



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 992 314**

⑮ Int. Cl.:

C07H 3/04 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)
A61K 8/14 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2013 E 20157427 (4)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2024 EP 3674309**

⑮ Título: **Compuestos lipídicos disacáridos sintéticos y usos de los mismos**

⑯ Prioridad:

12.04.2012 US 201261623393 P
15.03.2013 US 201313842424

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2024

⑯ Titular/es:

AVANTI POLAR LIPIDS, LLC (50.0%)
700 Industrial Park Drive
Alabaster, Alabama 35007, US y
AC IMMUNE SA (50.0%)

⑯ Inventor/es:

SHAW, WALTER A.;
BURGESS, STEPHEN W.;
LI, SHENGRONG;
HICKMAN, DAVID T. y
LOPEZ-DEBER, MARIA PILAR

⑯ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 992 314 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

Compuestos lipídicos disacáridos sintéticos y usos de los mismos

Campo de la descripción

La presente descripción se refiere en general a compuestos para el uso en el incremento o la estimulación de una respuesta inmunitaria. De manera más específica, la presente invención según se reivindica en el presente documento se refiere a análogos de lípido A disacáridos sintéticos que tienen la estructura de las fórmulas (X) y (XV) como se describen a continuación, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. También se describe el uso de tales compuestos para inducir y estimular una respuesta inmunitaria, las composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos y las composiciones de vacunas que comprenden tales compuestos.

10 Antecedentes

Se sabe que la endotoxina, que es un componente de la membrana externa de diversos bacilos gram-negativos, tiene diversas actividades biológicas, tales como el incremento de la función inmunitaria. La porción activa principal de la endotoxina reside en un resto disacárido denominado lípido A. Se han estudiado diversos derivados del lípido A, y se informó que tienen actividades biológicas similares al lípido A natural. Sin embargo, muchos de tales compuestos se purifican a partir de fuentes naturales, lo que puede conducir a problemas con la consistencia y la pureza de estos compuestos. Se ha centrado mucha investigación en proporcionar formas puras o básicamente puras de tales compuestos.

El documento D1 (Zhnag, et al.), "Synthetic tetra-acylated derivatives of lipid A from *Porphyromonas gingivalis* are antagonists of human TLR4". Org Biomol Chem, 6; 18, 1 de enero de 2008, páginas 3371-3381 divulga la síntesis de algunos lípidos tetra acilados. Como se deriva de LPS de *Porphyromonas gingivalis* usando un inermedio de disacárido funcionalizado con levulinato, alioxicarbonato y anomicridimethylhexilsilil como grupos protectores ortogonales y 9-fluorenilmetoxi-carbamato y azido como grupos protectores amino, con una realización que presenta actividad antagonista para la producción de TNF- α inducidos por el LPS entérico.

El documento D2 (WO 95/14026A1) divulga algunos disacáridos que son 3-O-deacilados y 3'-O-deacilados o comprenden en la posición 3-O y/o la posición 3'-O un grupo alquilo o acilo unido con enlace corto -O, y comprenden al menos un grupo acilo ramificado unido con enlace N en la posición 2, posición 2', o en ambas posiciones 2 y 2'.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción sobre la proliferación de esplenocitos de ratón *in vitro*.

La FIG. 1B muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción sobre la proliferación de células B de ratón *in vitro*.

La FIG. 2A muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción sobre la viabilidad de esplenocitos de ratón *in vitro*.

La FIG. 2B muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción sobre la viabilidad de células B de ratón *in vitro*.

La FIG. 3A muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción sobre la secreción de IgM de esplenocitos de ratón *in vitro*.

La FIG. 3B muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción sobre la secreción de IgM de células B de ratón *in vitro*.

La FIG. 4A muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción sobre la secreción de IgG de esplenocitos de ratón *in vitro*.

La FIG. 4B muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción sobre la secreción de IgG de células B de ratón *in vitro*.

La FIG. 5 muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción sobre la producción de IL-12 de monocitos/macrófagos murinos *in vitro*.

La FIG. 6 muestra el efecto de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción en una formulación de vacuna sobre la estimulación de una respuesta inmunitaria específica del antígeno *in vivo*.

Descripción detallada**Definiciones**

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "prevención", "prevenir", "que previene", "inhibición", "inhibir" y "que inhibe", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a un curso de acción (tal como la administración de un compuesto o composición farmacéutica) iniciado antes del inicio de un síntoma, aspecto, o características de una enfermedad o afección para prevenir o reducir tal síntoma, aspecto, o características. Tal prevención e inhibición no necesita ser absoluta para ser útil.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "tratamiento", "tratar" y "que trata", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a un curso de acción (tal como administrar un compuesto o composición farmacéutica) iniciado después del inicio de un síntoma, aspecto, o características de una enfermedad o afección para eliminar o reducir tal síntoma, aspecto, o características. Tal tratamiento no necesita ser absoluto para ser útil.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "que necesita tratamiento", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un juicio hecho por un sanitario de que un paciente requiere o se beneficiará del tratamiento. Este juicio se hace basándose en una diversidad de factores que están en el ámbito de experiencia del sanitario, pero que incluye el conocimiento de que el paciente está enfermo, o estará enfermo, como resultado de una enfermedad o afección que es tratable mediante un método o compuesto de la descripción.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "que necesita prevención", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un juicio hecho por un sanitario de que un paciente requiere o se beneficiará de la prevención. Este juicio se hace basándose en una diversidad de factores que están en el ámbito de la experiencia del sanitario, pero que incluyen el conocimiento de que el paciente estará enfermo o puede enfermar, como resultado de una enfermedad o afección que es prevenible mediante un método o compuesto de la descripción.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "individuo", "sujeto" o "paciente", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a cualquier animal, que incluye los mamíferos, tales como ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado vacuno, ovejas, caballos, o primates, y seres humanos. El término puede hacer referencia a machos o hembras, o a ambos sexos, o excluir machos o hembras.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad de un compuesto, solo o como parte de una composición farmacéutica, que es capaz de tener cualquier efecto positivo detectable sobre cualquier síntoma, aspecto, o características de una enfermedad o afección. Tal efecto no necesita ser absoluto para ser beneficioso.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alquilo", si se usa solo o como parte de un sustituyente o grupo de unión, incluye los grupos hidrocarburos lineales que comprenden de uno a veinte átomos de carbono. Por tanto, la expresión incluye los grupos alquilo de cadena lineal tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo y similares. La expresión también incluye los isómeros de cadena ramificada de los grupos alquilo de cadena lineal, que incluyen, pero sin limitación, los siguientes que se proporcionan a modo de ejemplo: -CH(CH3)2, -CH(CH3)(CH2CH3), -CH(CH2CH3)2, -C(CH3), -C(CH2CH3)3, -CH2CH(CH3)2, -CH2CH(CH3)(CH2CH3), -CH2CH(CH2CH3)2, -CHC(CH3)3, -CH2C(CH2CH3)3, -CH(CH3)CH(CH3)(CH2CH3), -CH2CH2CH(CH3)2, -CH2CH2CH(CH3)(CH2CH3), CH2CH2CH(CH2CH3)2, -CH2CH2C(CH3)3, -CH2CH2C(CH2CH3)3, -CH(CH3)CH2CH(CH3)2, -CH(CH3)CH(CH3)CH(CH3)2, -CH(CH2CH3)CH(CH3)CH(CH3)(CH2CH3) y otros. La expresión también incluye los grupos alquilo cíclicos, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, y ciclooctilo, y tales anillos sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal y ramificada como se definieron anteriormente. La expresión también incluye los grupos alquilo policíclicos tales como, pero sin limitación, adamantilo, norbornilo, y biciclo[2.2.2]octilo, y tales anillos sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal y ramificada como se definieron anteriormente.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alquileno", si se usa solo o como parte de un grupo sustituyente, incluye cualquier grupo obtenido eliminando un átomo de hidrógeno de un grupo alquilo; un grupo alquileno forma dos enlaces con otros grupos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alquenilo", si se usa solo o como parte de un grupo sustituyente, incluye un grupo alquilo que tiene al menos un enlace doble entre dos átomos de carbono adyacentes cualesquiera.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "alquilo sin sustituir" y "alquenilo sin sustituir" se refieren a grupos alquilo y alquenilo que no contienen heteroátomos.

