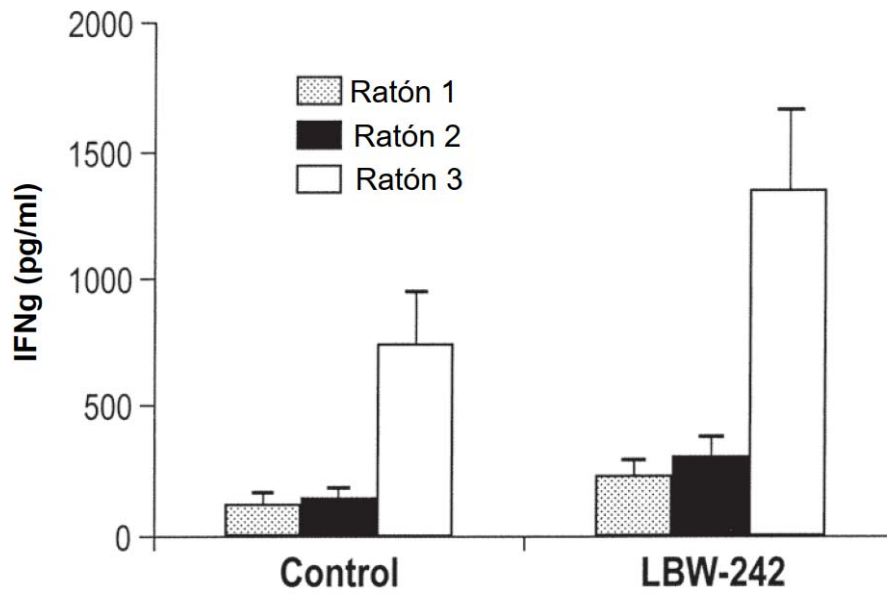


Fig. 3A

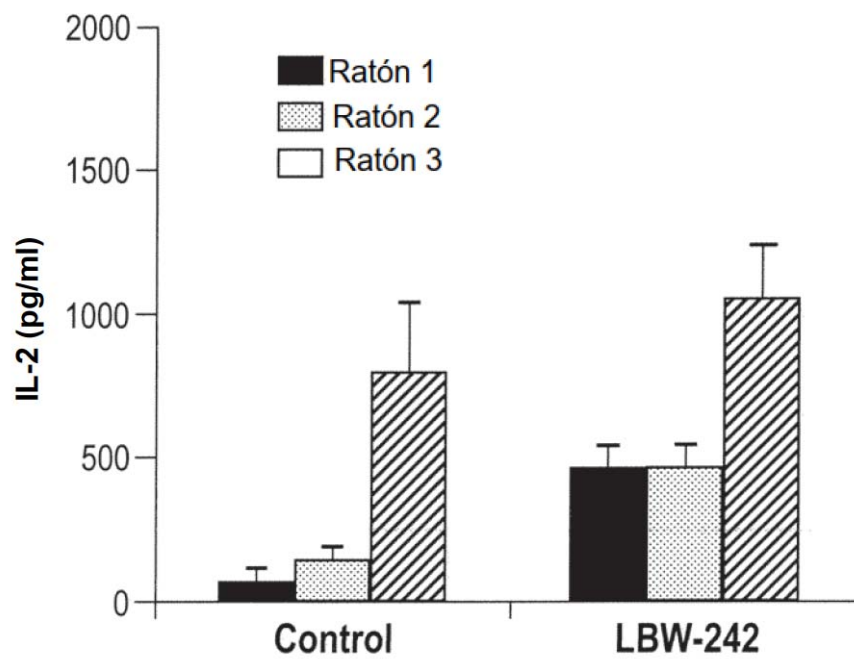


Fig. 3B

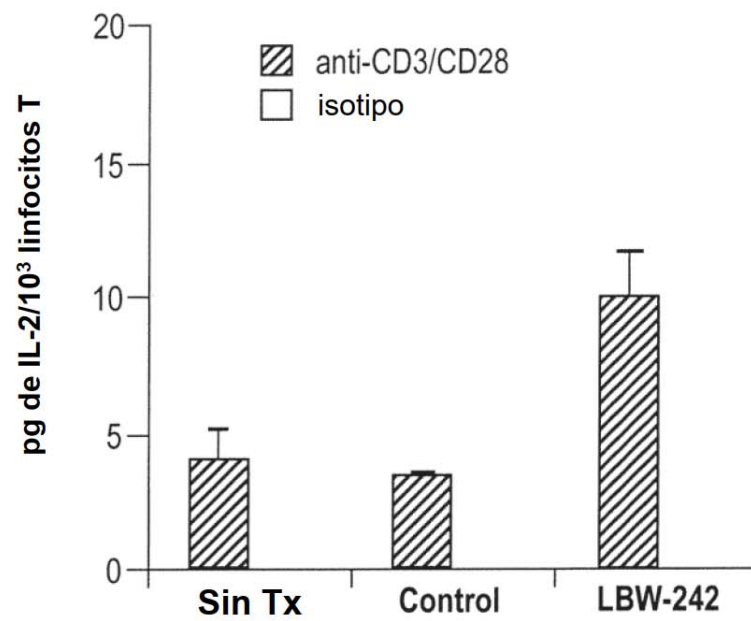


