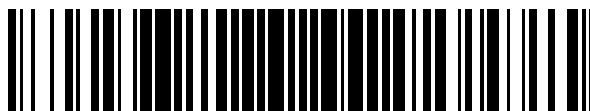


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 895**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7084 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61K 31/4545 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06828961 .0**
96 Fecha de presentación: **08.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1959990**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **PQS y sus conjugados como adyuvantes y sus usos en composiciones farmacéuticas**

30 Prioridad:
08.11.2005 EP 05024266

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.11.2012

73 Titular/es:
**HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR
INFEKTIONSFORSCHUNG GMBH (100.0%)
INHOFFENSTRASSE 7
38124 BRAUNSCHWEIG, DE**

72 Inventor/es:
**EBENSEN, THOMAS;
MORR, MICHAEL y
GUZMAN, CARLOS, A.**

74 Agente/Representante:
ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 390 895 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

PQS y sus conjugados como adyuvantes y sus usos en composiciones farmacéuticas.

Campo de la presente invención

5 La presente invención se refiere a nuevos adyuvantes y a sus usos en composiciones farmacéuticas, concretamente en vacunas. En particular, la presente invención proporciona nuevos compuestos útiles como adyuvantes y/o inmunomoduladores para vacunación profiláctica y/o terapéutica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, tumores y alergias. Los compuestos son particularmente útiles no sólo como adyuvantes sistémicos, sino preferiblemente como adyuvantes mucosos.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades infecciosas son la causa principal de morbilidad, representando un tercio de las muertes que se producen en el mundo cada año. Además, los agentes infecciosos son directamente responsables de al menos el 15% de nuevos cánceres, y también parecen estar implicados en la fisiopatología de varias enfermedades crónicas (por ejemplo, enfermedades inflamatorias, vasculares y degenerativas). Las enfermedades infecciosas tradicionales también son enormemente caras en cuanto a los costes asociados con la salud de los pacientes infectados y la pérdida de productividad en el trabajo.

15 Las principales estrategias usadas para prevenir enfermedades infecciosas son terapia y profilaxis. La vacunación se ha vuelto la medida más rentable para prevenir infecciones. Sin embargo, existen todavía muchas enfermedades para las que no se dispone aún de vacunas o las vacunas disponibles no son completamente satisfactorias debido a su baja eficacia, alta reactogenicidad, escasa estabilidad y/o altos costes. Por tanto, todavía existe una necesidad urgente tanto de vacunas nuevas como mejoradas.

20 A pesar del hecho de que las vacunas se han usado tradicionalmente para la profilaxis de enfermedades infecciosas, hallazgos recientes sugieren que también son una potente herramienta para la inmunoterapia de enfermedades transmisibles (por ejemplo, hepatitis viral, Infecciones por *Helicobacter pylori*, infecciones por virus del herpes, etc.). Además, las vacunas pueden usarse para la inmunoterapia o la inmunoprofilaxis de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, tumores, alergias y para el control de la fertilidad en poblaciones humanas y/o de animales. En particular, la última aplicación parece requerir que se provoquen respuestas mucosas eficaces a nivel del aparato reproductor.

25 La mayoría de las enfermedades infecciosas o bien están limitadas a las membranas mucosas o bien es necesario que los agentes etiológicos transiten por la mucosa durante las etapas iniciales de la infección. Por tanto, es deseable obtener no sólo una respuesta sistémica, sino también una respuesta inmunitaria mucosa local como resultado de la vacunación, bloqueando de ese modo tanto la infección (es decir, la colonización) como el desarrollo de la enfermedad. Esto puede dar como resultado una protección más eficaz frente a la infección, facilitando también la erradicación de enfermedades para las que los seres humanos son los únicos reservorios (es decir, bloqueando la transmisión a huéspedes susceptibles). Las vacunas administradas por vía parenteral estimulan principalmente respuestas sistémicas, mientras que las vacunas administradas por una vía mucosa imitan la respuesta inmunitaria producida por las infecciones naturales y pueden conducir a respuestas mucosas y sistémicas eficaces. Debido a la compartimentalización aparente del sistema inmunitario sistémico y mucoso, las vacunas administradas por vía parenteral son menos eficaces en la protección frente a patógenos mucosos (McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M. y Kiyono, H. (1992) The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10, 75-88). Por tanto, se requiere la administración de inmunógenos por vía mucosa para lograr una protección completa. Sin embargo, la mayoría de las vacunas disponibles se administran por vía parenteral, produciendo así, una inmunidad sistémica en el individuo.

30 La administración de vacunas por vía mucosa ofrece varias ventajas con respecto a la vacunación parenteral. Estas ventajas incluyen una facilidad de administración, la posibilidad de autoadministración (por ejemplo, mediante aplicación intranasal, rectal u oral), la eliminación de la posibilidad de infección cruzada no deseada debido al uso de agujas infectadas o trabajo no estéril, menores tasas de efectos secundarios, una mayor aceptación por el público, un mejor cumplimiento de los protocolos de vacunación (es decir, aumento de la eficacia global), una logística de administración más sencilla y menores costes de administración, siendo particularmente adecuada para programas de inmunización masivos. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta la compartimentalización al nivel del sistema inmunitario mucoso. De hecho, las respuestas inmunitarias que pueden observarse tras vacunación intranasal pueden no producirse necesariamente tras inmunización oral o intrarrectal. Por ejemplo, la vacunación oral puede no estimular respuestas eficaces en el aparato genitourinario y/o las vías respiratorias.

35 Desafortunadamente, la administración de antígenos por vía mucosa está asociada con un problema importante, concretamente que los antígenos administrados por esta vía son generalmente poco inmunogénicos. Esto es el resultado de diferentes mecanismos, tales como (i) eliminación acelerada de antígenos mediante el mecanismo de aclaramiento de huésped no específico (por ejemplo, actividad ciliar, peristaltismo), (ii) degradación de antígenos por enzimas locales, (iii) modificación estructural y/o alteración de antígenos como resultado de pH extremo (por ejemplo, ácido en el estómago, alcalino en el intestino), (iv) poca penetración de antígenos a través de la mucosa,

(v) acceso limitado de antígenos de vacuna a células presentadoras de antígeno y (vi) tolerancia periférica local.

Para superar estos problemas, se han usado diferentes estrategias, tales como asociación o atrapamiento de antígenos con partículas físicas o biológicas (por ejemplo, micropartículas, nanopartículas, fantasmas bacterianos), el uso de virosomas o partículas similares a virus, el uso de liposomas o ISCOM (“complejos inmunoestimulantes”), el uso de plantas transgénicas, producción de antígenos por portadores bacterianos o virales atenuados que actúan o bien como vectores convencionales o bien como portadores para vacunas de ácido nucleico y/o su administración con adyuvantes mucosos. Sin embargo, a pesar de la gran masa de evidencia experimental generada en estudios preclínicos durante los últimos años, casi no se han transferido candidatos a la proyección de desarrollo de vacuna.

El uso de adyuvantes óptimos desempeña un papel crucial en la vacunación. Los antígenos administrados sin adyuvante solo median rara vez una respuesta inmunitaria adecuada. Además, importa no sólo la intensidad sino también la calidad de la respuesta inmunitaria producida. La estimulación de un patrón de inmunización incorrecto puede conducir a reacciones inmunopatológicas y agravamiento de los síntomas de infección. En este contexto, el adyuvante puede ayudar en la respuesta inmunitaria deseada. En otras palabras, un adyuvante puede modular la respuesta inmunitaria o redirigir la respuesta inmunitaria para equilibrar la respuesta inmunitaria en la dirección deseada.

Las sustancias denominadas “adyuvantes” son aquéllas que se añaden y/o coformulan en una inmunización contra el antígeno real (es decir, la sustancia que provoca la respuesta inmunitaria deseada) con el fin de potenciar la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células (“Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie”, 1. Band, Spektrum, Akademischer Verlag 1995). Es decir, los adyuvantes son compuestos que tienen propiedades de inmunopotenciación, en particular, cuando se coadministran con antígenos. El uso de muchos adyuvantes se basa únicamente en la experiencia, y el efecto no puede explicarse ni predecirse de manera precisa. Los siguientes grupos de adyuvantes se usan tradicionalmente, en particular: hidróxido de aluminio, emulsiones de aceites minerales, saponinas, detergentes, compuestos de silicio, tiourea, endotoxinas de bacterias gram-negativas, endotoxinas de bacterias gram-positivas, bacterias inactivas o atenuadas vivas o partes de las mismas.

Se facilita una perspectiva general sobre los sistemas de suministro y adyuvantes mucosos conocidos actualmente, por ejemplo, las partículas, ICOM, liposomas y partículas similares a virus mencionadas anteriormente, para vacunas basadas en proteína, ADN y ARN, en Vajdy *et al.*, Immunol. Cell Biol., 2004, 82, 617 - 627. En ese documento, se comentan los enfoques disponibles actualmente en la inmunopotenciación de vacunas mucosas.

Es decir, se han descrito diversos adyuvantes mucosos que sirven como alternativa para los adyuvantes útiles para administración sistémica, por ejemplo, véase Vajdy *et al.*, citado anteriormente. Estos adyuvantes mucosos incluyen enterotoxina termolábil y mutantes destoxificados de la misma. En particular, se han desarrollado mutantes destoxificados genéticamente de enterotoxina termolábil de *E. coli* como adyuvantes mucosos útiles. Además, se conoce la toxina del cólera de *Vibrio cholerae* como adyuvante útil para vacunación mucosa. Además, se ha descrito la aplicación de dinucleótidos CpG no metilados. Se mostró que la CpG puede desviar la respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1 y puede modular respuestas inmunitarias preexistentes. También se describen las saponinas como sustancias inmunomoduladoras, predominantemente a través de la inducción de citocinas específicas que entonces modulan y/o activan la respuesta inmunitaria.

Además, como adyuvantes que pueden ser útiles en vacunación mucosa se han descrito los siguientes:

La molécula MALP-2 y conjugados de bisaxciloxipropilcisteína de la misma, por ejemplo, se conoce que una molécula de bispalmitoiloxipropilcisteína-PEG representa potentes estimulantes de macrófagos. Se mostró previamente la utilidad del MALP-2 como adyuvante, véanse por ejemplo, los documentos WO2004/009125 y WO2003/084568. En particular, se demostró que MALP-2 puede actuar como adyuvante mucoso eficaz potenciando la respuesta inmunitaria mucosa, por ejemplo, fomentando una expresión potenciada de anticuerpos IgA específicos de antígeno.

Además, se mostró que MALP-2 puede activar células dendríticas y células B, ambas desempeñan un papel importante en la inducción de una respuesta inmunitaria humoral específica. Además, estudios preliminares demostraron que una combinación de proteína Tat de VIH-1 biológicamente activa y MALP-2 sintética puede ser una vacuna prometedora con el componente de MALP-2 como adyuvante mucoso eficaz.

Desafortunadamente, la mayoría de los compuestos descritos anteriormente que son útiles como adyuvantes mucosos no pueden utilizarse debido a su toxicidad intrínseca, por ejemplo, el asentamiento retrógrado en tejidos neuronales de toxoides y/o toxinas bacterianas en/dentro de los derivados tras vacunación nasal.

Por tanto, ninguno de estos adyuvantes mucosos descritos anteriormente se ha aprobado aún, aunque, en la actualidad, sólo dos adyuvantes sistémicos han recibido aprobación para administrarse en seres humanos y, por tanto, se usan para la preparación de vacunas humanas. Estos adyuvantes son Alum y MF59. Sin embargo, ninguno es eficaz como adyuvante mucoso.

En los últimos años ha habido una búsqueda intensa de adyuvantes novedosos, incluyendo aquéllos para la vía de administración mucosa. Se ha encontrado que sólo unas pocas sustancias pueden potenciar respuestas mucosas.

Entre ellas, algunas actúan como portadores a los que los antígenos deben unirse o fusionarse a ellos. Se han encontrado muchos menos adyuvantes “verdaderos” que puedan emplearse de manera universal, tal como se expuso anteriormente.

5 Las células procariotas así como las eucariotas usan diversas moléculas pequeñas para la señalización celular y la comunicación intra e intercelular. Por ejemplo, 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, también conocida como señal de quinolona de *Pseudomonas* o PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) está implicada en la señalización celular de procariotas. La PQS se empaqueta en vesículas de membrana que sirven para el tráfico de esta molécula dentro de una población de bacterias. La eliminación de estas vesículas de la población bacteriana detiene la comunicación célula-célula e inhibe el comportamiento grupal controlado por PQS. Se mostró que la PQS media activamente su propio empaquetamiento y el empaquetamiento de otras quinolinas antimicrobianas producidas por *P. aeruginosa* en vesículas. Esto ilustra que una procariota tiene un sistema de tráfico de señales con características comunes a las usadas por organismos superiores y expone un mecanismo para el suministro de una señal crítica para coordinar el comportamiento grupal en *P. aeruginosa*. Por tanto, La PQS representa otra molécula muy importante en la señalización de célula con célula. Además, se ha especulado usar PQS u otros derivados de quinolina en el tratamiento de cáncer.

Recientemente, se describió una actividad inmunosupresora para 4-quinolonas sustituidas. En los documentos US 2004/0082579 o US 2004/0198978, se ha dado a conocer que, por ejemplo, 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona tiene actividad inhibidora sobre la proliferación de esplenocitos estimulados con ConA y actividad inhibidora de la proliferación sobre células mononucleares de sangre periférica humana cuando se estimulan con la lectina ConA. Además, la secreción de IL-2 se inhibió mientras a altas concentraciones PQS potencia la producción de TNF-alfa. Los autores de dicho documento especulan que los derivados de quinolona descritos en dicho documento presentan un efecto inhibitor sobre la proliferación de linfocitos en seres humanos y, por tanto, pueden usarse como inmunosupresor, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Además, en dicho documento se especula que dichos compuestos pueden usarse en una preparación de vacuna como adyuvante. Sin embargo, en ese documento no se proporcionan datos que puedan respaldar esta hipótesis, en particular, en vista de la actividad descrita de PQS como inmunosupresor sobre la proliferación de linfocitos. Además, en la publicación se especula que los compuestos pueden potenciar respuestas TH-2 sin que se presente ningún dato que sustancie lo mismo. Por el contrario, las quinolonas están potenciando la producción TNF-alfa a altas dosis en lugar de apuntar en favor de una respuesta TH-1. A dosis bajas, los experimentos *in vitro* mostrados en esta publicación demuestran que la PQS no tiene efecto sobre la liberación IL-2 y TNF-alfa a partir de PMC estimulados con ConA o LPS, respectivamente. Finalmente, no se proporcionan datos que muestren una respuesta inmunitaria humoral ni celular que potencie la actividad ni para la propia PQS ni tampoco para ningún derivado de PQS.