Las expresiones "alquilo sustituido" y "alquenilo sustituido" se refieren a grupos alquilo y alquenilo como se definieron anteriormente, en los que uno o más enlaces a uno/varios carbono(s) o hidrógeno(s) están sustituidos por un enlace a átomos distintos de hidrógeno o carbono tales como, pero sin limitación, un átomo de halógeno en los haluros, tal como F, Cl, Br, y I; y átomo de oxígeno en grupos tales como los grupos carbonilo, carboxilo, hidroxilo, grupos alcoxi, grupos ariloxi, y grupos éster; un átomo de azufre en grupos tales como grupos tiol, grupos sulfuro de alquilo y de arilo, grupos sulfona, grupos sulfonilo, y grupos sulfóxido; un átomo de nitrógeno en grupos tales como aminas, amidas,

alquilaminas, dialquilaminas, arilaminas, alquilarilaminas, diarilaminas, N-óxidos, imidas, enaminas, iminas, oximas, hidrazonas, y nitrilos; un átomo de silicio en grupos tales como en los grupos trialquilsililo, grupos dialquilarilsililo, grupos alquildiarilsililo, y grupos triarilsililo; y otros heteroátomos en otros grupos diversos. Otros grupos alquilo incluyen aquellos en los que uno o más enlaces a un átomo de carbono o de hidrógeno están sustituidos por un enlace a un átomo de oxígeno, de forma que el grupo alquilo sustituido contiene un grupo hidroxilo, alcoxi, ariloxi, o grupo heterociclico. Otros grupos alquilo incluyen grupos alquilo que tienen un grupo amina, alquilamina, dialquilamina, arilamina, (alquil)(aril)amina, diarilamina, heterocicilamina, (alquil)(heterocicil)-amina, (aril)(heterocicil)amina, o diheterocicilamina.

Compuestos lipídicos disacáridos sintéticos

La presente divulgación proporciona compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de las estructuras generales VI, VII, VIII, IX, XIII and XIV más adelante. En un aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos contienen de 3 a 5 grupos acilo en las posiciones descritas en la presente memoria. En otro aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos divulgados son compuestos disacáridos 3-O-desacilados. En un aspecto adicional, los compuestos disacáridos 3-O-desacilados contienen de 3 a 5 grupos acilo en las posiciones divulgadas en la presente memoria. En un aspecto como se describe en la presente memoria, los compuestos están mono-fosforilados. Tales compuestos son útiles como agentes inmunoestimulantes para inducir y estimular una respuesta inmunitaria, y son útiles como adyuvantes en composiciones inmunógenas tales como, pero sin limitación, las vacunas.

Los compuestos de la presente descripción se sintetizan químicamente y se proporcionan, por lo tanto, en una forma básicamente pura. "Básicamente puro" significa que los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen una pureza de al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% con respecto a los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos (medida basándose en el peso). En un aspecto particular, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen una pureza de al menos un 95% (medida basándose en el peso). En otro aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen una pureza de al menos un 96% (medida basándose en el peso). En otro aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen una pureza de al menos un 97% (medida basándose en el peso). En otro aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen una pureza de al menos un 98% (medida basándose en el peso). En otro aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen una pureza de al menos un 99% (medida basándose en el peso).

Este nivel de pureza permite que los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción se usen en diversas aplicaciones farmacológicas para las que los compuestos de lípidos A purificados naturales son inadecuados. Por ejemplo, los compuestos de lípidos A purificados naturales se co-purifican con diversas cantidades de proteínas, ácidos nucleicos, otros lípidos y otros productos de las células bacterianas a partir de las que se purifican. Además, los niveles de tales impurezas varían de una purificación a otra.

Además, los compuestos de lípidos A purificados naturales a menudo están presentes en diversas formas. Por ejemplo, el número de cadenas acilo presentes en el esqueleto disacárido puede variar en una preparación determinada, así como la longitud de una cadena acilo determinada en una posición particular. Por lo tanto, los compuestos de la presente descripción están básicamente exentos de los contaminantes hallados en los compuestos purificados a partir de fuentes naturales, tales como, pero sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, otros lípidos y otros productos de una célula bacteriana. Además, los compuestos de la presente descripción están básicamente exentos de los contaminantes generados durante la síntesis química. Como tales, los compuestos de la presente descripción proporcionan una ventaja respecto de los compuestos conocidos en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "básicamente exento" significa que los compuestos de la presente descripción contienen menos del 1%, menos del 2%, menos del 3%, menos del 4%, menos del 5%, menos del 10%, menos del 15% o menos del 20% de tales contaminantes tal como se determina con respecto al compuesto lipídico disacárido sintético (tal como se mide basándose en el peso). Los contaminantes relevantes incluyen, pero sin limitación, los compuestos relacionados que tienen un número y/o longitud diferente de cadenas acilo, aquellos contaminantes hallados durante el aislamiento de los compuestos correspondientes a partir de fuentes naturales y los contaminantes hallados como resultado de la síntesis química. En un aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos contienen menos del 1% de tales contaminantes tal como se determina con respecto al compuesto lipídico disacárido sintético (tal como se mide basándose en el peso). En un aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos contienen menos del 2% de tales contaminantes tal como se determina con respecto al compuesto lipídico disacárido sintético (tal como se mide basándose en el peso). En un aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos contienen menos del 3% de tales contaminantes tal como se determina con respecto al compuesto lipídico disacárido sintético (tal como se mide basándose en el peso). En un aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos contienen menos del 4% de tales contaminantes tal como se determina con respecto al compuesto lipídico disacárido sintético (tal como se mide basándose en el peso). En un aspecto, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos contienen menos del 5% de tales contaminantes tal como se determina con respecto al compuesto lipídico disacárido sintético (tal como se mide basándose en el peso).

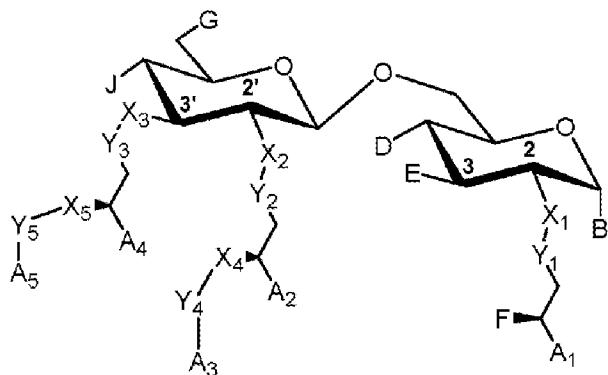
Los anteriores problemas dan como resultado que las propiedades de los compuestos de lípidos A purificados naturales sean variables de una preparación a otra. Además, la reacción concreta individual a tales compuestos de lípidos A naturales también puede variar. La provisión de los compuestos de la presente descripción en una forma

básicamente pura reduce los anteriores problemas y permite el uso de los compuestos de la presente descripción en aplicaciones en las que las composiciones de lípidos A naturales son inadecuadas.