Fig. 3C

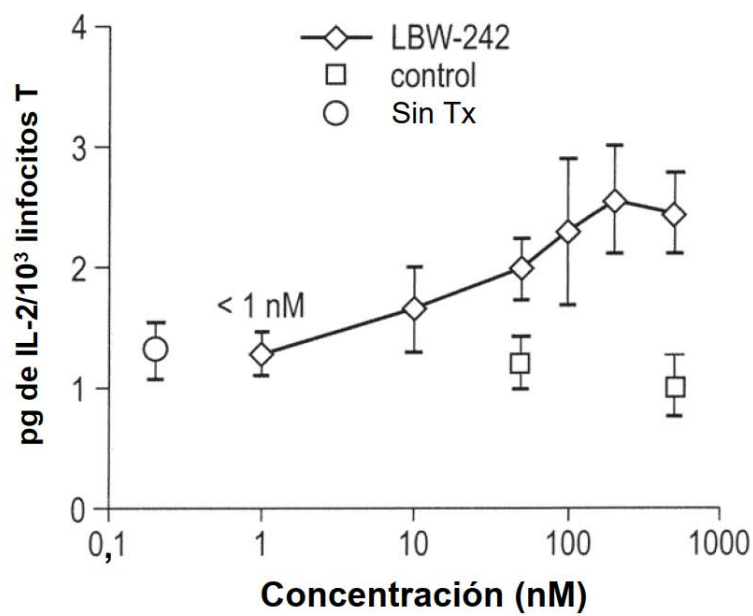


Fig. 3D

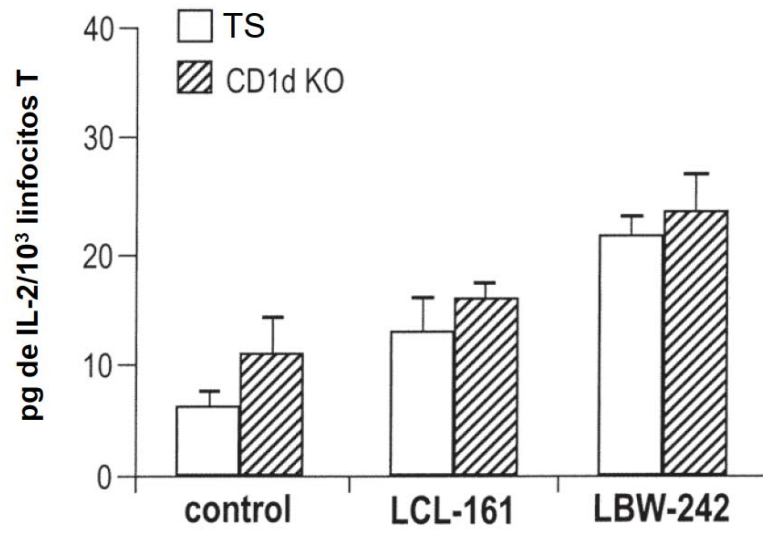


Fig. 4