Por tanto, existe todavía una necesidad en la técnica anterior de proporcionar nuevos compuestos útiles como adyuvantes, particularmente como vacunas y/o como adyuvantes mucosos. En particular, existe una necesidad de adyuvantes mucosos que puedan producir una fuerte respuesta inmunitaria que represente una respuesta inmunitaria equilibrada o ajustada que facture tanto componentes humorales como celulares, por tanto, permitiendo la profilaxis o el tratamiento eficaz de diversos estados y enfermedades, específicamente de enfermedades infecciosas o cáncer.

Por tanto, el objeto de la presente invención es la provisión de adyuvantes mucosos que pueden producir y/o potenciar y/o modular una respuesta inmunitaria (preexistente) en un individuo o sujeto. En particular, la invención se basó en el objeto de desarrollar una gama de adyuvantes novedosos, altamente activos, particularmente adyuvantes mucosos que no son tóxicos para seres humanos y que puedan emplearse con una amplia variedad de principios activos para asistir en vacunas convencionales o novedosas tales como, en particular, vacunas profilácticas o terapéuticas, incluyendo vacunas contra el cáncer y de ADN.

45 Descripción de la invención

Este problema técnico se resuelve mediante la provisión de las realizaciones tal como se caracterizan en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere generalmente al uso de compuestos y conjugados tal como se representan en las formulas (I) y (II) o sales o solvatos de los mismos, útiles como adyuvantes, preferiblemente como adyuvantes mucosos. Además, la presente invención se refiere a nuevos productos farmacéuticos que comprenden al menos uno de los conjugados de los compuestos de las formulas (I) y (II) tal como se describen en el presente documento como adyuvantes, con portador(es) farmacéuticamente aceptable(s), opcionalmente junto con principios activos.

Es decir, la presente invención se refiere a la provisión del uso de conjugados o compuestos específicos útiles como adyuvantes en vacunación terapéutica o profiláctica. Dichos compuestos y conjugados son útiles como adyuvantes sistémicos y son particularmente útiles como adyuvantes mucosos que se aplican a través de la mucosa del individuo.

Los presentes inventores encontraron ahora que moléculas de señalización bacteriana son útiles como adyuvantes en vacunas para vacunación terapéutica o profiláctica. En particular, los compuestos según la fórmula general (I) y

(II) demuestran aplicabilidad como adyuvantes parenterales y, en particular, como adyuvantes mucosos.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “adyuvante” significa sustancias que se añaden y/o coformulan en una inmunización con el antígeno activo, es decir, la sustancia que provoca la respuesta inmunitaria deseada, con el fin de potenciar o producir o modular la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células (celular) frente al antígeno activo. Preferiblemente, el adyuvante según la presente invención también puede potenciar o producir la respuesta inmunitaria innata.

10 El término “terapia” o “tratamiento” se refiere a un proceso que pretende producir un cambio beneficioso en el estado de un individuo como un mamífero, por ejemplo, un ser humano a menudo denominado paciente, o animal. Un cambio beneficioso puede incluir, por ejemplo, uno o más de: restauración de función, reducción de síntomas, limitación o retardo de la progresión de una enfermedad, trastorno o estado, o prevención, limitación o retardo del deterioro del estado, enfermedad o trastorno de un paciente. Tal terapia abarca habitualmente la administración de un fármaco, entre otros.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “sistema de suministro” se refiere a un sistema que es más inerte y tiene menos efectos inmunomoduladores que los adyuvantes y que puede proteger y administrar la vacuna en el sitio de interés a través del sitio de administración. En particular, el sistema de suministro permite la presentación más eficaz del antígeno al sistema inmunitario. Ejemplos de sistemas de aplicación son virus, partícula similar a virus, ISCOM, nanopartículas, micropartículas, liposomas, virosomas y partículas similares a virus.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “pegilado” se refiere a la conjugación de un resto de compuesto con resto(s) de conjugado que contiene(n) al menos una unidad de polialquileo. En particular, el término pegilado se refiere a la conjugación del resto de compuesto con un resto de conjugado que tiene al menos una unidad de polietilenglicol.

Tal como se usa en el presente documento, el término “mucoso” se refiere a una superficie mucosa del cuerpo tal como la mucosidad nasal, oral, gastroentérica, rectal, urinaria, conjuntival, glandular, por ejemplo, de glándula mamaria, epitelial.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “conjugado” se refiere a compuestos que comprenden un resto de conjugado y un resto de compuesto. El resto de compuesto es una cualquiera de las fórmulas (I) o (II). El término “resto de conjugado” se refiere a un resto que se une al compuesto según la fórmula (I) o (II). El resto de conjugado tiene como objetivo aumentar la aplicabilidad de los compuestos dados a conocer en el presente documento.

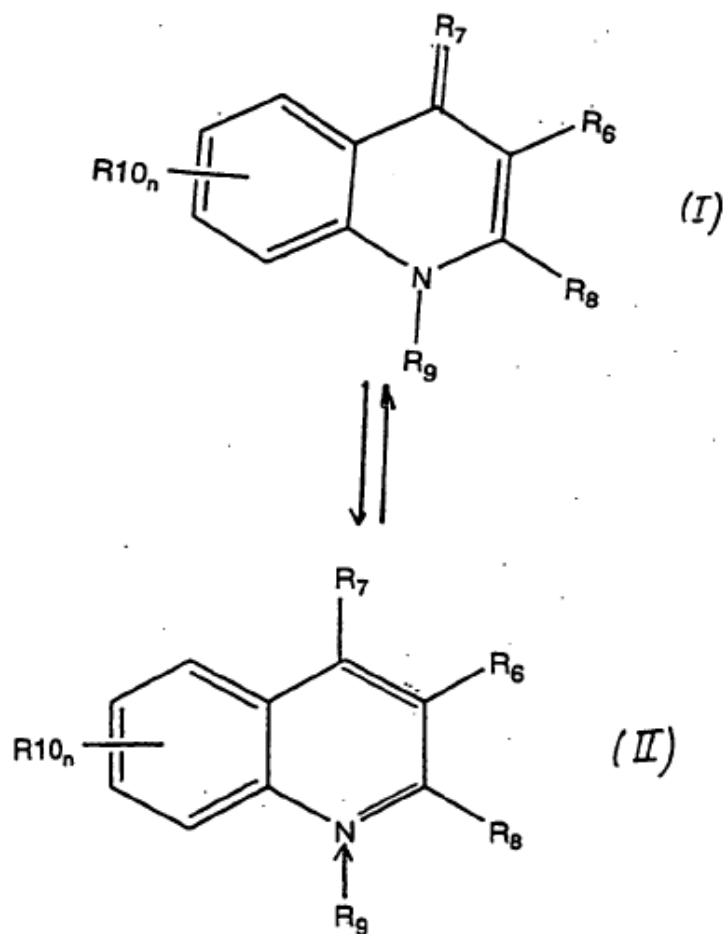
30 Tal como se usa en el presente documento, el término “estructura antigénica” o “antígeno” se refiere a una estructura que puede provocar una respuesta inmunitaria celular o humoral. La estructura antigénica, también conocida como epítipo, es la parte del antígeno que se presenta por las moléculas de CMH o similares a CMH. Además, el epítipo o estructura antigénica representa la parte de un antígeno reconocida por los anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “modular una respuesta inmunitaria” se refiere a cualquier cambio del estado presente de la respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede modularse en la medida en que se produzca la respuesta o se potencie o disminuya una respuesta inmunitaria preexistente. Además, la respuesta inmunitaria puede modularse variando la respuesta inmunitaria de una respuesta inmunitaria más humoral a una más celular o viceversa. Adicionalmente, la respuesta inmunitaria puede modularse cambiando o redirigiendo la respuesta de una respuesta Th1 a Th2 o Th3 o viceversa, en particular, para proporcionar una respuesta Th1/Th2 equilibrada. Además, la modulación de la respuesta inmunitaria puede abarcar la activación o potenciación de la respuesta inmunitaria innata.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “individuo” o “sujeto” que se usa en el que de manera intercambiable se refiere a un individuo o un sujeto que necesita una terapia o profilaxis. Preferiblemente, el sujeto o individuo es un vertebrado, incluso más preferido un mamífero, particularmente preferido un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo.

La presente invención se refiere al uso de al menos uno de los compuestos según la fórmula (I) o las isoformas tautoméricas mostradas en la fórmula (II)



en las que

5 R6 representa OH o H y R8 es una cadena lineal o ramificada, grupo hidrocarbonilo alifático saturado o etilénicamente insaturado que contiene de 1 a 20 átomos de carbono que puede estar sustituido opcionalmente con uno o más grupos sustituyentes seleccionados de halógeno, alcoxilo C1-C6, carboxilo, alcoxycarbonilo C1-C6 y NR1R2 en el que cada uno de R1 y R2 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C1-C6 lineal o ramificado o R1 y R2 junto con el átomo de N al que están unidos forman un grupo heterocíclico saturado seleccionado de piperidino, piperazino y morfolino;

R7 es O, OH, halógeno o grupo sulfato o fosfato;

10 R9 representa hidrógeno, CH3, N-óxido;

Cada R10 representa independientemente un grupo alquilo C1-C6 lineal o ramificado o alcoxilo C1-C6 lineal o ramificado o un halógeno;

n es un número entero de desde 0 hasta 4;

o conjugados de los mismos, y sales o solvatos de los mismos,

15 como adyuvante(s) para vacunación terapéutica o profiláctica.

En la fórmula (I) y (II), cada sustituyente R10 es preferiblemente de manera independiente un grupo metilo. Preferiblemente, n es 0, es decir, R10 está ausente. Además, en la isoforma tautomérica (II) el residuo R7 es un grupo hidroxilo cuando R9 es N-óxido, y en la segunda isoforma tautomérica (I) R7 representa un O cuando R9 es hidrógeno. R6 es preferiblemente un grupo hidroxilo. Además, en una realización preferida R8 es un grupo butilo, pentilo, hexilo, heptilo u octilo lineal o ramificado que puede estar sustituido.

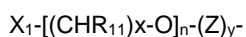
20 Como un compuesto de fórmula (I) o (II), se prefiere particularmente un derivado de 3-hidroxiquinolona, en particular 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona que también se denomina PQS o un derivado de la misma así como conjugados

pegilados derivados a partir de la misma.

Con el término "que puede estar sustituido" se quiere decir la sustitución con un grupo alquilo C1-C6 lineal o ramificado o un grupo alcoxilo C1-C6 lineal o ramificado y/o con un halógeno, grupo hidroxilo o grupo carboxilo.

5 El resto de conjugado del conjugado según la presente invención es un resto de conjugado tolerado fisiológicamente, unido covalentemente, que es adecuado para convertir los compuestos según la fórmula (I) o (II) en una forma más soluble en agua tal como se define en la reivindicación 2. El resto de conjugado se caracteriza porque proporciona buena hidratación y no es inmunogénico. Además, la unión con el resto de conjugado permite reducir la cantidad de adyuvante o principio activo necesario para lograr los efectos deseados y mejorar la biodisponibilidad de los compuestos a la vez que reduce la dosis requerida para lograr el efecto deseado.

10 El resto de conjugado del conjugado reivindicado en el presente documento, es un resto de conjugado que contiene al menos una unidad de polialquilenglicol de fórmula:



en la que

15 X_1 es hidrógeno o un hidrocarburo que puede contener heteroátomo(s), por ejemplo, un grupo alquilo C1-C6 lineal o ramificado;

Z es un grupo de unión divalente, tal como $C=O$, NH o CHR_{11} ;

R_{11} es independientemente uno cualquiera de hidrógeno, OH , OR_{12} o $CO-R_{13}$;

R_{12} es independientemente uno cualquiera de hidrógeno o cadena de alquilo C1-C6 lineal o ramificada;

R_{13} es independientemente uno cualquiera de hidrógeno. OH , OR_{12} o $NR_{14}R_{15}$;

20 R_{14} y R_{15} son independientemente uno cualquiera de hidrógeno o hidrocarburo que puede contener heteroátomo(s) y que puede formar un anillo;

n es un número entero de 1 a 100;

x es independientemente un número entero de 1 a 10;

y es un número entero de 0 a 10.

25 Preferiblemente, n es un número entero de 2 a 50, como de 2 a 10, en particular de 3 a 5.

y es de preferencia un número entero de 1 a 5, en particular, de 1 a 3, en otra realización preferida, y es 0.

Preferiblemente, x es un número entero de 2, 3 ó 4, en particular 2.

30 X_1 es preferentemente OR_{16} , $N(R_{16})_2$, SR_{16} o $COOR_{16}$, en los que cada R_{16} es individualmente hidrógeno, bencilo o cadena de alquilo C₁-C₆ lineal o ramificada, preferiblemente una cadena de alcoxilo C₁-C₆ lineal o ramificada, como un grupo metoxilo, etoxilo o propoxilo.

R_{11} es preferiblemente un átomo de hidrógeno.

35 Por tanto, la unidad de polialquilenglicol mencionada anteriormente puede contener preferiblemente subunidades de etilenglicol, propilenglicol o butilenglicol o combinaciones de los mismos. La longitud de cadena de cada una de las unidades de polialquilenglicol puede estar en el intervalo de 1 a 100 subunidades, preferiblemente, de 2 a 50 subunidades, como de 2 a 10 subunidades, particularmente en el intervalo de 3 a 5 unidades.

Particularmente preferido es el resto de conjugado, un residuo metoxipolialquilenglicol-carbonilo en el que el resto alquileo es un resto etileno o propileno. Una realización particularmente preferida de un conjugado según la presente invención se muestra en la figura 1.

40 Por tanto, preferiblemente los conjugados están en forma pegilada para aumentar la solubilidad en disolventes hidrófilos y entornos hidrófilos. Además, el resto de conjugado permite proteger el resto de compuesto, es decir, el resto de adyuvante mucoso activo, frente a la degradación enzimática, la modificación estructural debida al cambio del pH, la eliminación mecánica, etc. Por tanto, aumenta principalmente la estabilidad del compuesto. Otro efecto beneficioso de la conjugación es aumentar el tiempo de retención en el individuo, por ejemplo, retardar la excreción renal, a la vez que se tolera bien; por ejemplo, no siendo inmunogénico para dicho organismo.