La técnica también es consciente de los diversos compuestos disacáridos hexaacilados mono-fosforilados. Por ejemplo, tales compuestos se proporcionan con el nombre PHAD (o PHAD™) y están disponibles de Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama). Sin embargo, estos compuestos tienen un grupo acilo en la posición 3.

Los compuestos disacáridos mono-fosforilados 3-O-desacilados, que incluyen, pero sin limitación, los compuestos pentaacilados, se conocen en la técnica. Sin embargo, tales compuestos disacáridos mono-fosforilados 3-O-desacilados se han purificado a partir de fuentes naturales y se han tratado químicamente para eliminar la cadena acilo presente en la posición 3. Como resultado, la variabilidad en la composición de la técnica anterior de los compuestos disacáridos mono-fosforilados 3-O-desacilados es relevante. Además, el anterior procedimiento de modificación química también introduce una variabilidad adicional.

Por lo tanto, la técnica anterior no ha proporcionado compuestos lipídicos disacáridos sintéticos en una forma básicamente pura y/o básicamente exenta de contaminantes. La presente divulgación proporciona compuestos lipídicos disacáridos sintéticos que contienen de 3 a 5 cadenas acílicas. En un aspecto, el compuesto lípido disacárido sintético es un compuesto disacárido 3-O-deacilo. En un aspecto como se describe en la presente memoria, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos contienen cadenas de acilo 3-5. En un aspecto como se describe en la presente memoria, las cadenas de acilo 3-5 se posicionan en las posiciones 2', 3' y 2 de azúcares no reductores y reductores, respectivamente. En otro aspecto como se describe en la presente memoria, las cadenas de acilo 3-5 se posicionan en las posiciones 2', 3', 2 y 3 de azúcares no reductores y reductores, respectivamente. En otro aspecto, como se describe en la presente memoria, las cadenas de acilo 3-5 se posicionan en las posiciones 3', 2 y 3 de azúcares no reductores y reductores, respectivamente. Un compuesto disacárido representativo con las posiciones 2', 3', 2 y 3 se muestra a continuación



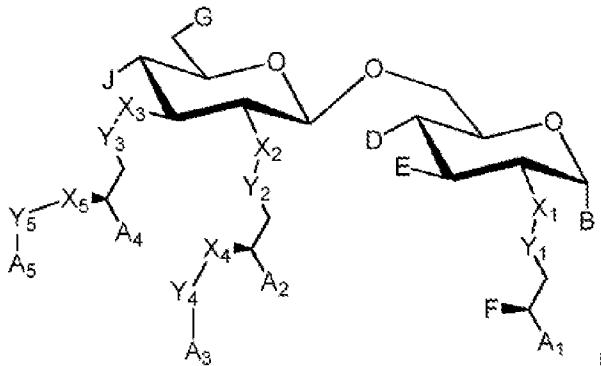
Por claridad, no es necesario que haya presente una cadena acilo en cada una de las posiciones 2', 3' o 2, con tal de que los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tengan un total de 3-5 cadenas acilo en las posiciones enumeradas (2', 3' y 2). Además, una posición enumerada puede contener más de 1 cadena acilo, mientras otra posición enumerada puede no estar asociada con una cadena acilo, con tal de que los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tengan un total de 3-5 cadenas acilo en las posiciones enumeradas (2', 3' y 2).

Por ejemplo, un compuesto lipídico disacárido sintético ilustrativo puede contener 2 cadenas acilo en la posición 3', 2 cadenas acilo en la posición 2 y 1 cadena acilo en la posición 2' (para un total de 5 cadenas acilo). Además, un compuesto lipídico disacárido sintético ilustrativo de la presente divulgación (no reivindicado en la presente memoria) puede contener 2 cadenas acilo en la posición 3', 1 cadena acilo en la posición 2 y 1 cadena acilo en la posición 2' (para un total de 4 cadenas acilo). Además, un compuesto lipídico disacárido sintético ilustrativo de la presente divulgación (no reivindicado en la presente memoria) puede no contener cadenas acilo en la posición 3', y contener 2 cadenas acilo en la posición 2', 1 cadena acilo en la posición 3 y 1 cadena acilo en la posición 3 (para un total de 4 cadenas acilo). Además, un compuesto lipídico disacárido sintético ilustrativo de la presente divulgación (no reivindicado en la presente memoria) puede contener 1 cadena acilo en la posición 3', 2 cadenas acilo en la posición 2 y 1 cadena acilo en la posición 2' (para un total de 4 cadenas acilo). Además, un compuesto lipídico disacárido sintético ilustrativo de la presente divulgación (no reivindicado en la presente memoria) puede no contener cadenas acilo en la posición 3', y contener 2 cadenas acilo en la posición 2 y 1 cadena acilo en la posición 2' (para un total de 3 cadenas acilo).

Los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente divulgación contienen de 3 a 5 cadenas acilo. En un aspecto, la longitud de las cadenas acilo puede variar de 6 a 19 carbonos de longitud. Por claridad, la longitud de las 3 a 5 cadenas acilo presentes en los 3 compuestos lipídicos disacáridos sintéticos puede ser la misma o puede ser diferente. En un aspecto particular descrito en la presente memoria, la longitud de las 3 a 5 cadenas acilo es la misma. Las 3 a 5 cadenas acilo pueden estar saturadas y no contener enlaces dobles, o las 3 a 5 cadenas acilo pueden estar

insaturadas. Cuando tales cadenas acilo están insaturadas, cada cadena acilo insaturada puede contener de 1 a 3 enlaces dobles. En un aspecto descrito en la presente memoria, las 3 a 5 cadenas acilo están todas saturadas. En un aspecto descrito en la presente memoria, al menos una de las 3 a 5 cadenas acilo está insaturada y contiene un único enlace doble, y el resto de las cadenas acilo están saturadas.

- 5 En general, tales compuestos lipídicos disacáridos sintéticos como se describen en la presente memoria tienen la estructura mostrada en la fórmula I:



o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que:

- 10 X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ cada uno independientemente no están presentes o se seleccionan de alquilo C₁-C₈, -O-, -NH- o -CH₂-;

Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo C₁-C₄, -CH₂-, o -C(=O)-, con tal de que al menos 3 de Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ sean un grupo distinto de H y además con tal de que cuando uno de Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ es H, los grupos que están unidos, directamente o indirectamente, al Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ o Y₅ no están presentes;

- 15 D, E, G y F se seleccionan cada uno independientemente de alquilo C₁-C₄, -OH, -SH, -OC(=O)(CH₂)_m-CH₃, -OC(=O)(CH₂)_nC(=O)OH, -OC(=O)CH(NH₂)(CH₂)_nC(=O)OH o -OC(=O)CH₂CH(OH)(CH₂)_nCH₃;

J y B se seleccionan cada uno independientemente de OH, OR₁, H, -OP(=O)(OH)₂-, OP(=O)(OR₂)₂-, OS(=O)(OH)₂-, -OS(=O)(OR₂)₂-, -OS(OH)₂-, -OS(OR₂)₂-, -C(=O)OH-, -C(=O)OR₂- o un grupo ácido;

A₁, A₂, y A₄ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₆ a C₁₈ sustituido o sin sustituir;

A₃ y A₅ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₇ a C₁₉ sustituido o sin sustituir;

- 20 R₁ es un alquilo C₁-C₄ sustituido o sin sustituir;

R₂ es, independientemente para cada aparición, H, alquilo, alquilo sustituido o un residuo de aminoácido unido en N; y

m y n son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5.

- 25 En un aspecto de la fórmula I, al menos uno de X₃, X₄ y X₅ son -O-, al menos dos de X₃, X₄ y X₅ son -O-, o los tres X₃, X₄ y X₅ son -O-.

En un segundo aspecto, al menos uno de X₁ y X₂ son -NH-, o ambos X₁ y X₂ son -NH-.