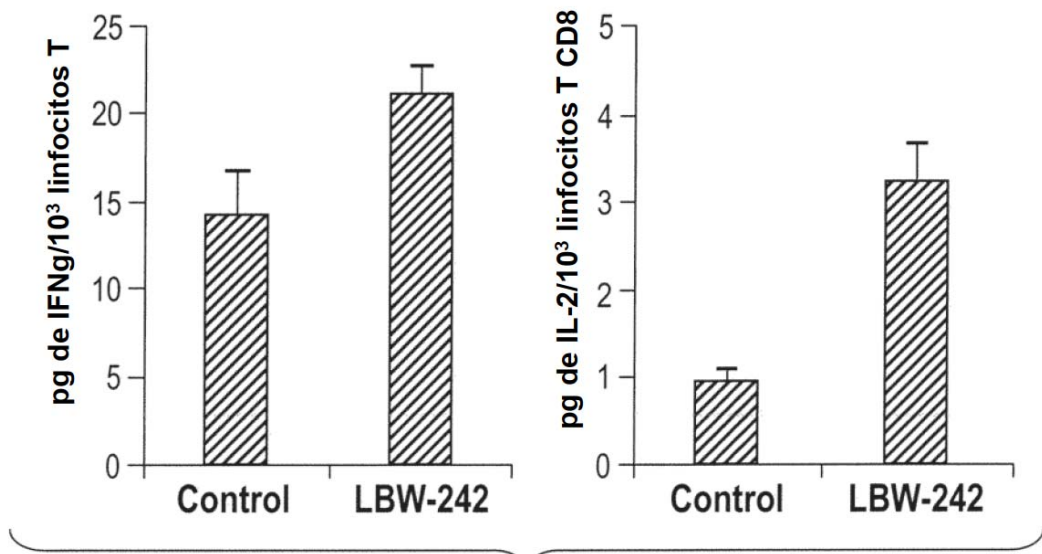


Fig. 5

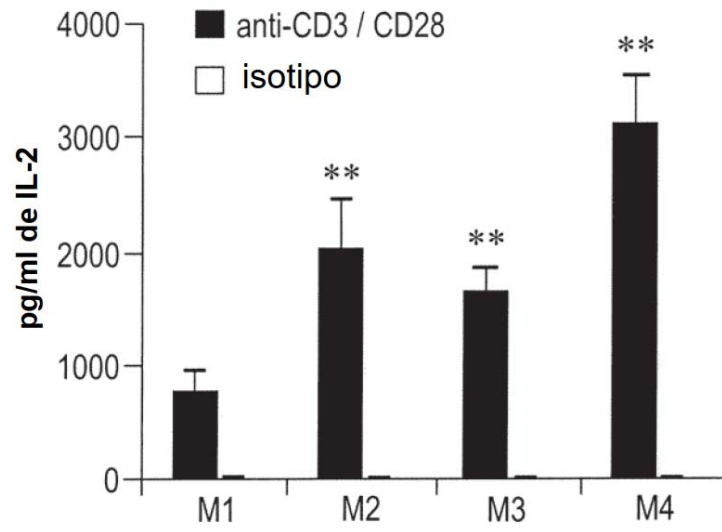


Fig. 6A

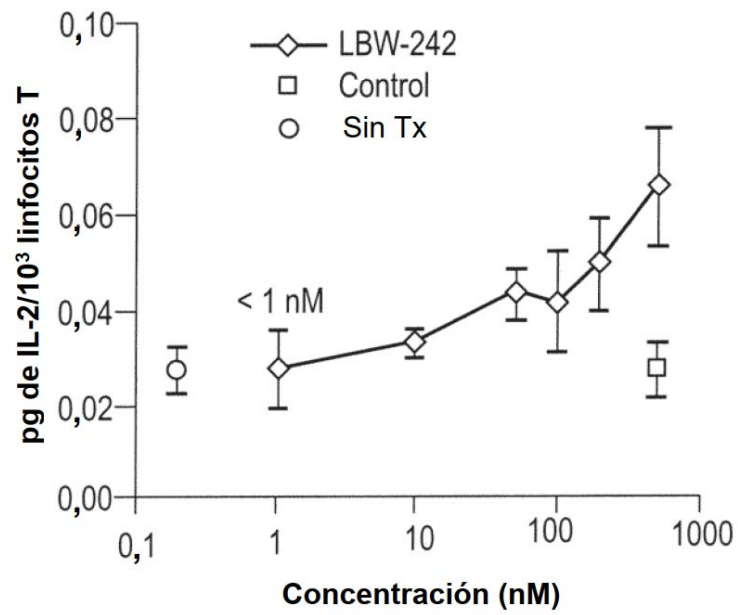


Fig. 6B