45 Específicamente, el resto de conjugado comprende al menos dos cadenas que tienen unidades de polialquilenglicol. Es decir, el conjugado puede ser un compuesto ramificado en el que cada brazo contiene una unidad de polialquilenglicol. Particularmente preferidos son restos de conjugado en los que la unidad de polialquilenglicol es

una unidad de polietilen, polipropilen o polibutilenglicol.

5 En una realización particularmente preferida, el resto de compuesto según la fórmula (I) o (II) se une covalentemente con el resto de conjugado que es un resto ramificado en el que al menos dos brazos que contienen unidades de polietilenglicol tienen de 3 a 5 subunidades de etilenglicol y un grupo metoxilo en el extremo libre del grupo polietileno. En particular, el resto ramificado comprende 4 ó 6 brazos que tienen cada uno 3 subunidades de etilenglicol y un grupo metoxilo en el extremo libre del grupo polietileno.

10 En particular, el conjugado se caracteriza porque el resto de conjugado es PEG de 4 brazos-((S)-10-amino-6,9,13,16-tetraoxo-N,N',8,14-tetrakis(3,6,9,12-tetraoxatridec-1-il)-5,8,14,17-tetraazahenicosano-1,21-diamida), PEG de 6 brazos o PEG de 8 brazos, véase también <http://www.celares.com>. Otro resto de conjugado adecuado que comprende al menos una unidad de polietileno puede obtenerse por ejemplo, a partir de celares GmbH, Berlín, véase <http://www.celares.com>.

15 Los compuestos de fórmula (I) o (II) o conjugados de los mismos pueden estar en forma de sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las sales de fórmula (I) o (II) incluyen sales con ácidos añadidos, tales como sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico) o con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido maleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido glutámico, ácido pantoténico, ácido laurilsulfónico, ácido metanosulfónico y ácido ftálico).

Los compuestos de fórmula (I) o (II) o conjugados de los mismos pueden estar en forma de solvatos de los mismos (por ejemplo, hidratos).

20 Además, los compuestos de fórmula (I) o (II) pueden formar sales con iones catiónicos, como iones metálicos, en particular iones de metales alcalinos o alcalinotérreos, o NH_4^+ .

25 La síntesis de conjugados puede realizarse mediante métodos conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, un grupo hidroxilo puede convertirse en un residuo de halógeno, por ejemplo, Cl, Br, I y este residuo puede reaccionar con conjugados modificados que tienen un grupo amino libre. Por ejemplo, la síntesis de conjugados pegilados se describen en Veronese F.M., *Blomaterials* 22 (2001), 405-417 y Kódera Y., *et al.*, *Prog. Polym. Sd.* (1998), 23, 1233-1271 que se incorporan como referencia al presente documento.

30 En una realización preferida, el/los compuesto(s) o conjugado(s) según la fórmula (I) o (II), sus conjugados o sales o solvatos de los mismos son útiles como adyuvante(s) mucoso(s), en particular, para administración intranasal, intra-TLAN, oral, intrarrectal, conjuntival, intravaginal, intratecal, intrabronquial, intrapulmonar o intrauretral, administración en los conductos galactóforos de la mama o mediante inhalación.

Se prefiere particularmente la administración intranasal o la administración mediante inhalación usando formulaciones en aerosol adecuadas. Se conocen en la técnica formulaciones en aerosol útiles para administración de vacunas.

35 Los compuestos según la fórmula (I) o (II) sus conjugados o sales o solvatos de los mismos también son adecuados como adyuvante(s) sistémico(s). Por tanto, los adyuvantes descritos en el presente documento también son aplicables como adyuvante(s) parenteral(es), en particular, en administración subcutánea, intravenosa, intradérmica, tópica o intramuscular.

40 El adyuvante útil según la invención puede unirse mediante todos los métodos conocidos por el experto al antígeno o molécula activa destinada a la vacunación, incorporarse junto con esta última en partículas físicas (por ejemplo, micropartículas, nanopartículas, liposomas, ISCOM, polímeros) o biológicas (bacterias, partes bacterianas) o virosomas o mezclarse con el antígeno. Por ejemplo, el adyuvante puede coformularse o mezclarse con el antígeno. Para la unión a portadores, también es posible proporcionar moléculas transportadoras o proteínas transportadoras como portadores.

45 El/los compuesto(s) según la fórmula (I) o (II), su(s) conjugado(s) o sales o solvatos de los mismos es/están presente(s) preferiblemente en una preparación con el componente de vacunación activo (por ejemplo, el antígeno) que es adecuado y se proporciona para administración intranasal, intra-TLAN (tejido linfoide asociado a nasofaringe), aerosolizada, oral, intrarrectal, conjuntival, intravaginal, intrauretral o para administración en los conductos galactóforos de la mama. Particularmente, la preparación se proporciona en una formulación adecuada para tomarse a través de las vías respiratorias o del tracto gastrointestinal. Alternativamente, el uso de los compuestos como adyuvante mucoso según la invención puede estar presente en un kit para coadministración con una vacuna por una de las vías mencionadas anteriormente y adaptarse por tanto cuando sea apropiado. Es decir, la vacuna puede administrarse simultánea, secuencialmente o por separado al componente de vacunación activo.

55 Ambos compuestos y sus conjugados dirigen la respuesta inmunitaria hacia una respuesta inmunitaria Th1/Th2 equilibrada que se demuestra mediante la IFN γ potenciada representativa de una citocina Th1 e IL-4 representativa de una citocina Th2. Por tanto, los compuestos y conjugados según la presente invención pueden desviar la respuesta inmunitaria potenciando la respuesta inmunitaria Th2, lo que da como resultado una respuesta inmunitaria

Th1/Th2.

5 En otra realización, se describen métodos de tratamiento de individuos aquejados con una enfermedad o estado que puede tratarse modulando la respuesta inmunitaria que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un producto farmacéutico que comprende los compuestos según la fórmula (I) o (II) o sus conjugados, sales y solvatos de los mismos tal como se definen en el presente documento como adyuvante, particularmente como adyuvantes mucosos junto con un componente de vacunación activo, y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Preferiblemente, el método se refiere al tratamiento de individuos aquejados con una enfermedad infecciosa en el que la enfermedad infecciosa se produce por un agente infeccioso seleccionado entre los que provocan enfermedad humana o animal a nivel de las vías respiratorias, tracto gastrointestinal, aparato genitourinario, sistema osteoarticular, piel o mucosa.

15 Los compuestos o conjugados o sales o solvatos de los mismos tal como se definen en el presente documento son útiles en particular como adyuvantes mucosos para activar o potenciar *in vitro* y/o *in vivo* la función presentadora de antígeno de las células presentadoras de antígeno para una intervención terapéutica o profiláctica. Eso significa que, los adyuvantes pueden estimular macrófagos, pueden estimular o potenciar la respuesta inmunitaria humoral, por ejemplo, potenciando o estimulando la producción de anticuerpos. Además, los adyuvantes también pueden potenciar o estimular la respuesta inmunitaria celular, por ejemplo, aumentando la proliferación de células T. Además, es posible usar el/los adyuvante(s) para la estimulación *ex vivo* en cultivo celular, por ejemplo, para la producción de células dendríticas, etc. Estas células obtenidas mediante estimulación *ex vivo* pueden usarse para transferencia de células autólogas en trasplante o como vacuna a base de células contra enfermedades o estados, como las enfermedades y estados mencionados anteriormente, incluyendo cáncer, enfermedad autoinmunitaria o alergias.

25 Por tanto, en el caso del uso de los compuestos o conjugados o sales o solvatos de los mismos, tal como se definen en el presente documento, como adyuvante, la composición farmacéutica según la presente invención es una vacuna, que comprende dichos compuestos o conjugados o sales o solvatos de los mismos como adyuvante(s) farmacéuticamente aceptable(s) junto con el componente de vacunación activo (por ejemplo, el antígeno) y, opcionalmente, un portador, diluyente, conservante farmacéuticamente aceptable, adyuvante distinto al adyuvante según la presente invención, inmunomodulador o excipiente.

30 El componente de vacunación activo puede ser cualquier componente adecuado para obtener, potenciar o modular una respuesta inmunitaria en un individuo. El componente de vacunación activo es particularmente adecuado para administración intranasal, intra-TLAN, oral, intrarrectal, conjuntival, intravaginal, aerosolizada o intrauretral, o administración en los conductos galactóforos de la mama.

35 Por ejemplo, el componente de vacunación activo, el principio activo de la composición farmacéutica, comprende al menos uno o más antígenos diferentes en forma de péptidos, proteínas, polisacáridos, glicolípidos o ADN que codifica para los mismos o fantasmas bacterianos, virosomas o vacunas atenuadas.

Preferiblemente, el/los antígeno(s) son antígeno(s) tumoral(es) o antígeno(s) derivado(s) de agentes infecciosos. Los agentes infecciosos incluyen aquellos agentes que normalmente entran en el organismo del individuo atravesando la membrana mucosa.

40 La composición farmacéutica que comprende adyuvante(s) según la presente invención, un componente de vacunación activo, opcionalmente un portador adicional, diluyente, conservante, adyuvante distinto al adyuvante según la presente invención, inmunomodulador o excipiente puede contener adicionalmente componentes, como compuestos como una o más moléculas antiinflamatorias, moléculas antiangiogénicas, moléculas citotóxicas, moléculas inmunomoduladoras, preferiblemente quimiocinas, citocinas, ligando CD40, moléculas coestimuladoras o anticuerpos o mezclas de los mismos.

45 Sin embargo, los compuestos según la fórmula (I) o (II), sus conjugados sales y solvatos de los mismos tal como se definen en el presente documento para el uso como adyuvantes también pueden ser un componente de una composición farmacéutica proporcionada en una formulación adecuada para administración parenteral, en particular, en administración subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular.

50 Además, los compuestos para su uso según la presente invención son útiles en terapia tumoral incluyendo la generación *in vitro* o el cebado *in vitro* de células autólogas para transferencia adoptiva de células en terapia tumoral y trasplante. Además, los adyuvantes son útiles para la inducción de tolerancia cruzada frente a componentes microbianos, como endotoxinas, para proteger frente a choque séptico u otras formas graves de enfermedades inducidas por componentes microbianos.

55 Los compuestos según la fórmula (I) o (II), y, en particular, sus conjugados o sales o solvatos de los mismos también son útiles como adyuvantes para la preparación de un producto farmacéutico para prevenir o tratar enfermedades infecciosas, choque séptico, cáncer, tumores, enfermedades autoinmunitarias, alergias o procesos inflamatorios crónicos o agudos.

Los conjugados según la presente invención y sales o solvatos de los mismos, particularmente, los conjugados pegilados, pueden usarse como adyuvantes en productos farmacéuticos en forma de vacunas útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas, choque séptico, tumores, enfermedades autoinmunitarias, alergias o procesos inflamatorios crónicos o agudos. En particular, los conjugados o sales o solvatos de los mismos están contenidos en productos farmacéuticos como adyuvantes útiles para prevenir o tratar cáncer y/o tumores, tales como, melanoma, cáncer de próstata, de mama, colorrectal, de estómago, de garganta y cuello, de páncreas, cervicouterino, de ovarios, de huesos, leucemia y de pulmón; infecciones virales, tales como, hepatitis B, hepatitis C, virus de inmunodeficiencia humana, *Helicobacter pylori*, virus del herpes, etc.; infecciones bacterianas, tales como tuberculosis, lepra y listeriosis y infecciones parasitarias tales como malaria.

Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas como vacunas que comprenden conjugados de compuestos según la fórmula (I) o (II) o sales o solvatos de los mismos, en particular, conjugados que contienen al menos un resto de conjugado que comprende una unidad de polialquilenglicol, tal como se define en el presente documento o sales o solvatos de los mismos y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de los conjugados y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede administrarse con un portador fisiológicamente aceptable a un paciente, tal como se describe en el presente documento. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora u otra Farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, maltosa, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin (18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los conjugados mencionados anteriormente que contienen compuestos según la fórmula (I) y (II), sales o solvatos de los mismos, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Normalmente, el portador farmacéutica o terapéuticamente aceptable es un medio portador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que no es tóxico para el huésped o paciente.

En otra realización preferida, la composición se formula según procedimientos rutinarios como composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para calmar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran o bien por separado o bien mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre que indican la cantidad de principio activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de solución salina o agua estéril para inyección de modo que los componentes pueden mezclarse antes de la administración.

La composición farmacéutica para su uso en relación con la invención puede formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

"Cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz" tal como se aplica a las composiciones de la presente invención se refiere a la cantidad de composición suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado implicará normalmente un aumento de las respuestas inmunológicas frente a la infección o una supresión de las respuestas a procesos inflamatorios.

Pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelo animal. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra directamente o en combinación con un adyuvante.

El término “administrado” significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica mencionada anteriormente que comprende los conjugados que contienen el compuesto según la fórmula (I) y (II), sales y solvatos de los mismos tal como se definen en el presente documento a un individuo. Por “cantidad terapéuticamente eficaz” quiere decirse una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y se determinará por el experto en la técnica usando técnicas conocidas. Tal como se conoce en la técnica y se describió anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para administración sistémica frente a localizada, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción del fármaco y la gravedad del estado y se determinará con experimentación rutinaria por los expertos en la técnica.

Además, la composición farmacéutica puede contener adicionalmente componentes, por ejemplo, compuestos como una o más moléculas antiinflamatorias, moléculas antiangiogénicas, moléculas citotóxicas, moléculas inmunomoduladoras, preferiblemente quimiocinas, citocinas, ligando CD40, moléculas coestimuladoras o anticuerpos o mezclas de los mismas.

Además, la composición farmacéutica descrita en el presente documento puede caracterizarse porque los componentes de la composición farmacéutica se asocian y/o incorporan y/o recubren en una partícula física, preferiblemente micropartícula, nanopartícula, liposoma, ISCOM, copolímero y/o partícula biológica, preferiblemente fantasmas bacterianos.

Los métodos son aplicables tanto para terapia humana como para aplicaciones veterinarias.