En un tercer aspecto, X₃, X₄ y X₅ son -O- y X₁ y X₂ son -NH-.

En un cuarto aspecto, X₁ a X₅ son como se definen en el primero a tercero aspectos, y al menos uno de Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ son -C(=O)-, al menos dos de Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ son -C(=O)-, al menos tres de Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ son -C(=O)-, al menos cuatro de Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ son -C(=O)-, o todos los Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ son -C(=O)-.

En un quinto aspecto, X₃, X₄ y X₅ son -O- y X₁ y X₂ son -NH- y todos los Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ son -C(=O)-.

En un sexto aspecto, X₁ a X₅ son como se definen en el primero al quinto aspecto, Y₁ a Y₅ son como se definen en la cuarta y quinta forma, y J es -OP(=O)(OH)₂- y B es -OH.

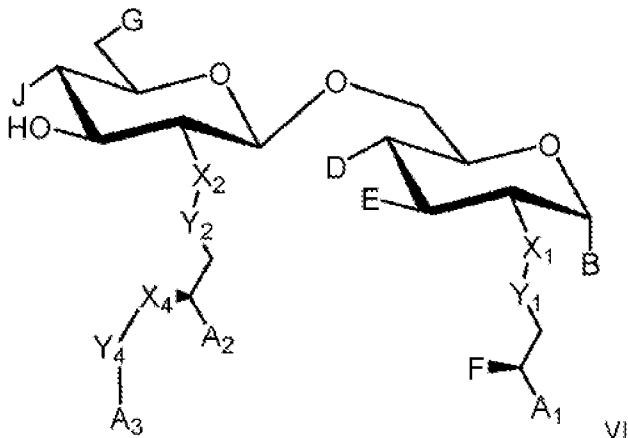
En cualquiera del primero al sexto aspectos, D, E, F y G son cada uno OH.

- 35 En cualquiera del primero al sexto aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno independientemente alquilo C₉ a C₁₃ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno independientemente alquilo C₁₁ a C₁₅ sin sustituir.

En cualquiera del primero al sexto aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno alquilo C₁₃ sin sustituir.

En cualquiera del primero al sexto aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir, A₃ es un alquilo C₁₁ sin sustituir y A₅ es un alquilo C₁₃ sin sustituir.

- 5 Generalmente, en un aspecto como se describe en la presente memoria, algunos tales compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen la estructura general mostrada en la fórmula VI:



o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que:

- 10 X₁, X₂ y X₄ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo C₁-C₈, -O-, -NH- o -CH₂; Y₁, Y₂ y Y₄ se seleccionan cada uno independientemente de -CH₂- o -C(=O)-;

D, E, G y F se seleccionan cada uno independientemente de alquilo C₁-C₄, -OH, -SH, -OC(=O)(CH₂)_m-CH₃, OC(=O)(CH₂)_nC(=O)OH o -OC(=O)CH(NH₂)(CH₂)_nC(=O)OH;

J y B se seleccionan cada uno independientemente de OH, OR₁, H, -OP(=O)(OH)₂-, OP(=O)(OR₂)₂-, -OS(=O)(OH)₂-, -OS(=O)(OR₂)₂-, -OS(OH)₂-, -OS(OR₂)₂-, -C(=O)OH-, -C(=O)OR₂- o un grupo ácido;

- 15 A₁ y A₂ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₆ a C₁₈ sustituido o sin sustituir;

A₃ se selecciona de alquilo o alquenilo C₇ a C₁₉ sustituido o sin sustituir;

R₁ es un alquilo C₁-C₄ sustituido o sin sustituir;

R₂ es, independientemente para cada aparición, H, alquilo, alquilo sustituido o un residuo de aminoácido unido en N; y

- 20 m y n son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5.

La estructura VI anterior se deriva de la mostrada en la estructura I donde el grupo X₃ es O, el Y₃ es H y los grupos unidos a Y₃ (X₅, Y₅, A₅ y A₄ están ausentes).

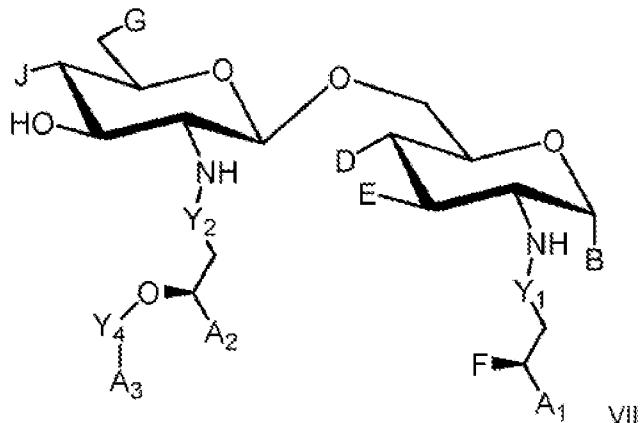
- 25 En un primer aspecto de fórmula VI, al menos uno de X₁ y X₂ son -NH-, o ambos X₁ y X₂ son -NH-. En un segundo aspecto, X₄ es -O-. En un tercero aspecto, X₄ es -O- y X₁ y X₂ son -NH-. En un cuarto aspecto, X₁, X₂ y X₄ son como se definen en el primero mediante terceros aspectos y al menos uno de Y₁, Y₂ y Y₄ son -C(=O)-, al menos dos de Y₁, Y₂ e Y₄ son -C(=O)- o todos de Y₁, Y₂ e Y₄ son -C(=O)-. En un quinto aspecto, X₄ es -O-, X₁ y X₂ son -NH- y todos de Y₁, Y₂ e Y₄ son -C(=O)-. En un sexto aspecto, X₁, X₂ y X₄ son como se definen en el primero mediante quintos aspectos, Y₁, Y₂ e Y₄ son como se definen en el cuarto y quinto aspectos y es -OP(=O)(OH)₂- y B es -OH. En cualquiera del primero al sexto aspecto de esta realización, D, E, F y G son cada uno OH.

- 30 En cualquiera del primero al sexto aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno independientemente un alquilo C₉ a C₁₃ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno independientemente un alquilo C₁₁ a C₁₅ sin sustituir.

En cualquiera del primero al sexto aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno alquilo C₁₃ sin sustituir.

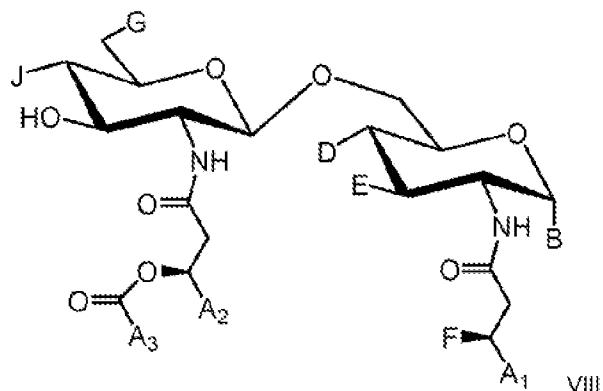
- 35 En cualquiera del primero al sexto aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir, A₃ es alquilo C₁₁ sin sustituir y A₅ es un alquilo C₁₃ sin sustituir.