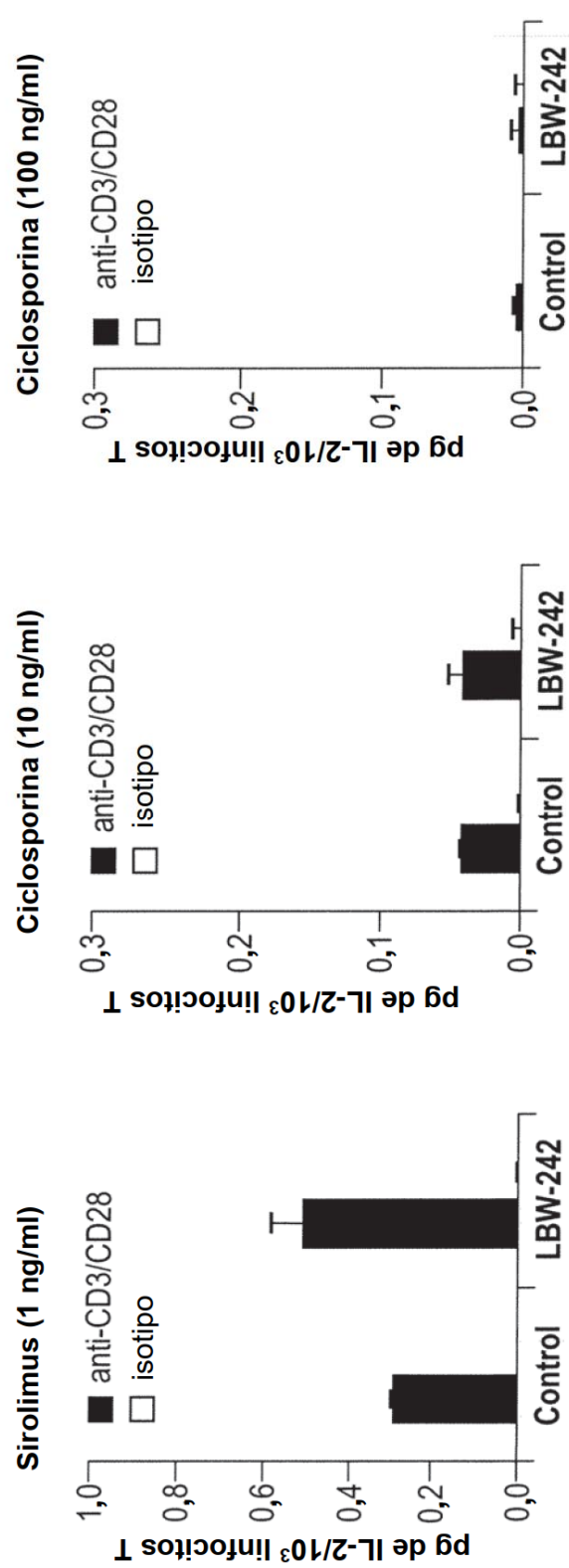


Fig. 6C

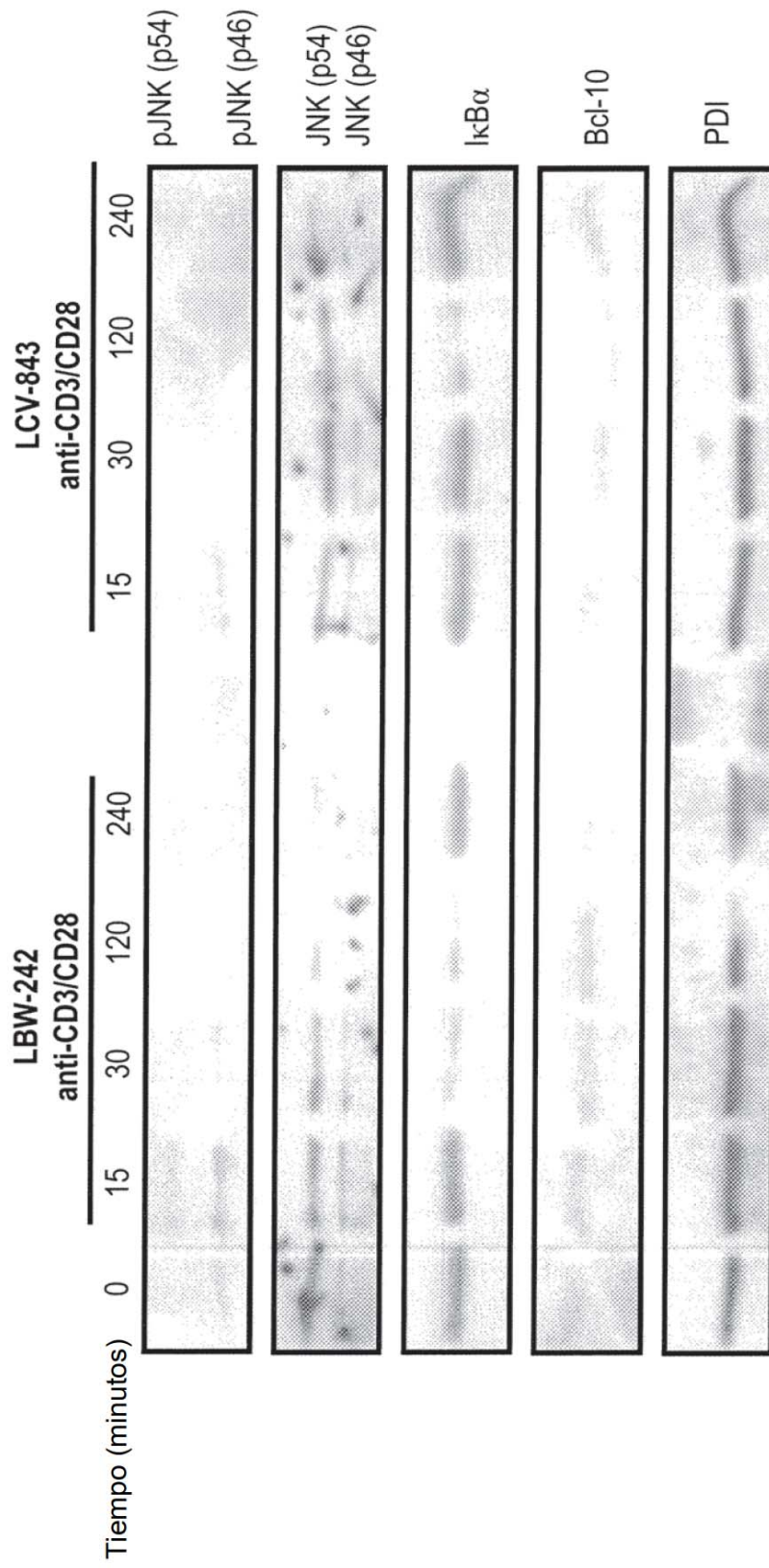


Fig. 7

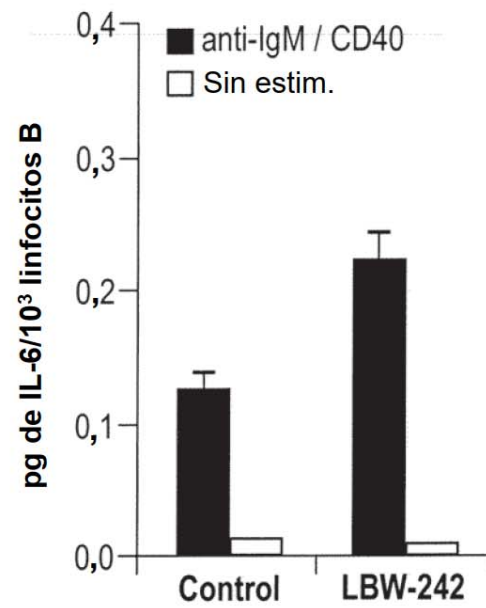