La administración de la composición farmacéutica como vacuna puede realizarse en una variedad de formas tal como se comentó anteriormente, incluyendo, pero sin limitarse a, por vía oral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, intraarterial, intranodal, por vía intramedular, intratecal, intraventricular, por vía intranasal, conjuntival, intrabronquial, por vía transdérmica, por vía intrarrectal, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intrapulmonar, por vía vaginal, por vía rectal o por vía intraocular.

El médico encargado y los factores clínicos determinaran el régimen de dosificación. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, se prevén dosis inferiores o superiores a este intervalo a modo de ejemplo, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente.

En una realización de la invención, se refiere a un kit que contiene el compuesto o conjugado según la presente invención o sales o solvatos de los mismos como adyuvante y un antígeno que comprende una estructura antigénica y, opcionalmente, un portador, diluyente, conservante farmacéuticamente aceptables, adyuvantes distintos a los conjugados según la presente invención, inmunomoduladores o excipiente y, opcionalmente, instrucciones para preparar una vacuna.

La descripción y los ejemplos de la presente invención dan a conocer y abarcan estas y otras realizaciones. Puede recuperarse bibliografía adicional sobre uno cualquiera de los métodos, usos y compuestos que han de emplearse según la presente invención de bibliotecas públicas, usando por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública “Medline” que está disponible en Internet, por ejemplo, en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. El experto en la técnica conoce bases de datos y direcciones adicionales, tales como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, <http://www.tigr.org/>, y también pueden obtenerse usando, por ejemplo, <http://www.google.de>. Se proporciona una perspectiva general de información de patentes en biotecnología y un estudio de fuentes relevantes de información de patentes útiles para la búsqueda retrospectiva y para la concienciación actual en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: la figura 1 muestra las estructuras de PQS y PQS-PEG, respectivamente.

Figura 2: la figura 2 muestra una comparación de la expresión de anticuerpos del título de IgG específica de β-gal en suero de ratones inmunizados i.n. (A), s.c. (B) e i.n. (C). La administración intranasal de antígeno con PQS da como resultado la expresión aumentada de los anticuerpos IgG específicos de β-gal.

Figura 3: la figura 3 demuestra la mayor expresión de IgA específica de β-gal en lavado pulmonar y lavado vaginal de ratones inmunizados mediante β-gal/PQS-PEG por vía i.n. que en ratones que recibieron sólo β-gal o β-gal + PQS.

Figura 4: las figuras 4A y 4B muestran que PQS es un adyuvante eficaz para la estimulación de células de bazo en

vacunación s.c. (A) e i.n. (B). Además, la figura 4 ilustra que PQS-PEG es un adyuvante eficaz para la estimulación de célula de bazo en vacunación s.c. (A) e i.n. (B).

Figura 5: la figura 5 muestra el análisis de títulos de IgG específica de beta-gal en suero de ratones inmunizados. Los títulos de IgG específica de anticuerpo anti-beta-gal de los grupos inmunizados con PBS, beta-gal + PQS (10 µg), beta-gal + PQS-PEG o beta-gal sola de ratones inmunizados por vía s.c (A) o i.n.(B) se determinaron mediante ELISA. Los resultados se expresan como títulos de punto final. Los títulos de IgG representan el promedio de cinco animales por grupo experimental. Las diferencias fueron estadísticamente significativas a $p < 0,05$ (*) con respecto a los ratones que recibieron el antígeno solo. Se muestra uno representativo de los cuatros experimentos independientes. El EEM se indica mediante líneas verticales.

Figura 6: la figura 6 ilustra la secreción de citocinas Th1/Th2 de ratones que se inmunizan por vía s.c. (A) o i.n. (B), respectivamente. Se analizaron los sobrenadantes para determinar su contenido en IFN γ , TNF α , IL-2 IL-4 y IL-5 mediante matriz de perlas citométricas. Las diferencias fueron estadísticamente significativas a $p < 0,05$ (*) con respecto a ratones que recibieron el antígeno solo. Se muestra uno representativo de tres experimentos independientes.

Figura 7: la figura 7 muestra el aumento de expresión de citocinas Th1 y Th2 tras la nueva estimulación de células de bazo derivada de ratones inmunizados con β -gal/PQS o β -gal/PQS-PEG. Lo que se muestra antes de la inmunización subcutánea (A) y la inmunización intranasal (B).

Figura 8: la figura 8 ilustra la capacidad citotóxica de células efectoras estimuladas de nuevo con β -gal pulsadas con un péptido restringido por CMH I. (A) muestra los resultados para células de ratones inmunizados con β -gal/PQS y (B) es el control, que representa células de animales no inmunizados.

Ejemplos

1. La coadministración intranasal e intraperitoneal de PQS y PQS-PEG con un antígeno soluble estimula respuestas humorales sistémicas eficaces

Protocolo experimental: Se adquirieron ratones BALB/c (H2d) hembra de seis a ocho semanas de edad de Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Alemania) y se trataron según las directrices locales y de la Comunidad Europea. Se inmunizaron grupos de 5 ratones cada uno en el día 1, 14 y 28 con 30 µg de β -gal (Boehringer, Mannheim, Alemania), sola o como mezcla con 10 µg de PQS-PEG o con 10 µg de PQS (la estructura de dichos compuestos se muestra en la figura 1). Para inmunización intranasal (i.n.), se aplicaron 10 µl a cada orificio nasal, mientras que para la inyección por vía s.c. se resuspendió β -gal con o sin c-PQS-PEG o PQS, respectivamente, en un volumen de 20 µl de PBS por animal. Se conectaron muestras de suero en el día 38 tras la inmunización y se almacenaron a -20°C antes de la determinación de anticuerpos específicos de β -gal. Se recubrieron placas de ensayo de 96 pocillos Nunc-Immuno MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 µl de β -gal (Boehringer, Mannheim, Alemania) a 5 µg/ml en tampón carbonato 0,05 M (pH 8,2) por pocillo. Se añadieron diluciones dobles en serie de sueros en PBS con BSA al 1% y Tween 20 al 0,05% (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 16 h a 37°C. Tras el lavado, se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón específico de cadena γ biotinilado (Sigma Chemie, Deisenhofen, Alemania) y se incubaron las placas durante 1 h adicional a 37°C. Tras cuatro lavados, se añadieron 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pharmingen) a las células y se incubaron las placas a 37°C durante 30 min. Tras cuatro lavados, se desarrollaron reacciones con ABTS en tampón citrato-fosfato 0,1 M (pH 4,35) que contenía H $_2$ O $_2$ al 0,01%. Se muestran los valores para PQS como valores de DO405 tras diluciones dobles en serie (figura 2C). Tal como se demuestra en las figuras 2A a C, aumentó notablemente el título de IgG cuando se usó PQS. El efecto de PQS como adyuvante fue independiente de la vía de administración. Notablemente, en inmunización parenteral con PQS-PEG ya después del primer refuerzo puede observarse título superior a diferencia del uso de PQS como adyuvante, véase la figura 2B. Además, en inmunización i.n. el título con PQS-PEG fue significativamente mayor en comparación con PQS, véase la figura 2A.

En vista de los resultados *in vitro* anteriores, se han realizado estudio *in vivo* adicionales. En detalle, se determinaron las respuestas inmunitarias usando β -gal sola o como mezcla con PQS-PEG y PQS, respectivamente, como adyuvante aplicado por las dos vías más eficaces, concretamente s.c. e i.n. Por tanto, se evaluó la capacidad de PQS-PEG y PQS, respectivamente, para estimular respuestas inmunitarias humorales eficaces, determinando los títulos séricos de anticuerpos específica de β -gal en ratones vacunados.

2. La coadministración intranasal de PQS o PQS-PEG con un antígeno soluble estimula respuestas de anticuerpos de mucosa eficaces

Protocolo experimental: en el día 38, se sacrificaron los ratones y se realizó la toma de muestra final. Se obtuvieron lavados vaginales y pulmonares aclarando los órganos con 1 ml de PBS complementado con EDTA 50 mM, BSA al 0,1% y PMSF 10 mM. Luego se centrifugaron los lavados para eliminar los desechos (10 min. a 3000 x g) y se almacenaron los fluidos sobrenadantes at -20°C. Para determinar la concentración de IgA total presente en los lavados vaginales y pulmonares, se incubaron diluciones en serie de las muestras correspondientes en placas de microtitulación que se recubrieron previamente con anticuerpo de cabra anti-IgA de ratón (Sigma Chemie), como

anticuerpos de captura (100 µl/pocillo). Se usaron diluciones en serie de IgA de ratón purificada (Sigma Chemie) para generar una curva patrón.

Para investigar la capacidad de PQS-PEG y PQS, respectivamente, para estimular respuestas mucosas frente a antígenos coadministrados por vía i.n., se analizó la producción de IgA específica de β-gal en pulmón (figura 3) de animales inmunizados, inmunizados según el protocolo descrito en el ejemplo 1. Mientras que la inmunización i.n. con β-gal sola dio como resultado una producción débil de niveles detectables de IgA específica de β-gal en lavados pulmonares y lavado vaginal, se detectó un ligero aumento en los niveles de IgA específica de antígeno en animales inmunizados con β-gal y PQS. Además, en lavado pulmonar y lavado vaginal aumenta significativamente la expresión de IgA específica de β-gal usando PQS-PEG como adyuvante.

3. PQS-PEG y PQS estimulan eficazmente respuestas proliferativas mediadas por células T cuando se coadministran con antígenos solubles

Protocolo experimental: se extirparon los bazo y se reunieron para análisis de las respuestas inmunitarias celulares. Se cultivaron células en RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y L-glutamina 1 mM (GIBCO BRL, Karlsruhe, Alemania) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂ humidificada. Se ajustaron las suspensiones de células de bazo a 5×10^6 células/ml en medio completo, se sembraron las células con 100 µl por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) y se incubaron las placas durante 4 días en presencia de diferentes concentraciones de β-gal soluble. Es decir, se investigaron las respuestas inmunitarias mediadas por células T en el día 38 midiendo la proliferación tras la nueva estimulación *in vitro* con β-gal de células que antes se han recuperado de bazo. Se obtuvieron dichas células de bazo de ratones vacunados (dichos ratones se inmunizaron tal como se describió en el ejemplo 1) y se incubaron en presencia de diferentes concentraciones del antígeno β-gal soluble. Se sometió a prueba cada concentración por cuadruplicado. Durante las 18 h finales de cultivo, se añadió 1 µCi de [³H]-timidina (Amersham international, Friburgo, Alemania) a cada pocillo. Luego se recogieron las células sobre filtros de papel (Filtermat A; Wallac, Friburgo, Alemania) usando un colector de células (Inotech, Wohlen, Suiza) y se determinó la cantidad de [³H]-timidina incorporada en el ADN de las células en proliferación mediante un contador de centelleo β (Wallac 1450, Micro-Trilux). Se expresan los resultados como la media aritmética de captación de [³H]-timidina en cpm.

Treinta y ocho días tras la vacunación, se purificaron las células de bazo, se volvieron a estimular *in vitro* en presencia de diversas cantidades de β-galactosidasa y se estimó su capacidad proliferativa midiendo la incorporación de [³H]-timidina en su ADN usando un contador de centelleo β. Las células de bazo de animales inmunizados mediante inyección s.c. de β-gal sola, que se escogieron como control, presentaron una respuesta proliferativa significativa en comparación al grupo no inmunizado (figura 4A). Se observó un aumento adicional en la proliferación en células de bazo de animales a los que se les coadministró PQS-PEG y PQS, respectivamente, y antígeno. Mientras que la administración i.n. de β-gal sola no indujo una proliferación celular detectable, la coadministración de PQS-PEG y PQS, respectivamente, desencadenó la inducción de una respuesta proliferativa eficaz en cantidades pequeñas de antígeno (véase figura 4B).

Cabe señalar que se observó la respuesta proliferativa de células T con células de bazo de ratones inmunizados con PQS-PEG y PQS, respectivamente, y β-gal administrada por vía i.n. y s.c., respectivamente (véanse las figuras 4A y 4B).

En todos los casos se observó como efecto dependiente de la dosis cuando se aumentó la concentración de β-gal en el experimento de nueva estimulación. Por tanto, el uso de los nuevos adyuvantes PQS-PEG y PQS, respectivamente, dio como resultado un aumento estadísticamente significativo de la proliferación de células T tras administración i.n. y s.c. Estos resultados demuestran que PQS-PEG y PQS, respectivamente, pueden aumentar la respuesta inmunitaria celular.

4. Análisis de patrones de células T cooperadoras estimulados usando PQS-PEG y PQS, respectivamente, como adyuvante

Elisa de isotipo: se recubrieron placas de ensayo de 96 pocillos Nunc-Immuno MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 µl de β-gal (Boehringer, Mannheim, Alemania) a 5 µg/ml en tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6) por pocillo. Se añadieron diluciones dobles en serie de sueros o lavados en PBS con BSA al 1% y Tween 20 al 0,05% (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 2 h a 37°C. Tras el lavado, se añadieron anticuerpo de rata anti-IgG1 o IgG2a de ratón conjugado con biotina (Pharmingen, Hamburgo, Alemania) para determinar subclases de IgG. Se incubaron las placas durante 1 h adicional a 37°C. Tras cuatro lavados, se añadieron 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pharmingen) a las células y se incubaron las placas a 37°C durante 30 min. Tras cuatro lavados, se desarrollaron reacciones con ABTS en tampón citrato-fosfato 0,1 M (pH 4,35) que contenía H₂O₂ al 0,01%. Para determinar la concentración de subclases de IgG en suero, se obtuvieron curvas patrón recubriendo los pocillos con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón específica de isotipo, e incubando luego con anticuerpos IgG1 o IgG2 de ratón purificados (Dianova, Hamburgo, Alemania).

En la figura 5, se muestra el patrón de las diferentes subclases de los isotipos de IgG específica de antígeno de β -gal presente en los sueros de ratones vacunados. La figura 5B muestra los resultados para administración intranasal de β -gal sola, β -Gal y PQS, β -Gal y PQS-PEG. El protocolo para vacunación fue idéntico al protocolo descrito en el ejemplo 2. Tal como puede determinarse a partir de la figura 5B, la cantidad de anticuerpos específicos de antígeno del subtipo IgG1 aumentó fuertemente tras la administración intranasal del antígeno usando PQS y PQS-PEG como adyuvante mucoso. Además, también en el caso de administración sistémica, en este caso administración subcutánea, la expresión del isotipo de IgG1 aumenta fuertemente, véase la figura 5A. Los datos representan el título promedio de un grupo de 5 animales.