En otro aspecto descrito en la presente memoria, parte de tales compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen la estructura general mostrada en la fórmula VII:



o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que:

- 5 Y₁, Y₂ e Y₄ se seleccionan cada uno independientemente de -CH₂-; o-C(=O)-;
- D, E, G y F se seleccionan cada uno independientemente de alquilo C₁-C₄, -OH, -SH, -OC(=O)(CH₂)_m-CH₃, OC(=O)(CH₂)_nC(=O)OH o -OC(=O)CH(NH₂)(CH₂)_nC(=O)OH;
- J y B se seleccionan cada uno independientemente de OH, OR₁, H, -OP(=O)(OH)₂-; OP(=O)(OR₂)₂-; -OS(=O)(OH)₂-; -OS(=O)(OR₂)₂-; -OS(OH)₂-; -OS(OR₂)₂-; -C(=O)OH-; -C(=O)OR₂- o un grupo ácido;
- 10 A₁ y A₂ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₆ a C₁₈ sustituido o sin sustituir;
- A₃ se selecciona cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₇ a C₁₉ sustituido o sin sustituir;
- R₁ es un alquilo C₁-C₄ sustituido o sin sustituir;
- R₂ es, independientemente para cada aparición, H, alquilo, alquilo sustituido o un residuo de aminoácido unido en N;
- 15 y
- m y n son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5.
- En un primer aspecto de formula VII, al menos uno de Y₁, Y₂ e Y₄ son- C(=O)-, al menos dos de Y₁, Y₂ e Y₄ son-C(=O)-, o todos de Y₁, Y₂ e Y₄ son-C(=O)-. En un segundo aspecto, Y₁, Y₂ e Y₄ son como se definen en el primer aspecto y J es -OP(=O)(OH)₂- y B es -OH.
- 20 En cualquiera del primer al tercer aspecto, D, E, F y G son cada uno OH. En cualquiera del primer al segundo aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno independientemente un alquilo C₉ a C₁₃ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno independientemente un alquilo C₁₁ a C₁₅ sin sustituir.
- En cualquiera del primer al segundo aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno alquilo C₁₃ sin sustituir.
- 25 En cualquiera del primer al segundo aspecto, A₁, A₂, and A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir, A₃ es alquilo C₁₁ sin sustituir y A₅ es un alquilo C₁₃ sin sustituir.
- Aún en otro aspecto descrito en la presente memoria, los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen la estructura general mostrada en la fórmula VIII:



o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que:

D, E, G y F se seleccionan cada uno independientemente de alquilo C₁-C₄, -OH, -SH, -OC(=O)(CH₂)_m-CH₃, OC(=O)(CH₂)_nC(=O)OH o -OC(=O)CH(NH₂)(CH₂)_nC(=O)OH;

5 J y B se seleccionan cada uno independientemente de OH, OR₁, H, -OP(=O)(OH)₂-, OP(=O)(OR₂)₂-, -OS(=O)(OH)₂-, -OS(=O)(OR₂)₂-, -OS(OH)₂-, -OS(OR₂)₂-, -C(=O)OH-, -C(=O)OR₂- o un grupo ácido;

A₁ y A₂ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₆ a C₁₈ sustituido o sin sustituir;

A₃ se selecciona de alquilo o alquenilo C₇ a C₁₉ sustituido o sin sustituir;

R₁ es un alquilo C₁-C₄ sustituido o sin sustituir;

10 R₂ es, independientemente para cada aparición, H, alquilo, alquilo sustituido o un residuo de aminoácido unido en N; y

m y n son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5.

En un primer aspecto de fórmula VIII, J es -OP(=O)(OH)₂- y B es -OH.

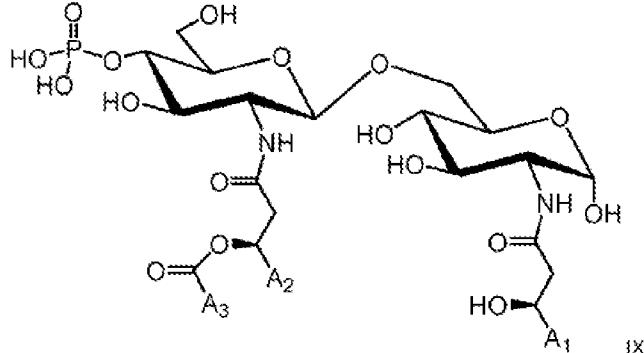
En un segundo aspecto de esta realización, D, E, F y G son cada uno OH.

15 En un tercer aspecto de esta realización, J es -OP(=O)(OH)₂- y B es -OH y D, E, F y G son cada uno OH. En cualquiera del primer al tercer aspecto de esta realización, A₁, A₂, y A₄ son cada uno independientemente un alquilo C₉ a C₁₃ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno independientemente un alquilo C₁₁ a C₁₅ sin sustituir.

En cualquiera del primer al tercer aspecto de esta realización, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno alquilo C₁₃ sin sustituir.

20 En cualquiera del primer al tercer aspecto de esta realización, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir, A₃ es alquilo C₁₁ sin sustituir y A₅ es un alquilo C₁₃ sin sustituir.

En otro aspecto, tales compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen la estructura general mostrada en la fórmula IX:



o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que:

A₁, A₂, y A₄ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₆ a C₁₈ sustituido o sin sustituir; y

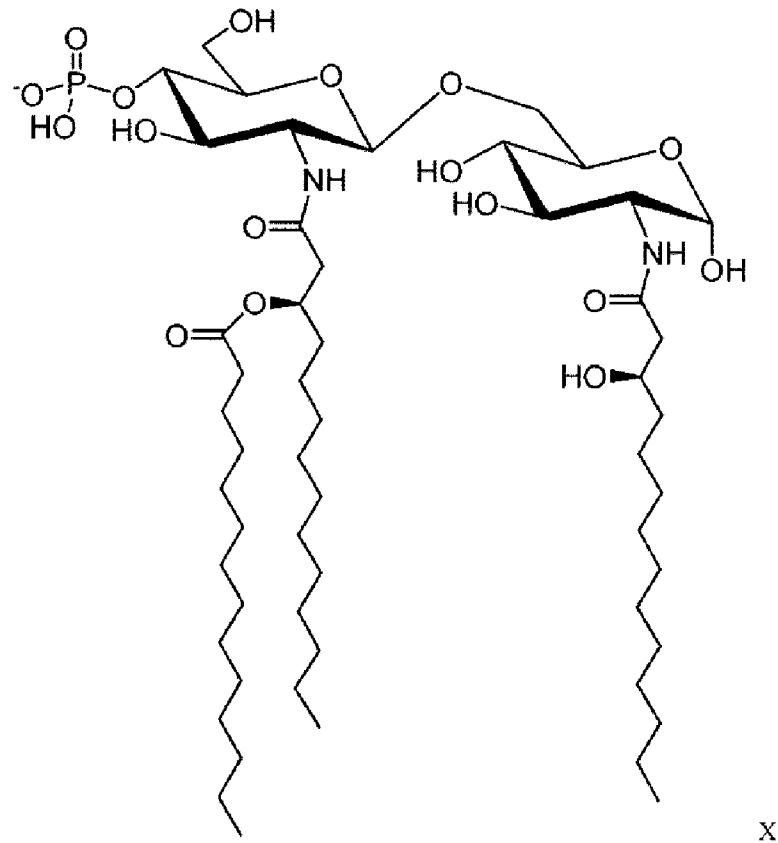
A₃ y A₅ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₇ a C₁₉ sustituido o sin sustituir.

5 En un primer aspecto de fórmula IX, A₁, A₂, y A₄ son cada uno independientemente un alquilo C₉ a C₁₃ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno independientemente un alquilo C₁₁ a C₁₅ sin sustituir.

En un segundo aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir y A₃ y A₅ son cada uno alquilo C₁₃ sin sustituir.