Fig. 8A

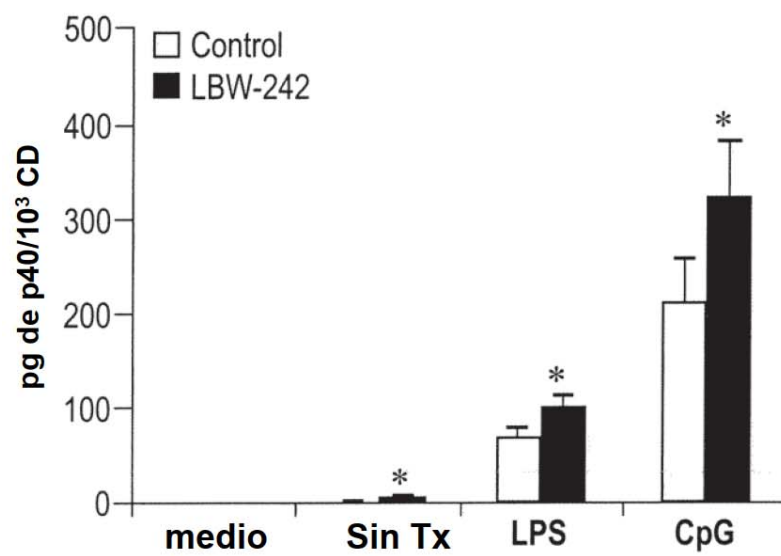


Fig. 8B

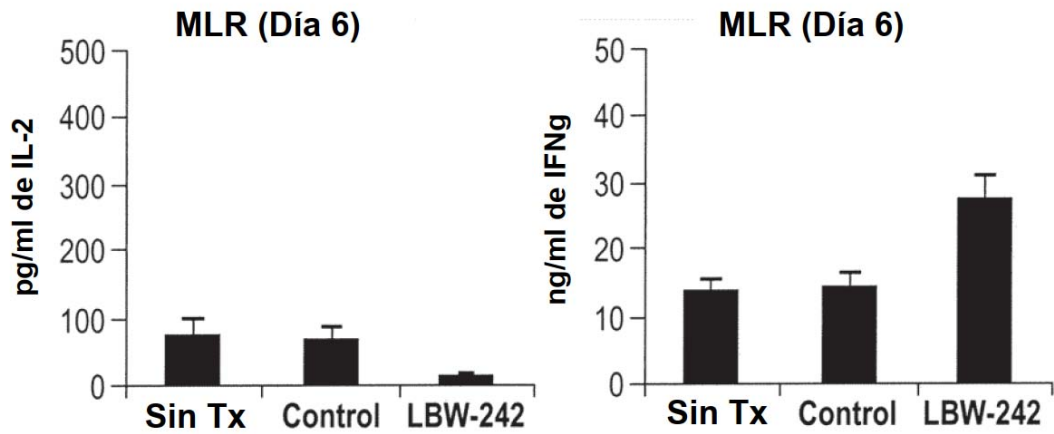


Fig. 9A

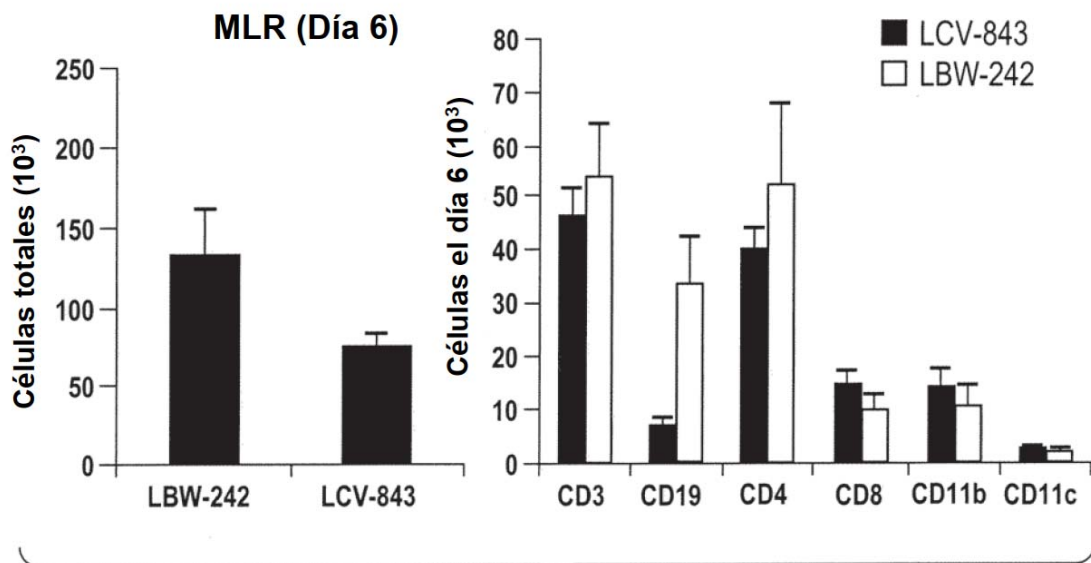