Por tanto, el uso de PQS y, en particular, de PQS-PEG mediante inmunización i.n. permite provocar una fuerte respuesta de anticuerpos específicos de antígeno. El desencadenamiento puede observarse no sólo tras administración intranasal sino también tras administración parenteral.

Protocolo experimental: se extirparon los bazo de ratones vacunados y se reunieron para análisis de las respuestas inmunitarias celulares. El protocolo para vacunación fue idéntico al protocolo descrito en el ejemplo 2. Se cultivaron células en RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomycin, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y L-glutamina 1 mM (GIBCO BRL, Karlsruhe, Alemania) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂ humidificada. Se ajustaron las suspensiones de células de bazo a 5×10^6 células/ml en medio completo, se sembraron las células con 100 μ l por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) y se incubaron las placas durante 4 días en presencia de diferentes concentraciones de β -gal soluble.

Para caracterizar el tipo de respuesta Th estimulada tras la inmunización, se midió el contenido de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 y TNF α en sobrenadantes de células de bazo estimuladas de nuevo *in vitro* (figura 6A para inmunización s.c. y figura 6B para inmunización i.n.) mediante la matriz de perlas citométricas. Se recogieron sobrenadantes de cultivo de células en proliferación en los días 2 y 4 y se almacenaron a -70°C. Se realizó la determinación de IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-4 e IL-5 mediante análisis de matriz de perlas citométricas (CBA, *cytometric bead array*) usando el kit comercial de Becton Dickinson, según las instrucciones del fabricante o con sistemas ELISA disponibles comercialmente. Para análisis mediante CBA, se generó una curva patrón para cada citocina usando las citocinas murina recombinantes correspondientes (Pharmingen). Se incubaron sondas a temperatura ambiente durante 2 h adicionales. Se analizaron posteriormente las sondas mediante citometría de flujo tal como se describió en el protocolo de BD.

Los niveles de citocinas específicas de Th1, tales como IFN γ o TNF α , mostraron una secreción potenciada ligeramente (A) y significativamente (B) en comparación con el control (β -gal sin el adyuvante adicional).

Los niveles de IL-5 también fueron significativamente mayores en ratones vacunados con PQS a través de la vía s.c. e i.n. en comparación con la administración de β -Gal sin el adyuvante adicional. Lo mismo es cierto para IL-2.

5. Análisis de patrones de células T cooperadoras estimulados usando PQS y PQS-PEG como adyuvante mediante Elispot

Protocolo experimental: se extirparon los bazo de ratones vacunados y se reunieron para análisis de las respuestas inmunitarias celulares. El protocolo para vacunación fue idéntico al protocolo descrito en el ejemplo 1. Se cultivaron células en RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomycin, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y L-glutamina 1 mM (GIBCO BRL, Karlsruhe, Alemania) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂ humidificada. Se ajustaron las suspensiones de células de bazo a 5×10^6 células/ml en medio completo, se sembraron las células con 100 μ l por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) y se incubaron las placas durante 4 días en presencia de diferentes concentraciones de β -gal soluble.

Para recubrir placas ELISPOT, se incubaron dichas placas con 100 μ l/pocillo de anticuerpo de captura purificado (10 μ g/ml en tampón de recubrimiento) a 4°C durante la noche. Tras 6 etapas de lavado, se bloquearon las placas con 200 μ l/pocillo de RPMI-1640 completo a temperatura ambiente durante una hora. Se sembraron las células activadas a 100 μ l por pocillo y se incubaron a 37°C, en un incubador humidificado con el 5% de CO₂ durante 24 horas o 48 horas. Tras 5 etapas de lavado con tampón de lavado y 1 etapa con agua destilada, se añadieron 100 μ l/pocillo del anticuerpo de detección biotinilado con una concentración de 1 μ g/ml en diluyente para ensayo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Tras las etapas de lavado adicionales, se añadieron 100 μ l/pocillo del AV-HRP a una dilución 1/1000 en diluyente para ensayo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras las etapas de lavado adicionales, se añadieron 100 μ l/pocillo de disolución de sustrato AEC y se desarrolló a temperatura ambiente durante 10-60 minutos hasta que aparecieron focos visibles. Tras etapas de lavado con (3x) 200 μ l/pocillo de agua destilada, se secaron al aire las placas y se analizaron contando los focos mediante un lector ELISPOT. Cada concentración se sometió a prueba por triplicado.

Se observó un aumento en el número de células productoras de IFN γ esplénicas en animales inmunizados con β -gal a los que se les coadministró PQS o PQS-PEG, en respuesta a una nueva estimulación con un péptido que abarca

el epítipo inmunodominante restringido por CMH de clase I de β -galactosidasa (epítipo CD8) tras vacunación parenteral (figura 7A). En cambio, las células productoras de INF γ apenas fueron detectables tras administración i.n. de β -gal. La vacunación i.n. de β -gal con adyuvante adicional PQS o PQS-PEG dio como resultado cantidades de células productoras de INF γ menores que el nivel determinado tras vacunación s.c. Además, se mostró una fuerte expresión de células productoras de IL-2 esplénicas y, en particular, de de IL-4 tras la nueva estimulación con la proteína β -gal en ratones inmunizados con β -gal a los que se les coadministró el adyuvante respectivo por vía i.n. y vía s.c.

5

6. La inmunización usando PQS aumenta la capacidad citotóxica de células efectoras murinas si se coadministra con un antígeno soluble

10 Este sistema se basa en la medición de la liberación de Cr51 de células diana debido a lisis específica. En particular, con la cantidad de radiactividad detectable en el sobrenadante, puede calcularse la lisis específica.

Antes del ensayo de citotoxicidad, se dividieron células diana P815 y se resuspendieron y se ajustaron a 2×10^6 células/300 μ l de DMEM. Se incubaron las células P815 con un péptido específico de β -gal de CMH de clase I durante 1,5 h, mientras se agitaban ligeramente las células cada 15 minutos para mejorar la unión entre el péptido y la molécula de CMH de clase I. Tras el lavado de las células, se resuspendieron las células en 150 μ l de medio sin FCS y se cultivaron durante 2 h en presencia de 100 μ ci de 51 Cr. Cada 30 min., se agitó ligeramente la suspensión celular. Posteriormente, se lavaron las células dos veces en DMEM más FCS al 10% para eliminar el 51 Cr no unido. Se ajustaron las células a 2×10^5 por pocillo. Se diluyeron en serie las células efectoras (1×10^6 , $0,5 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$ y $0,125 \times 10^6$). Se añadieron 50 μ l de las células diana murinas (10.000 células) a las células efectoras, por tanto, la razón de células efectoras / células diana es de 100:1, 50:1, 25:1 y 12,5:1, respectivamente. Se centrifugaron brevemente las muestras para poner las células efectoras en contacto con las células diana. Tras incubación durante 4 h a 37°C y el 5% de CO $_2$, se agitaron las células. Para obtener la cantidad de lisis máxima, se trataron células diana con Triton X100 al 2%. Se tomaron 25 ó 30 μ l de sobrenadante de cada uno de los pocillos y se determinó la radiactividad según la práctica convencional. Se calculó la lisis específica teniendo en cuenta la lisis espontánea y la lisis máxima.

15

20

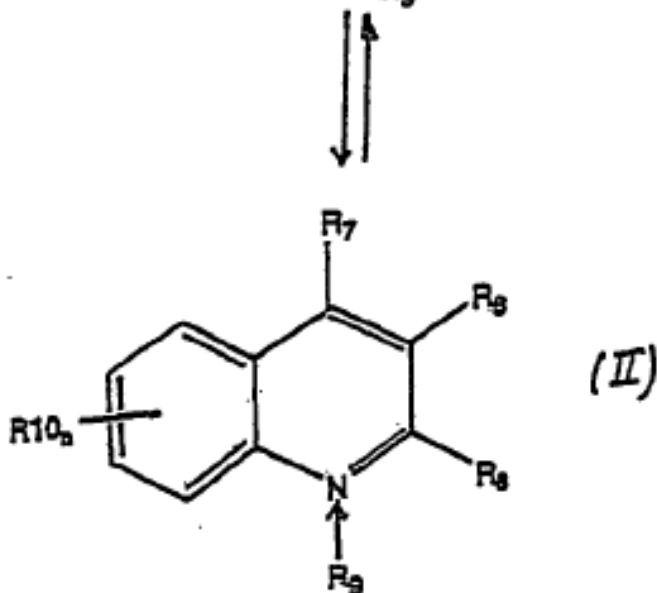
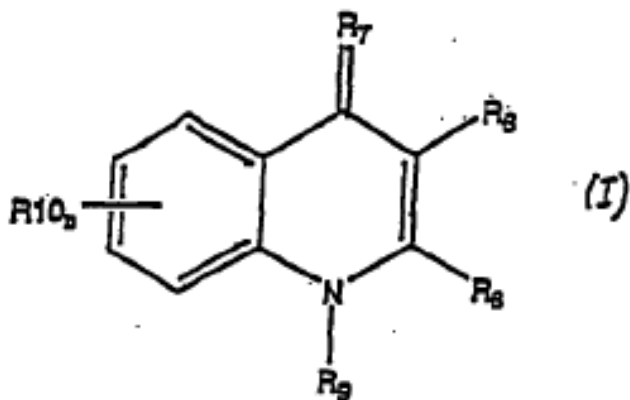
25

La figura 8 muestra los resultados para lisis específica y demuestra la capacidad citotóxica de células T CD8+ estimuladas de nuevo con β -gal obtenidas de ratones que se habían inmunizado con β -gal/PQS por vía subcutánea, véase la figura 8A. En cambio, las células de bazo obtenidas de ratones no inmunizados no proporcionaron una lisis significativa de las células diana.

30

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos uno de los compuestos según la fórmula (I) o su isoforma tautomérica mostrada en la fórmula (II)



5 en las que

R6 representa OH o H y R8 es un grupo hidrocarbonado alifático de cadena lineal o ramificada, saturado o etilénicamente insaturado que contiene de 1 a 20 átomos de carbono que puede estar sustituido opcionalmente con uno o más grupos sustituyentes seleccionados de halógeno, alcoxilo C1-C6, carboxilo, alcoxycarbonilo C1-C6 y NR1R2 en el que cada uno de R1 y R2 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C1-C6 lineal o ramificado, o R1 y R2 junto con el átomo de N al que están unidos forman un grupo heterocíclico saturado seleccionado de piperidino, piperazino y morfolino;

R7 es O, OH o halógeno;

R9 representa hidrógeno, CH3, N-óxido;

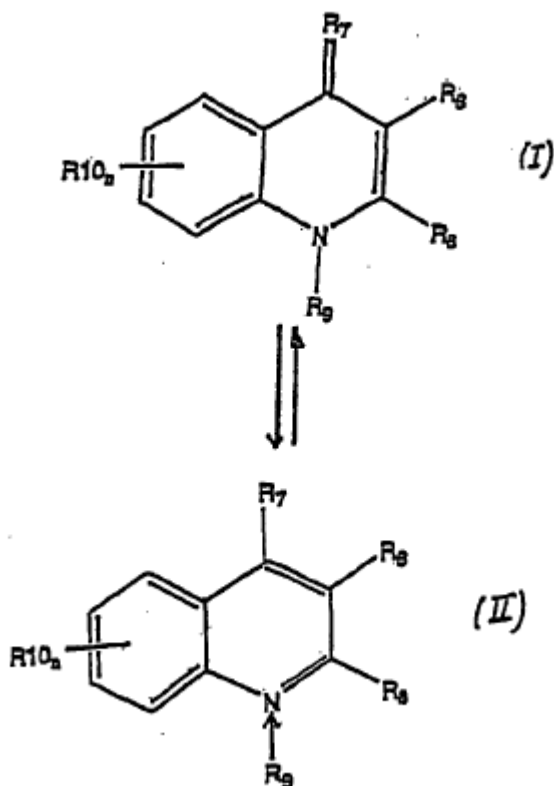
15 cada R10 representa independientemente un grupo alquilo C1-C6 lineal o ramificado o alcoxilo C1-C6 lineal o ramificado o un halógeno;

n es un número entero de desde 0 hasta 4;

y sales o solvatos de los mismos,

como adyuvante(s) para vacunación terapéutica o profiláctica.