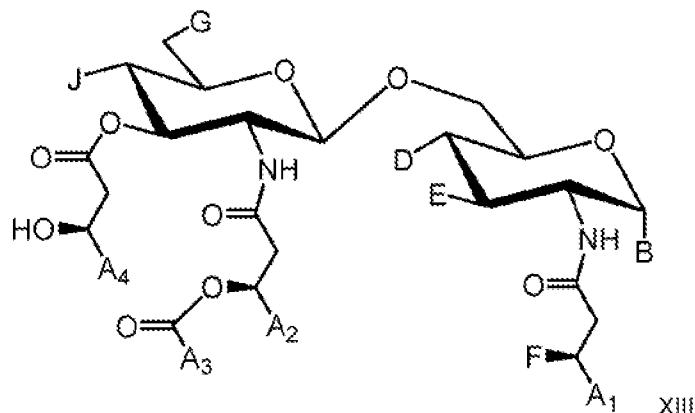
En un tercer aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir, A₃ es alquilo C₁₁ sin sustituir y A₅ es un alquilo C₁₃ sin sustituir.

10 En una realización de la presente invención como se reivindica en la presente memoria, el compuesto lipídico disacárido sintético tiene la estructura mostrada en la fórmula X:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En otro aspecto descrito en la presente memoria, algunos compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen la estructura general mostrada en la fórmula XIII:



o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que:

D, E, G y F se seleccionan cada uno independientemente de alquilo C₁-C₄, -OH, -SH, -OC(=O)(CH₂)_m-CH₃, -OC(=O)(CH₂)_nC(=O)OH o -OC(=O)CH(NH₂)(CH₂)_nC(=O)OH;

5 J y B se seleccionan cada uno independientemente de OH, OR₁, H, -OP(=O)(OH)₂-, OP(=O)(OR₂)₂-, -OS(=O)(OH)₂-, -OS(=O)(OR₂)₂-, -OS(OH)₂-, -OS(OR₂)₂-, -C(=O)OH-, -C(=O)OR₂- o un grupo ácido;

A₁, A₂ y A₄ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₆ a C₁₈ sustituido o sin sustituir;

A₃ se selecciona de alquilo o alquenilo C₇ a C₁₉ sustituido o sin sustituir;

R₁ es un alquilo C₁-C₄ sustituido o sin sustituir;

10 R₂ es, independientemente para cada aparición, H, alquilo, alquilo sustituido o un residuo de aminoácido unido en N; y

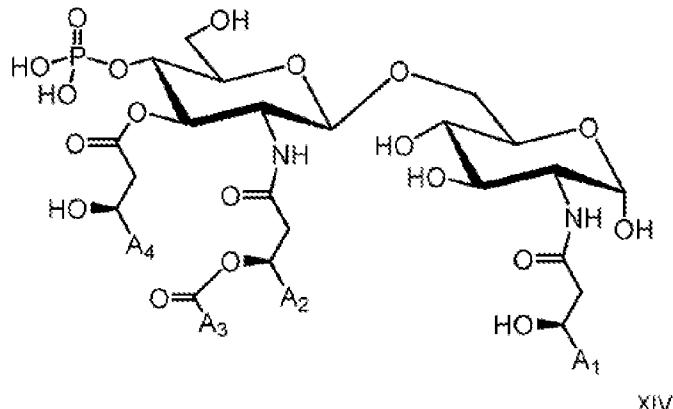
m y n son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5.

En un primer aspecto, de la fórmula XIII, J es -OP(=O)(OH)₂- y B es OH.

15 En un segundo aspecto, D, E, F y G son cada uno OH. En un tercer aspecto, J es -OP(=O)(OH)₂- y B es -OH y D, E, F y G son cada uno OH. En cualquiera al tercer aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno independientemente un alquilo C₉ a C₁₃ sin sustituir, A₃ es un alquilo C₁₁ a C₁₅ sin sustituir.

En cualquiera del primero al tercer aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir, A₃ es un alquilo C₁₃ sin sustituir.

20 En aún otro aspecto, tales compuestos lipídicos disacáridos sintéticos tienen la estructura general mostrada en la fórmula XIV:



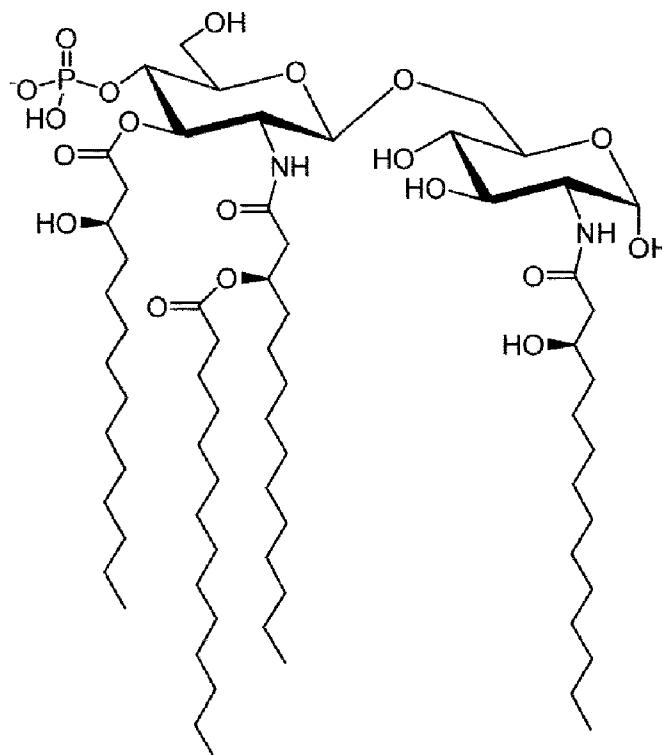
o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que:

A₁, A₂ y A₄ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo o alquenilo C₆ a C₁₈ sustituido o sin sustituir; y A₃ se selecciona de alquilo o alquenilo C₇ a C₁₉ sustituido o sin sustituir;

En un primer aspecto de fórmula XIV, A₁, A₂, y A₄ son cada uno independientemente alquilo C₉ a C₁₃ sin sustituir y A₃ es un alquilo C₁₁ a C₁₅ sin sustituir.

5 En un segundo aspecto, A₁, A₂, y A₄ son cada uno alquilo C₁₁ sin sustituir y A₃ es un alquilo C₁₃ sin sustituir.

En una segunda realización de la presente invención, según se reivindica en la presente memoria, tal compuesto lipídico disacárido sintético tiene la estructura mostrada en la fórmula XV:



XV

o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Métodos de uso de los compuestos de la presente descripción

Las referencias al método de tratamiento en la siguiente divulgación deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

15 La presente descripción muestra que se pueden preparar compuestos lipídicos disacáridos sintéticos en una forma básicamente pura. Por lo tanto, la provisión de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos básicamente puros de la presente descripción posibilita métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que están exentos de las desventajas de los compuestos conocidos en la técnica.

20 En una realización, la presente divulgación proporciona métodos para estimular o generar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Tal método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad de un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente descripción o una sal farmacológicamente aceptable del mismo. En un aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra solo. En otra forma, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un segundo adyuvante o adyuvantes adicionales. En otro aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un antígeno. En otro aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un antígeno y un segundo adyuvante o adyuvantes adicionales. En una realización, tal administración incrementa una respuesta inmunitaria en un sujeto. Cuando se incluye un antígeno, tal administración incrementa una respuesta inmunitaria en un sujeto que es específica, al menos en parte, respecto del antígeno administrado.