Fig. 9B

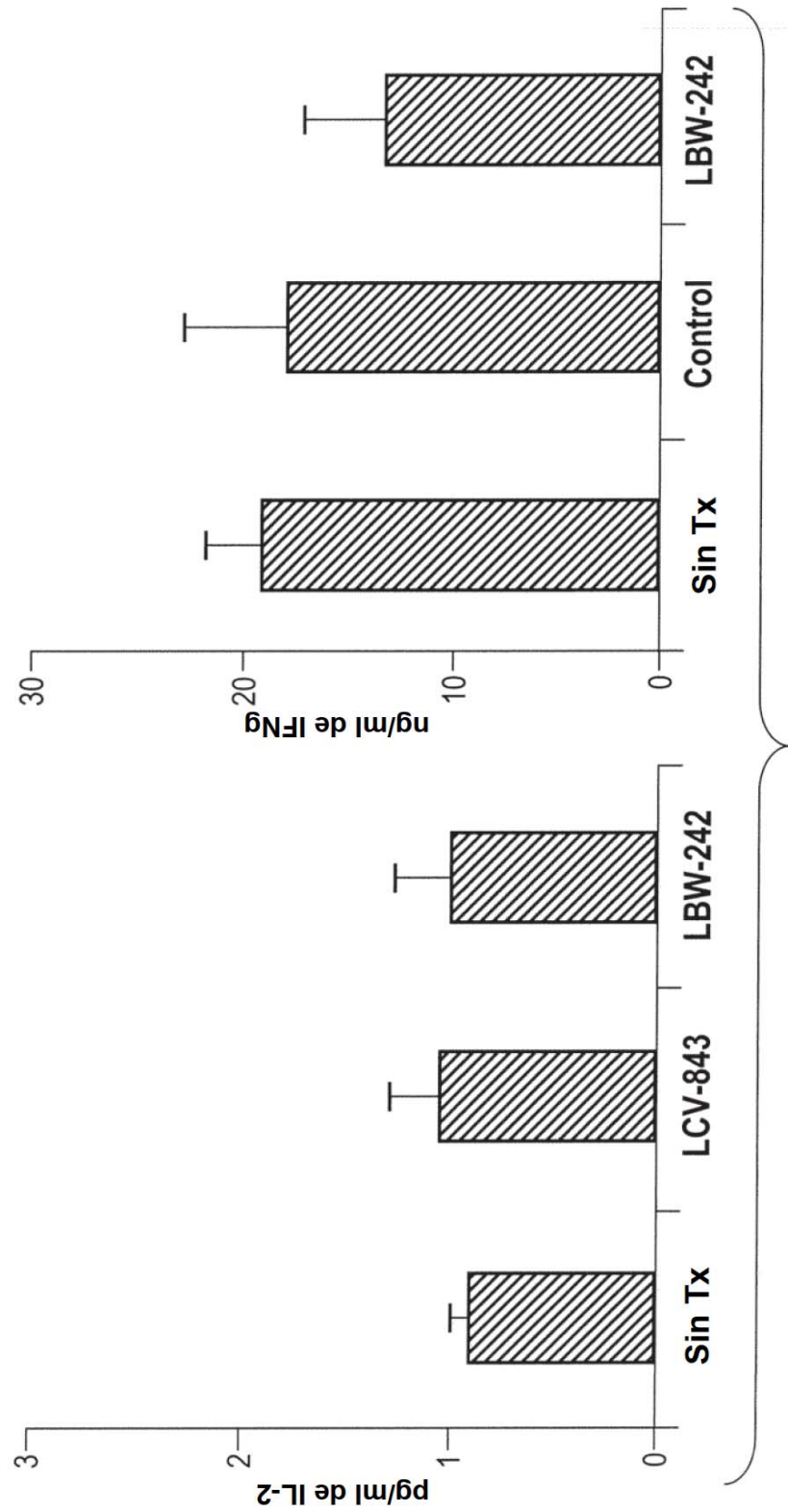


Fig. 10

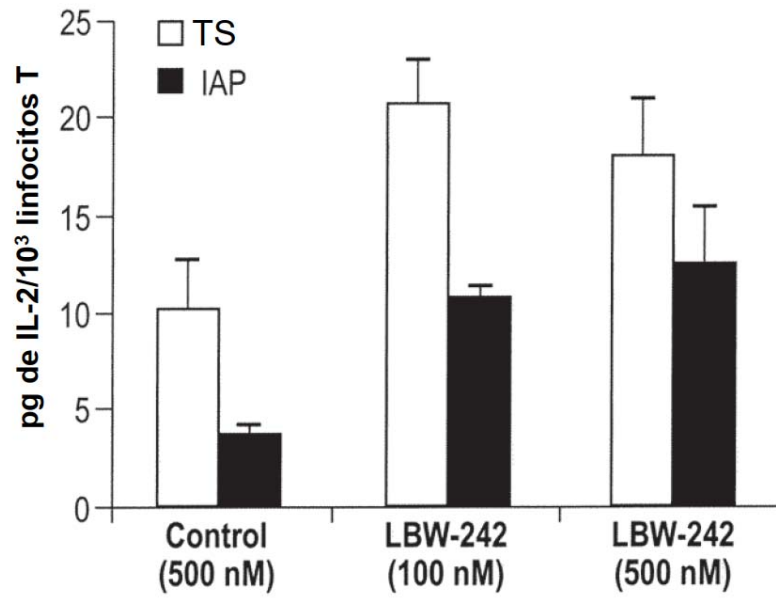


Fig. 11