2. Uso de al menos uno de los compuestos según la fórmula (I) o su isoforma tautomérica mostrada en la fórmula (II)



en las que

- 5 R6 representa OH o H y R8 es un grupo hidrocarbonado alifático de cadena lineal o ramificada, saturado o etilénicamente insaturado que contiene de 1 a 20 átomos de carbono que puede estar sustituido opcionalmente con uno o más grupos sustituyentes seleccionados de halógeno, alcoxilo C1-C6, carboxilo, alcoxycarbonilo C1-C6 y NR1R2 en el que cada uno de R1 y R2 se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C1-C6 lineal o ramificado, o R1 y R2 junto con el átomo de N al que están unidos forman un grupo heterocíclico saturado seleccionado de piperidino, piperazino y morfolino;
- 10

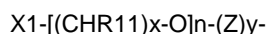
R7 es O, OH o halógeno;

R9 representa hidrógeno, CH3, N-óxido;

cada R10 representa independientemente un grupo alquilo C1-C6 lineal o ramificado o alcoxilo C1-C6 lineal o ramificado o un halógeno;

- 15 n es un número entero de desde 0 hasta 4;

estando conjugado los compuestos según la fórmula (I) o su isoforma tautomérica de fórmula (II) con un resto de conjugado que contiene al menos una unidad de polialquilenglicol de fórmula:



en la que

- 20 X1 es hidrógeno o un hidrocarburo;

Z es un grupo de unión divalente seleccionado de C=O, NH o CHR11;

R11 es independientemente uno cualquiera de hidrógeno, OH, OR12 o CO-R13;

R12 es independientemente uno cualquiera de hidrógeno o alquilo C1-C6 lineal o ramificado;

R13 es independientemente uno cualquiera de hidrógeno, OH, OR12 o NR14R15;

R14 y R15 son independientemente uno cualquiera de hidrógeno o hidrocarburo;

n es un número entero de 1 a 100;

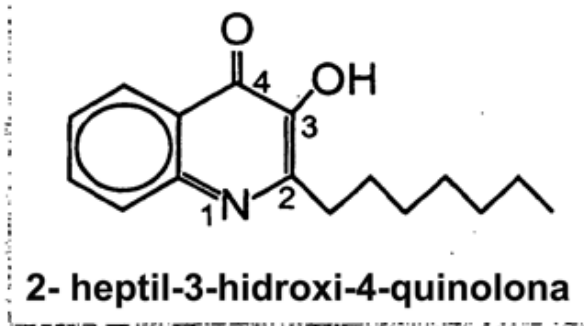
x es independientemente un número entero de 1 a 10;

y es un número entero de 0 a 10;

- 5 y sales y solvatos de los mismos,
como adyuvante(s) para vacunación terapéutica o profiláctica
3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, como adyuvante(s) mucoso(s), en particular, para administración intranasal, intra-TLAN, oral, intrarrectal, intrapulmonar, intrabronquial, intratecal, conjuntival, intravaginal o intrauretral, administración en los conductos galactóforos de la mama o mediante inhalación.
- 10 4. Uso según la reivindicación 1 ó 2, para administración parenteral, en particular, en administración subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular.
5. Uso según la reivindicación 2, caracterizado porque el resto de conjugado comprende al menos dos cadenas que tienen unidades de polialquilenglicol según la reivindicación 2.
- 15 6. Uso según la reivindicación 2 ó 5, caracterizado porque las unidades de polialquilenglicol en el resto de conjugado son unidades de polietileno, unidades de polipropileno y/o unidades de polibutileno.
7. Uso según la reivindicación 2, 5 ó 6, caracterizado porque el resto de conjugado es un residuo de metoxipolietilenglicol-carbonilo.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 5 ó 6, caracterizado porque el resto de conjugado es (S)-10-amino-6,9,13,16-tetraoxo-N,N',8,14-tetrakis(3,6,9,12-tetraoxatridec-1-il)-5,8,14,17-tetraazahenicoso-1,21-diamida.
- 20 9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque en el compuesto según la fórmula (I) o (II) n es 0 y R8 es un grupo alquilo C4 a C8 lineal.
10. Uso según la reivindicación 9, caracterizado porque en el compuesto según la fórmula (I) o (II) R8 es un grupo heptilo y R7 es O, R6 es OH y R9 es hidrógeno.
- 25 11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como adyuvante, un principio farmacéuticamente activo y un portador, diluyente, conservante farmacéuticamente aceptable, adyuvantes distintos a los compuestos o conjugados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, inmunomoduladores o excipiente, mediante lo cual la composición farmacéutica es una vacuna.
- 30 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que el/los principio(s) activo(s) comprende(n) al menos uno o más antígenos diferentes en forma de péptidos, proteínas, polisacáridos, glicolípidos o ADN que codifica para los mismos o sistemas de suministro de antígenos tales como virosomas, partículas físicas, preferiblemente micropartícula, nanopartícula, liposoma, ISCOM, copolímero y/o partícula biológica, preferiblemente fantasmas bacterianos, partículas similares a virus (VLP), partículas similares a, partículas similares a poliomavirus PLP o virus atenuados.
- 35 13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, caracterizada porque los antígenos son antígeno(s) tumoral(es) o antígeno(s) derivado(s) de agentes infecciosos para prevenir o tratar enfermedades infecciosas, choque séptico, cáncer, tumores, enfermedades autoinmunitarias, alergias, o procesos inflamatorios crónicos o agudos.
- 40 14. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende además una o más moléculas antiinflamatorias, moléculas antiangiogénicas, moléculas citotóxicas, moléculas inmunomoduladoras, preferiblemente quimiocinas, citocinas, ligando CD40, moléculas coestimuladoras o anticuerpos o mezclas de los mismos.
- 45 15. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, proporcionada en una formulación adecuada para administración mucosa, en particular, para administración intranasal, intra-TLAN, oral, intrarrectal, intrapulmonar, intrabronquial, intratecal, conjuntival, intravaginal o intrauretral, administración en los conductos galactóforos de la mama o mediante inhalación.
- 50 16. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, proporcionada en una formulación adecuada para administración parenteral, en particular, en administración subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular.

17. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, como composición combinada para uso simultáneo, por separado o secuencial en la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas, cánceres, tumores, enfermedades autoinmunitarias o alergias, o procesos inflamatorios crónicos o agudos.
- 5 18. Kit que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como estructura adyuvante y antigénica y, opcionalmente, portador, diluyente, conservante farmacéuticamente aceptable, adyuvantes distintos a los conjugados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, inmunomoduladores o excipiente.

A



B

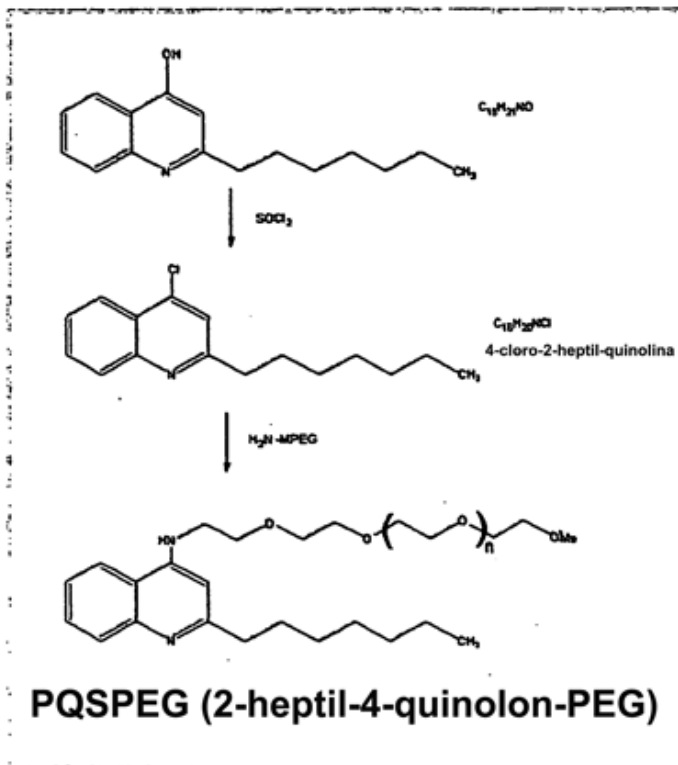


Figura 1:

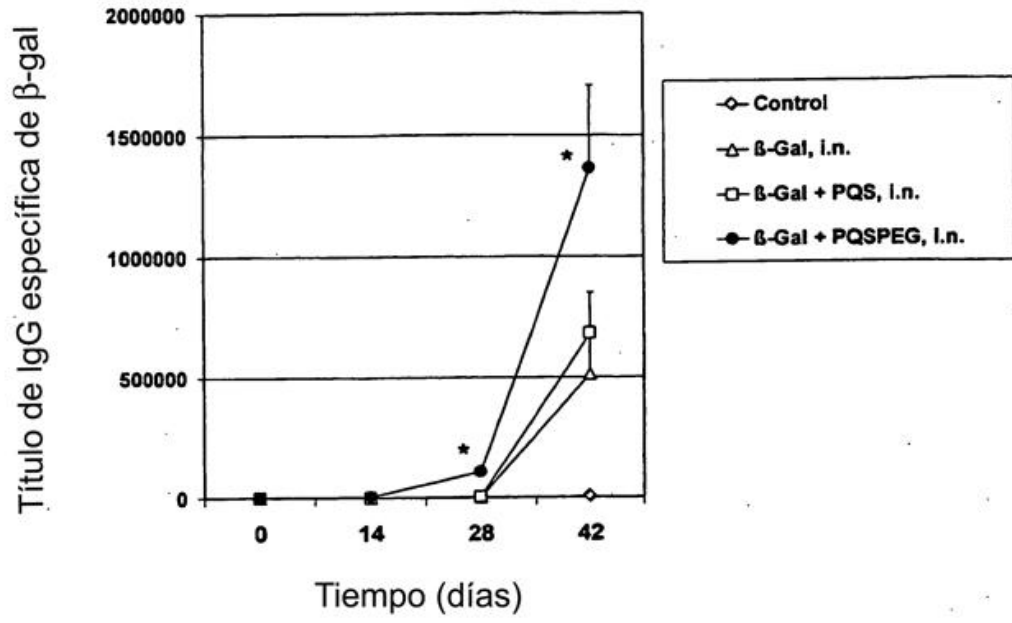


Figura 2A:

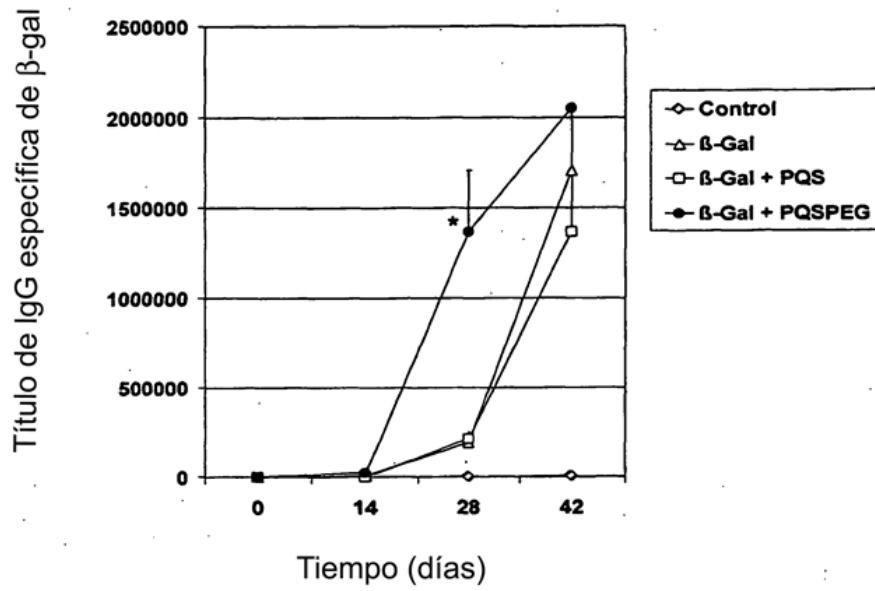


Figura 2B

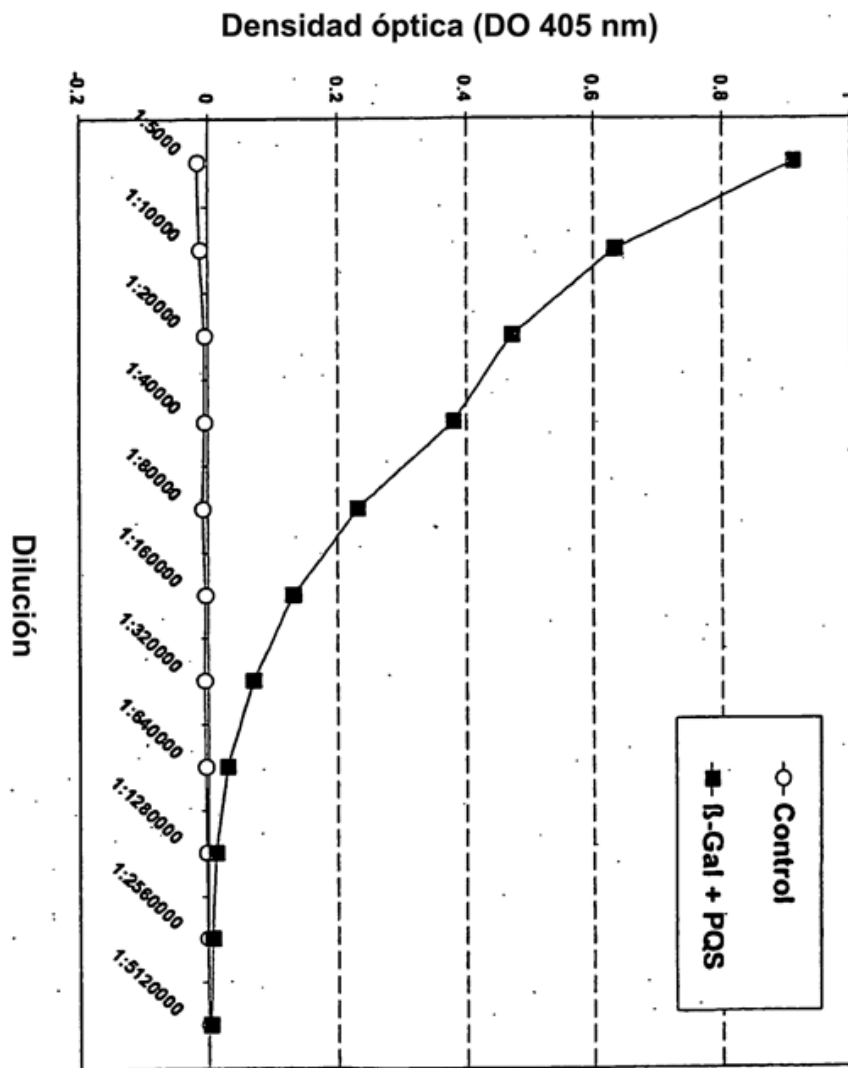


Figura 2C

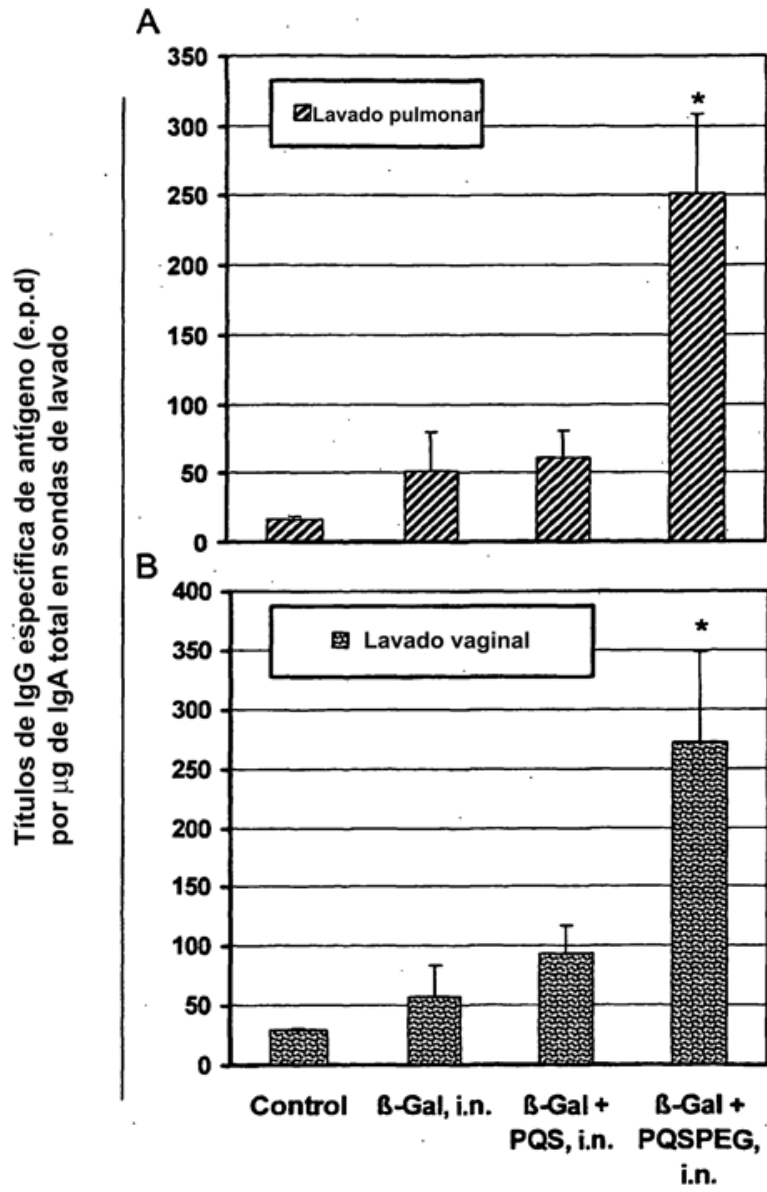


Figura 3

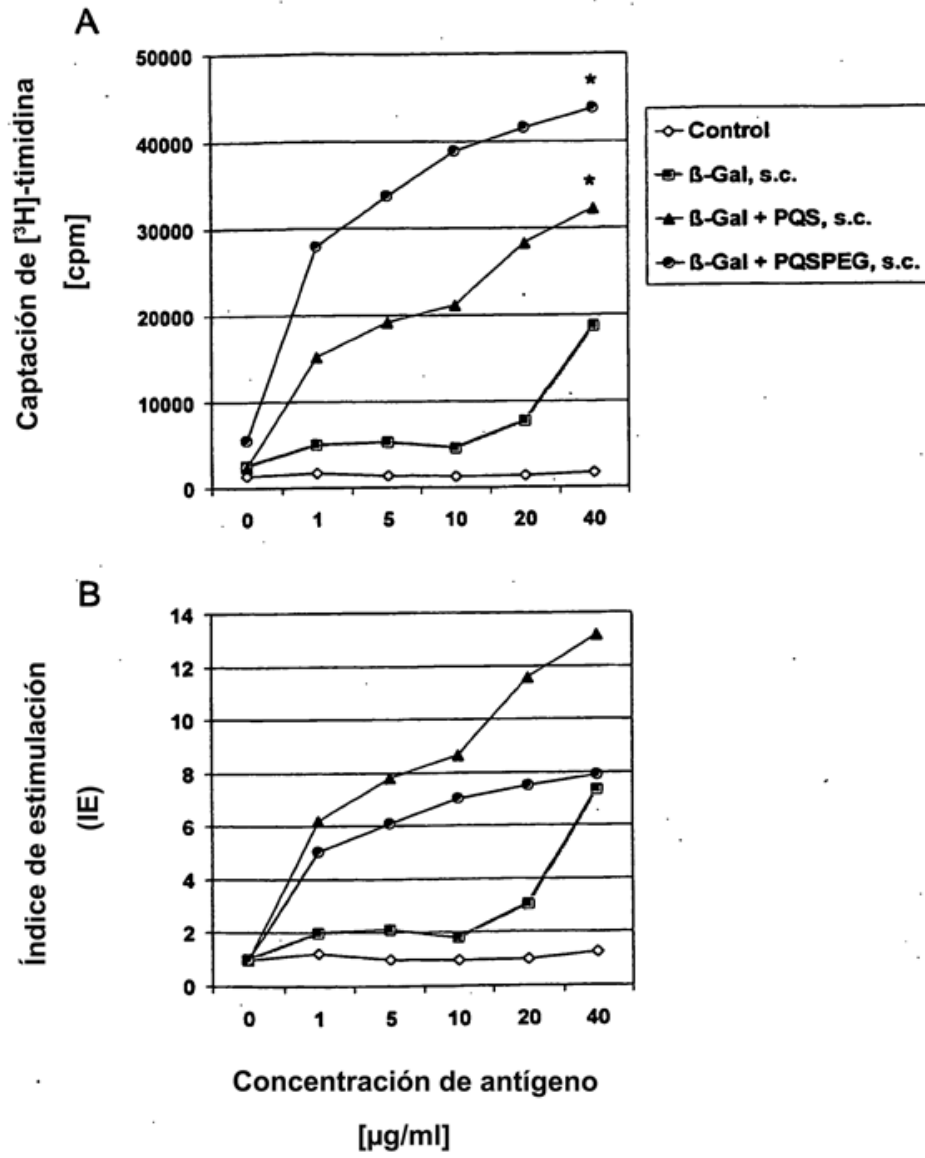


Figura 4A

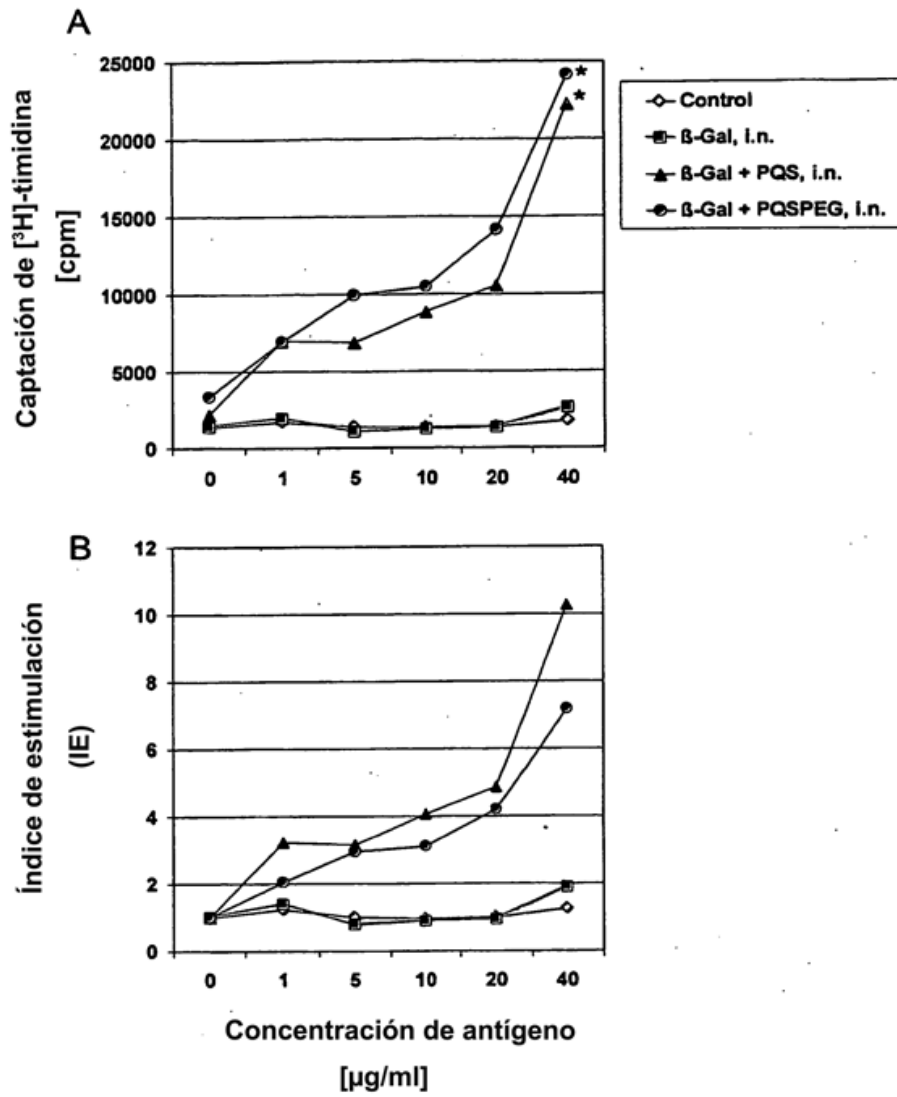


Figura 4B

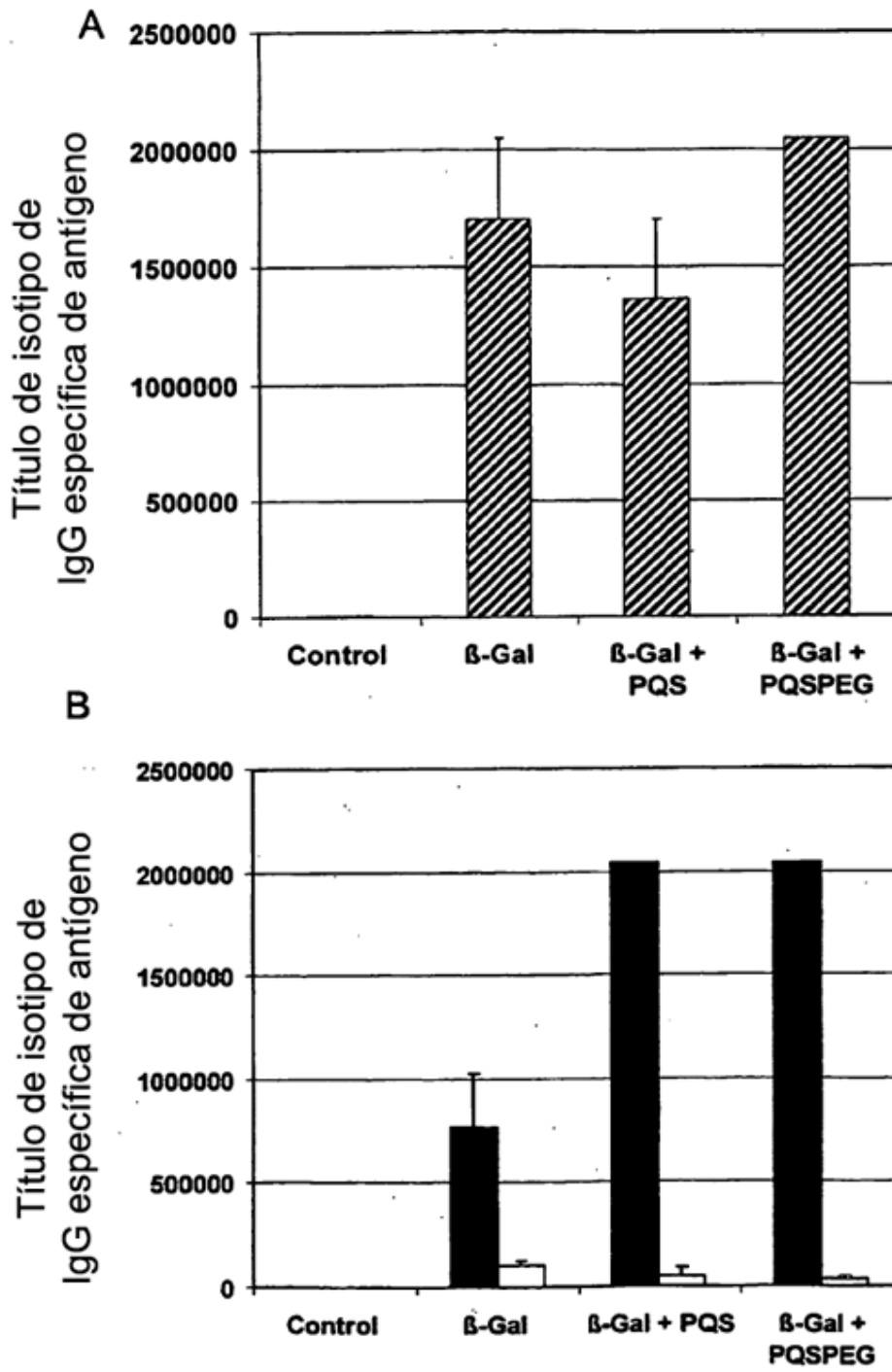


Figura 5A