25 En una realización, la presente divulgación proporciona métodos para incrementar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Tal método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad de un compuesto lipídico disacárido

- sintético de la presente descripción o una sal farmacológicamente aceptable del mismo. En un aspecto, un compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra solo. En un aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un segundo adyuvante o adyuvantes adicionales. En un aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un antígeno. En un aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un antígeno y un segundo adyuvante o adyuvantes adicionales. En una realización, tal administración incrementa una respuesta inmunitaria en un sujeto. Cuando se incluye un antígeno, tal administración incrementa una respuesta inmunitaria en un sujeto que es específica, al menos en parte, respecto del antígeno administrado.
- 10 En una realización, la presente divulgación proporciona métodos para estimular la producción de inmunoglobulinas en un sujeto. En una realización, la inmunoglobulina es IgG. En otra realización, la inmunoglobulina es IgM. Tal método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad de un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente descripción o una sal farmacológicamente aceptable del mismo. En un aspecto, un compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra solo. En otro aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un segundo adyuvante o adyuvantes adicionales. En otro aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un antígeno. En otro aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un antígeno y un segundo adyuvante o adyuvantes adicionales. En una realización, tal administración estimula o incrementa una respuesta inmunitaria en un sujeto. Cuando se incluye un antígeno, la inmunoglobulina producida puede ser específica hacia el antígeno administrado.
- 15 Los receptores de tipo Toll (TLRs), que incluyen TLR4, son receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Los TLRs desempeñan un papel muy conocido en el inicio de las respuestas inmunitarias. Se han identificado al menos 10 TLRs funcionales en los seres humanos. Cada TLR detecta diferentes patrones moleculares asociados a patógenos derivados de virus, bacterias, micobacterias, hongos, y parásitos. Las bacterias gram-negativas se detectan en general 20 a través del constituyente de la pared celular de lipopolisacárido (LPS), que se une en un complejo con la proteína de unión a LPS (LBP) a un complejo receptor de TLR4, CD14 y una proteína asociada (MD-2). Las cascadas de señalización mediadas por TLR4 modulan después la expresión génica hacia la producción de una diversidad de citocinas pro-inflamatorias, tales como interleucina (IL)-6, factor de necrosis tumoral (TNF)- α e IL-12. Además, estos eventos de señalización incrementan la función co-estimuladora de los monocitos.
- 25 30 En una realización, la presente divulgación proporciona métodos para estimular TLR4 y/o estimular una respuesta de TLR4. Estimular una respuesta de TLR4 incluye estimular la señalización de TLR4. Tal método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad de un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente descripción o una sal farmacológicamente aceptable del mismo. En un aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra solo. En un aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un segundo adyuvante o adyuvantes adicionales. En un aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un antígeno. En un aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra con un antígeno y un segundo adyuvante o adyuvantes adicionales. En una realización, tal administración estimula o incrementa una respuesta inmunitaria en un sujeto. Cuando se incluye un antígeno, tal administración estimula o incrementa una respuesta inmunitaria en un sujeto que es específica, al menos en parte, respecto del antígeno administrado.
- 35 40 En un aspecto de estas realizaciones, la presente divulgación posibilita la monoterapia mediante el uso de un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente descripción solo (es decir, sin la adición de un antígeno u otros modificadores de la respuesta inmunitaria). En tal aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético estimula una respuesta inmunitaria inespecífica en un sujeto con el fin de tratar y/o prevenir una enfermedad o afección en un sujeto. En un aspecto de estas realizaciones, la presente divulgación posibilita la terapia mediante el uso de un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente descripción en combinación con un segundo adyuvante (pero sin la adición de un antígeno). En tal aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético y el segundo adyuvante estimulan una respuesta inmunitaria inespecífica en un sujeto con el fin de tratar y/o prevenir una enfermedad o afección en un sujeto.
- 45 50 En un aspecto de estas realizaciones, la presente descripción posibilita una composición farmacéutica, tal como una vacuna, que comprende un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente descripción en combinación con un antígeno y un segundo adyuvante opcional, y otros componentes como se describen en la presente memoria. En tal aspecto, la composición farmacéutica estimula una respuesta inmunitaria específica en un sujeto con el fin de tratar y/o prevenir una enfermedad o afección en un sujeto.
- 55 60 En un aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (I). En otro aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (VI). Aún en otro aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (VII). En otro aspecto adicional, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (VII). En otro aspecto, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (IX). En otros aspectos de estas realizaciones, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (X) como se describe en la reivindicación

1. En otro aspecto descrito en la presente memoria, el el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (XIII). Aún en otro aspecto, el el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (XIV). En otro aspecto de estas realizaciones, el el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (XV) como se describe en la reivindicación 1.

5 En un aspecto de estas realizaciones, el el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (X) o (XV). En un aspecto de estas realizaciones, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de fórmula general (X). En un aspecto de estas realizaciones, el el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general (XV).

10 En un aspecto de estas realizaciones, el segundo adyuvante es cualquier compuesto que tiene un efecto inmunoestimulador que no es un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente descripción. Tal como se usa en la presente memoria, el término inmunoestimulador y los términos similares significan que un compuesto o composición proporciona un agente que incrementa la respuesta inmunitaria de un sujeto, de una manera general o en respuesta a un antígeno.

15 En un aspecto de estas realizaciones, el segundo adyuvante es Monofosforil Lípido A (también conocido como disacárido hexaacilado mono-fosforilado y PHAD™) (Avanti Polar Lipids, Alabaster AL; número de catálogo 699800). En otro aspecto de estas realizaciones, el segundo adyuvante es un agonista de TLR.

20 En un aspecto de estas realizaciones, el compuesto lipídico disacárido sintético se puede administrar solo o como parte de una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria. Se puede administrar un único compuesto de fórmula general descrita anteriormente; se pueden administrar múltiples compuestos de la fórmula general descrita anteriormente.

25 En un aspecto es estas realizaciones, se determina que el sujeto necesita tal tratamiento. En un aspecto adicional de estas realizaciones, el compuesto lipídico disacárido sintético se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Además en un aspecto de los métodos descritos anteriormente, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general X o XV. En un aspecto de los métodos descritos anteriormente, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la fórmula general X. En un aspecto de los métodos descritos anteriormente, el compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de fórmula general XV.

En los métodos divulgados en la presente memoria, el sujeto puede ser un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

30 Los compuestos y las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una diversidad de intervalos de dosis. En un aspecto de las realizaciones anteriores, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 0,0001 µg/kg a alrededor de 5 mg/kg. En otro aspecto de las realizaciones anteriores, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 0,01 µg/kg a alrededor de 2 mg/kg. En otro aspecto de las realizaciones anteriores, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 0,1 µg/kg a alrededor de 1 mg/kg. En otro aspecto de la realización anterior, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 0,1 µg/kg a alrededor de 0,1 mg/kg. En otro aspecto de la realización anterior, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 1 µg/kg a alrededor de 50 µg/kg. En otro aspecto de la realización anterior, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 1 µg/kg a alrededor de 25 µg/kg. En otro aspecto de la realización anterior, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 1 µg/kg a alrededor de 15 µg/kg. En otro aspecto de la realización anterior, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 0,001 µg/kg a alrededor de 15 µg/kg. En otro aspecto de la realización anterior, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 0,01 µg/kg a alrededor de 15 µg/kg. En otro aspecto de la realización anterior, la dosis del compuesto lipídico disacárido sintético es de alrededor de 0,1 µg/kg a alrededor de 15 µg/kg.

45 En los métodos descritos en la presente memoria, los sujetos tratados se pueden tratar además con uno o más agentes activos adicionales. Estos agentes activos adicionales se pueden administrar junto con o por separado de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción. Será evidente para los expertos en la técnica que el número y la frecuencia de la administración dependerán de la respuesta del sujeto.

Antígeno

50 Un antígeno, para el uso en ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, puede ser cualquier molécula o complejo de moléculas que genera una respuesta inmunitaria. En una realización, la molécula o complejo de moléculas genera una respuesta inmunitaria débil o incompleta. En una realización, el antígeno es un epítopo objetivo hacia el que se desea una respuesta inmunitaria, una molécula (que incluye una biomolécula tal como un polipéptido o ácido nucleico), un complejo molecular (que incluye los complejos moleculares que contienen biomoléculas), una fracción subcelular, célula o tejido (o una fracción de cualquiera de los dos) hacia los que se desea la generación de una respuesta inmunitaria. Cuando un polipéptido es un antígeno, el polipéptido puede ser natural o recombinante. En una realización, las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o composición antigénica capaz de provocar una respuesta inmunitaria hacia un patógeno humano o mamífero; en tal realización, el antígeno se puede obtener a partir de tal patógeno, o puede ser un antígeno que reacciona de manera cruzada con tal patógeno.