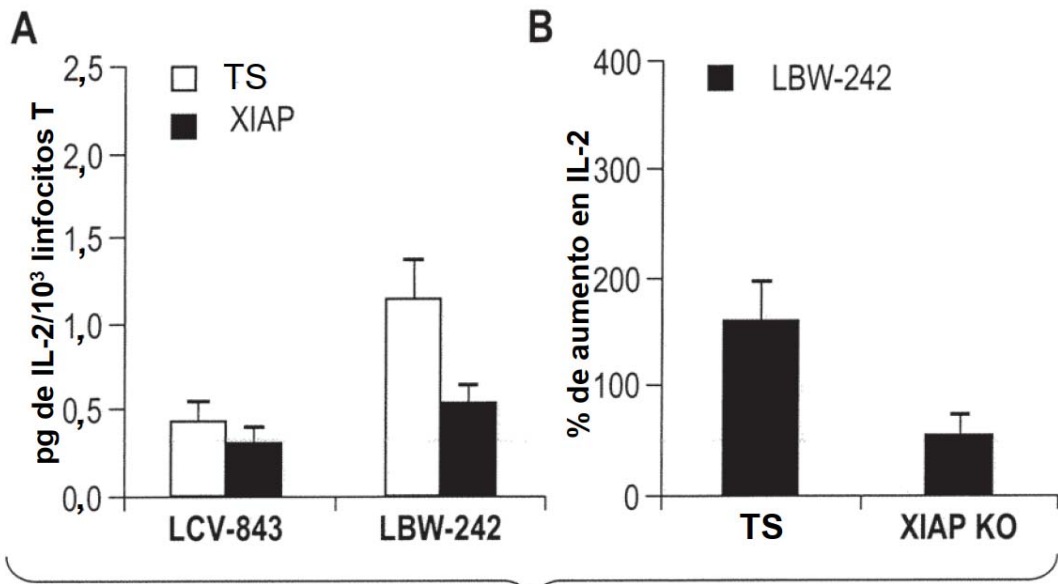
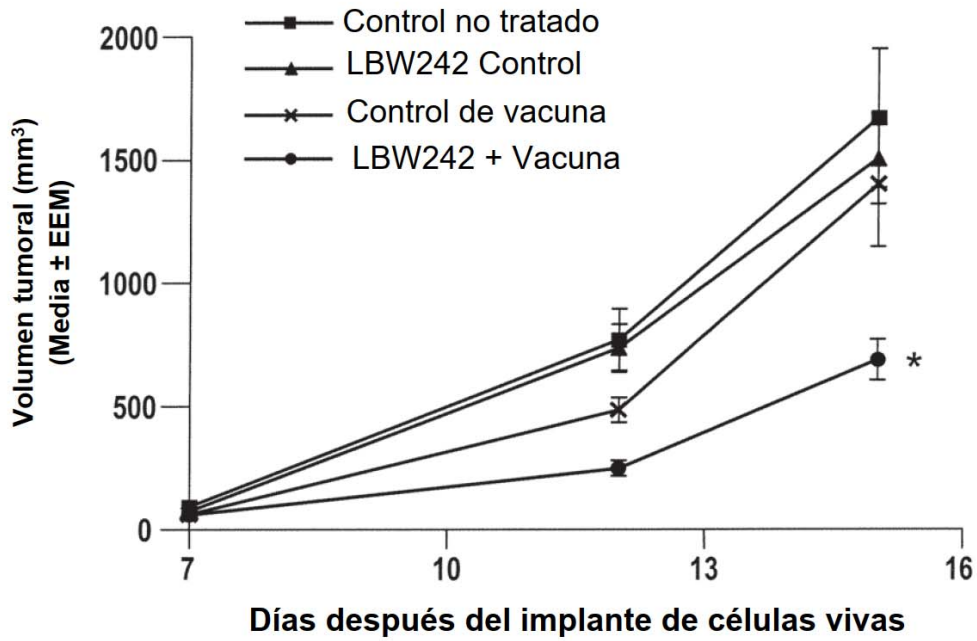


Fig. 12

Crecimiento tumoral B16



n = 8 por grupo

*p < 0,05 en comparación con los controles sin tratar y LBW, según lo determinado por el ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis

Fig. 13