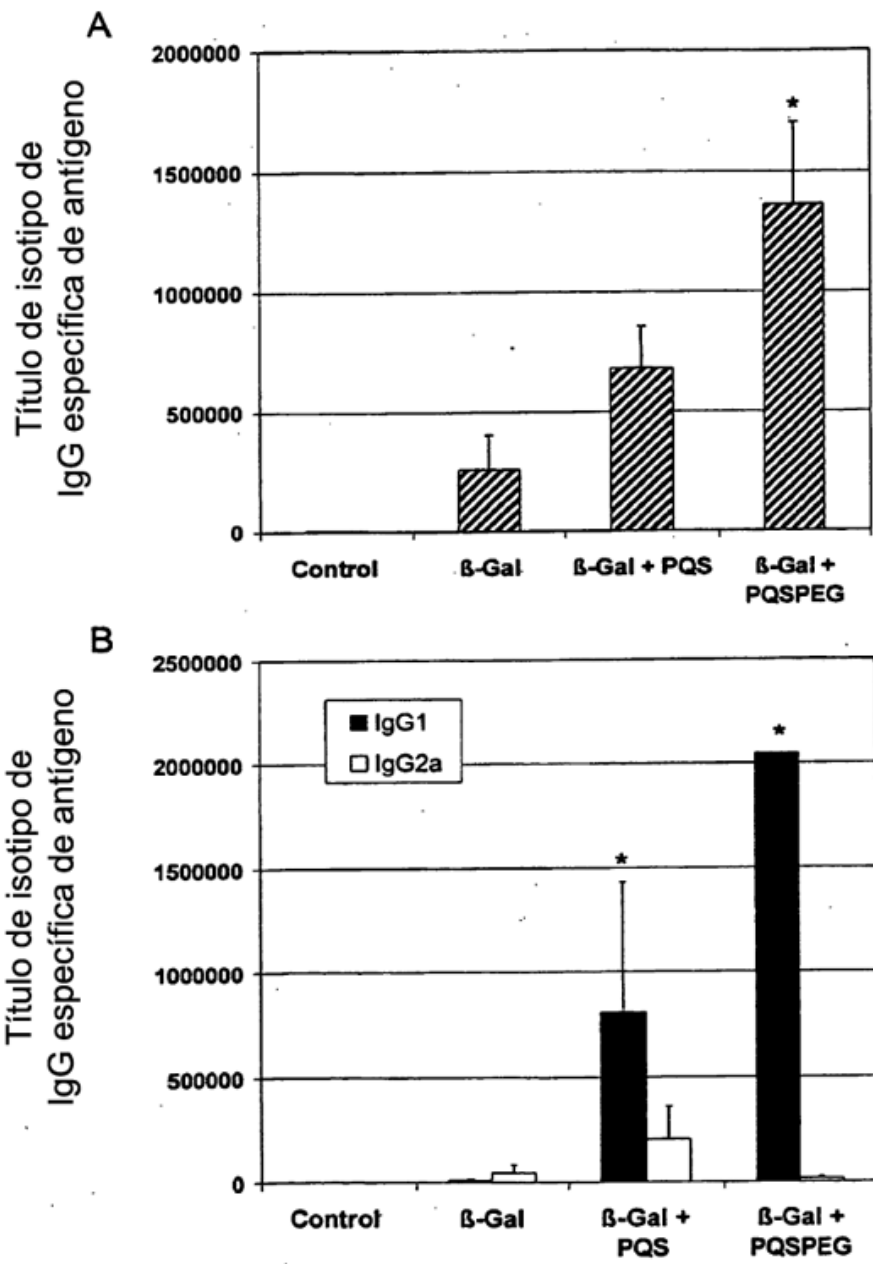


FIGURA 5B

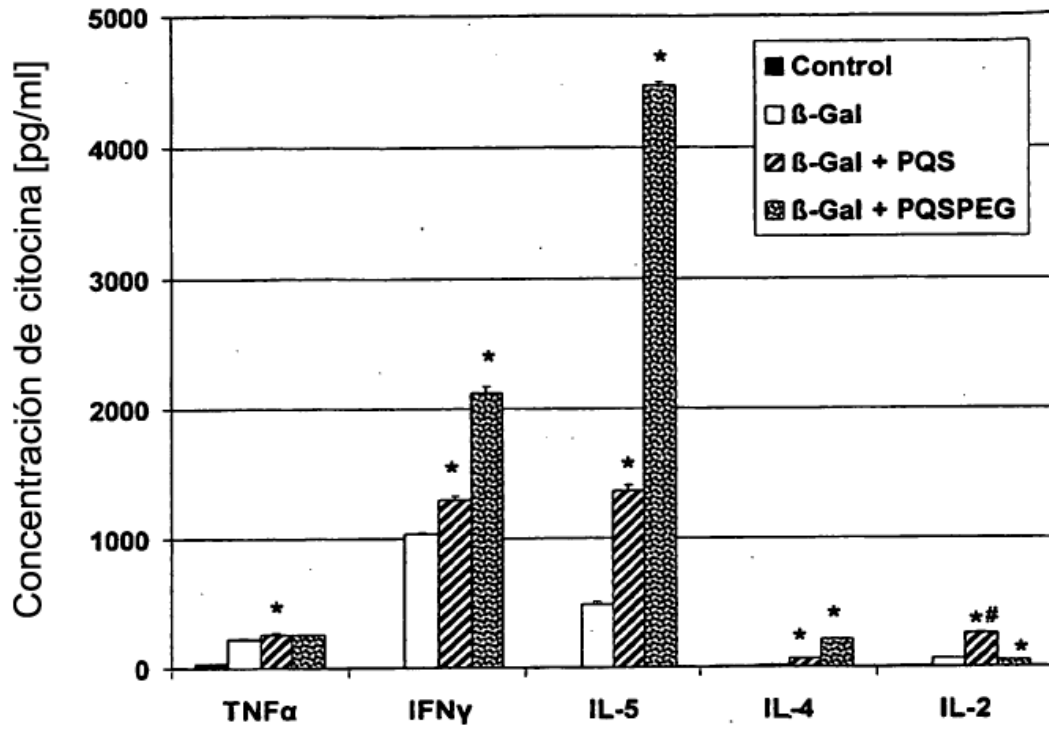


FIGURA 6A

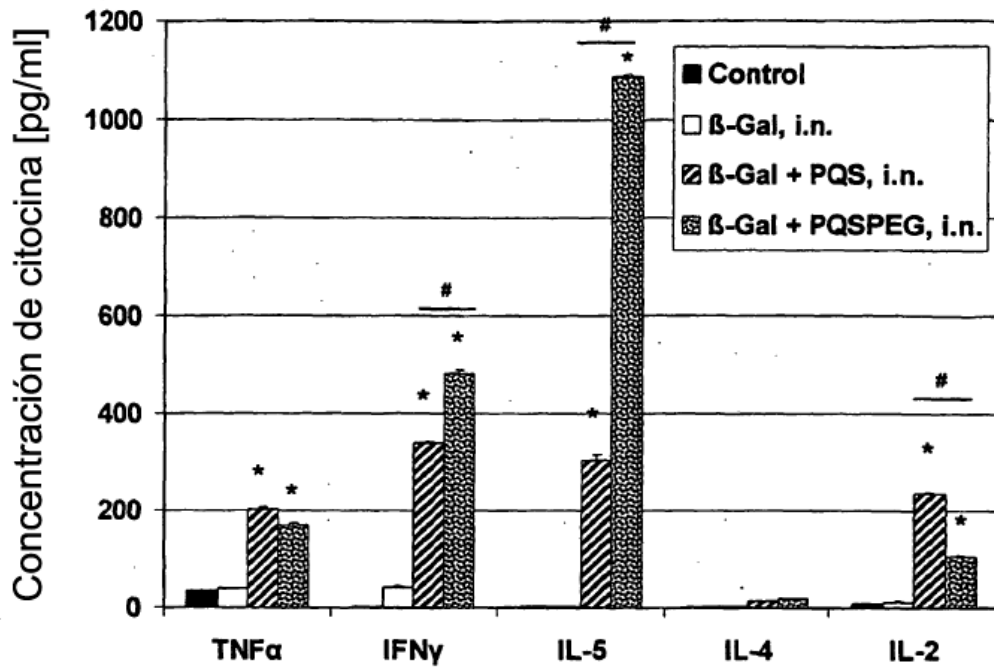


FIGURA 6B

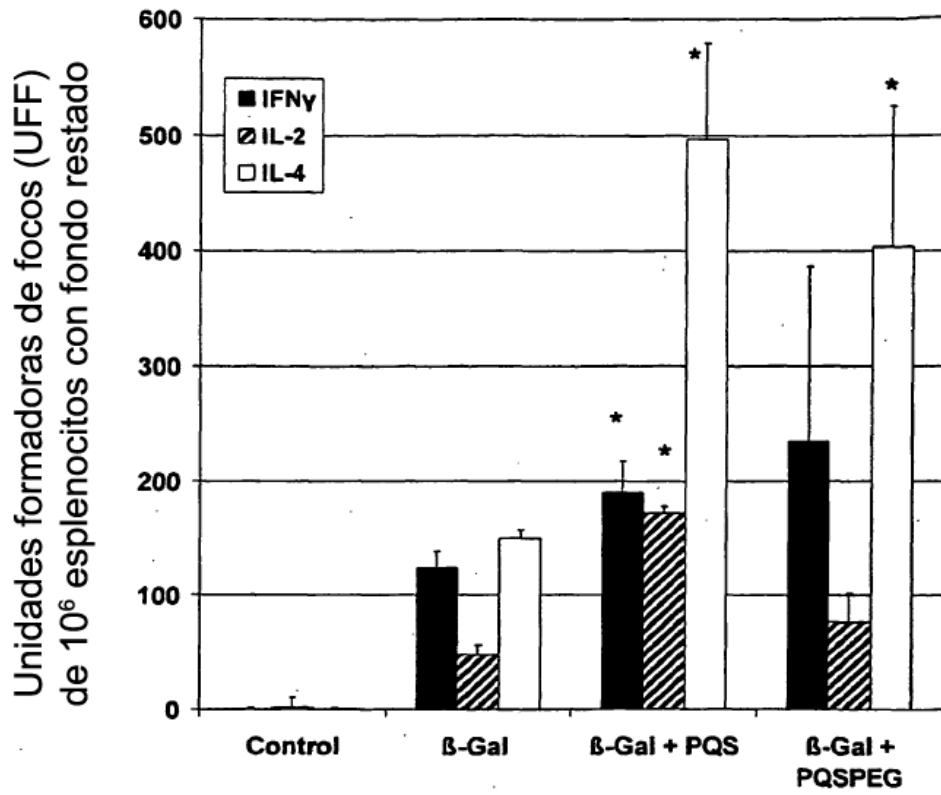


FIGURA 7A

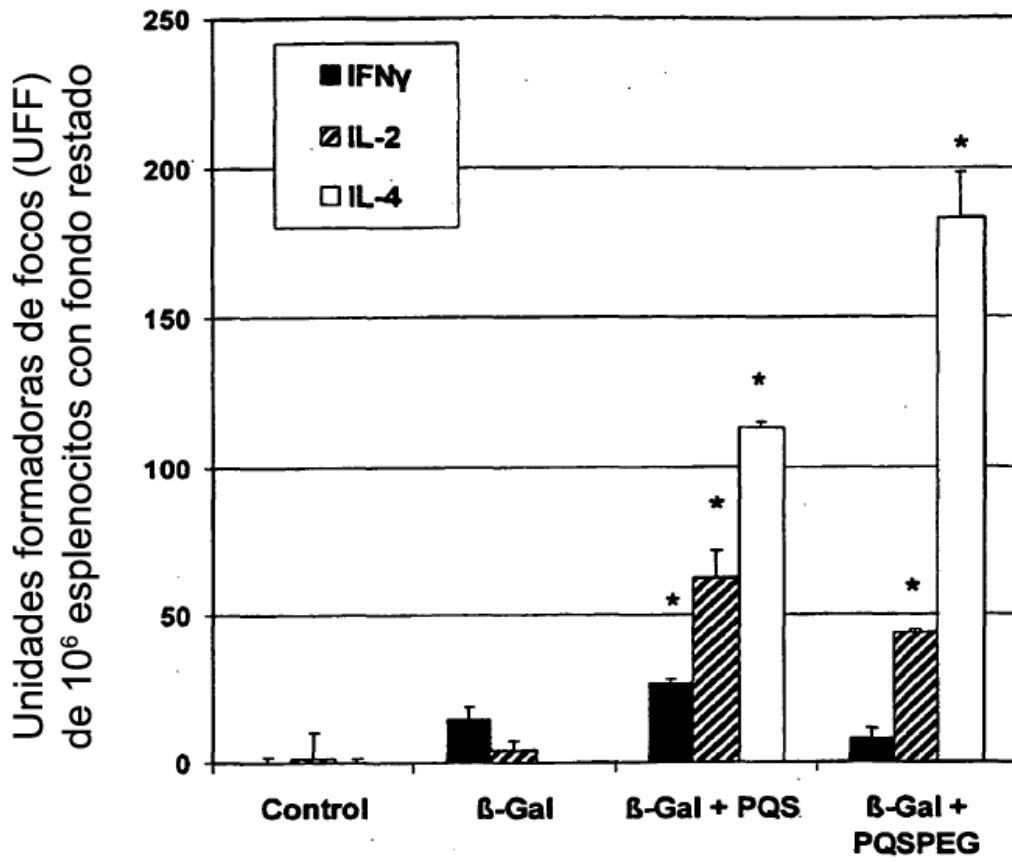


FIGURA 7B

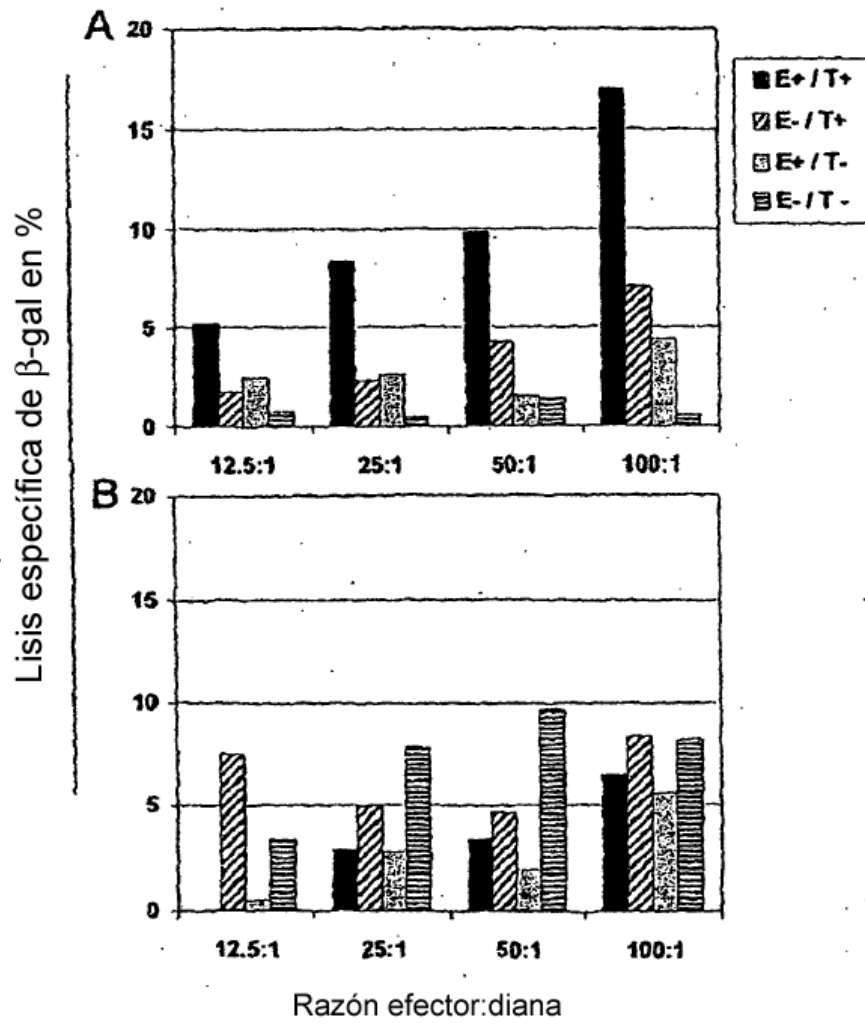


FIGURA 8