Composiciones farmacéuticas

La presente descripción proporciona diversas composiciones farmacéuticas. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprenden, consisten o consisten básicamente en al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden comprender además agentes adicionales, tales como, pero sin limitación, segundos adyuvantes y un antígeno.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprenden, consisten o consisten básicamente en al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprenden, consisten o consisten básicamente en al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de acuerdo con la reivindicación 1, un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable y un antígeno.

15 En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprenden, consisten o consisten básicamente en al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable y un segundo adyuvante.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprenden, consisten o consisten básicamente en al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de acuerdo con la reivindicación 1, un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, un antígeno y un segundo adyuvante.

20 En un aspecto descrito en la presente memoria, el al menos compuesto lipídico disacárido sintético de la presente divulgación es un compuesto de la estructura general (I). En un aspecto, el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente divulgación es un compuesto lipídico disacárido sintético de la estructura general (VI). En aú otro aspect, el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente divulgación es un compuesto de la estructura general (VII). En aú otro aspecto de las realizaciones anteriores, el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente divulgación es un compuesto de la estructura general (VIII). En aú otro aspect, el al 25 menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente divulgación es un compuesto de la estructura general (IX). En un aspecto adicional de las realizaciones anteriores de acuerdo con la reivindicación 1, el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente divulgación es un compuesto de la estructura general (X). En otro aspecto como se describe en la presente memoria el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la 30 presente divulgación es un compuesto de la estructura (XIII). Incluso en otro aspecto, el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente divulgación es un compuesto de la estructura general (XIV). Incluso en otro aspecto de las realizaciones anteriores de acuerdo con la reivindicación 1, el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente divulgación es un compuesto de la estructura general (XV).

35 Incluso en otro aspecto de las realizaciones anteriores, el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente invención de acuerdo con la reivindicación 1 es un compuesto de la estructura general (X) o (XV). Todavía en un aspecto adicional de las realizaciones anteriores, el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente descripción es un compuesto de estructura general (X). Todavía en un aspecto adicional de las realizaciones anteriores, el al menos un compuesto lipídico disacárido sintético es un compuesto de la estructura general (XV).

40 En un aspecto de lo anterior, la composición farmacéutica es una composición de vacuna. Como se expuso anteriormente, tal composición de vacuna puede contener solamente un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente invención de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Por definición, los efectos inmunoestimuladores los proporcionará el compuesto lipídico disacárido sintético. Además, como se expuso anteriormente, tal composición de vacuna puede contener solamente un compuesto lipídico disacárido sintético de acuerdo con la reivindicación 1, un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable y un antígeno. Por definición, los efectos inmunoestimuladores los proporcionará el compuesto lipídico disacárido sintético y/o el antígeno. Además, como se expuso anteriormente, tal composición de vacuna puede 45 contener solamente un compuesto lipídico disacárido sintético de la presente descripción, un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, un antígeno y un segundo adyuvante. Por definición, los efectos inmunoestimuladores los proporcionará el compuesto lipídico disacárido sintético, el antígeno y/o el segundo adyuvante.

50 En un aspecto de las realizaciones anteriores, el segundo adyuvante es cualquier adyuvante conocido en la técnica. El segundo adyuvante es un compuesto o compuestos que muestran una actividad adyuvante cuando se administran a un sujeto (es decir, alteran, incrementan o disminuyen, la potencia y/o longevidad de una respuesta inmunitaria como se describe en Powell y Newman, "Vaccine design--The Subunit and Adjuvant Approach", 1995, Plenum Press, Nueva York). Los segundos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, saponinas y moléculas miméticas de saponina (tales como, pero sin limitación, QS21, QS17, QS7 y las moléculas miméticas), alumbre, alcaloides vegetales (tales como, pero sin limitación, tomatina), detergentes (tales como, pero sin limitación, saponina, escina, digitonina, polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina), un copolímero en bloque o polímero biodegradable (tal como, pero sin limitación, Pluronic, L121, CRL1005, polí(ácido láctico-co-glicólico), polí(ácido láctico), poli-(D,L-lactida-co-glicolida) y ácido

poliinosínico:policitidílico), una o más citocinas (tales como, pero sin limitación, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF- α , IFN- γ), y un modificador de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina (tal como, pero sin limitación, resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod). Se puede usar más de un segundo adyuvante.

5 En un aspecto de las realizaciones anteriores, los componentes adicionales de la composición farmacéutica están exentos de compuestos que inducen una respuesta inmunitaria (excepto el compuesto lipídico disacárido sintético, el antígeno y el segundo adyuvante).

10 Las composiciones farmacéuticas descritas pueden comprender uno o más compuestos de la presente descripción, solos o en combinación con agentes activos adicionales, en combinación con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tal vehículo, excipiente o diluyente y los métodos de formulación se pueden hallar en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20^a Ed., Lippincott, Williams & Wilkins, Daniel Limmer, editor). Tales composiciones farmacéuticas se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el uso en los métodos de tratamiento y prevención descritos en la presente memoria. Los compuestos de la descripción son útiles tanto en forma libre como en forma de sales farmacéuticamente aceptables.

15 Los expertos en la técnica conocen bien el vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable descrito en la presente memoria. La elección del vehículo, excipiente o diluyente se determinará en parte por el/los compuesto(s) particular(es), así como por el método particular usado para administrar la composición. Por lo tanto, existe una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la presente invención. Los siguientes métodos y descripciones son simplemente ejemplares, y no son de ninguna manera limitantes. Los vehículos, excipientes o diluyentes adecuados incluyen disolventes tales como agua, alcohol, y propilen glicol, absorbentes y diluyentes sólidos, agentes tensioactivos, agentes de suspensión, aglutinantes para comprimidos, lubricantes, sabores, y agentes colorantes. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir polímeros y matrices poliméricas. En general, los anteriores son químicamente inertes para los agentes activos de la composición, y no tienen efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso. Los compuestos de la presente descripción y las composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos como se describen en la presente descripción se pueden administrar mediante cualquier método convencional disponible para el uso junto con productos farmacéuticos, en forma de agentes terapéuticos individuales o en combinación con agentes terapéuticos adicionales.

20 En una realización, los compuestos de la presente descripción se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz, solos o como parte de una composición farmacéutica. La cantidad terapéuticamente eficaz y la dosis administrada variarán, por supuesto, dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración, la edad, la salud y el peso del receptor; la gravedad y la etapa del estado patológico o la afección; el tipo de tratamiento concurrente; la frecuencia de tratamiento; y el efecto deseado.

25 La cantidad total del compuesto administrado también se determinará por la vía, el momento y la frecuencia de la administración, así como la existencia, naturaleza, y grado de cualquier efecto secundario adverso que podría acompañar a la administración del compuesto y el efecto fisiológico deseado. Un experto en la técnica apreciará que las diversas afecciones o estados patológicos, en particular las afecciones o estados patológicos crónicos, pueden requerir un tratamiento prolongado que implique múltiples administraciones.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las vías de administración típicas incluyen, sin limitación, la vía oral, tópica, parenteral, sublingual e intranasal (p.ej., en forma de un spray). El término parenteral, tal como se usa en la presente memoria, incluye la técnica iontoporética, transdérmica pasiva y también las inyecciones subcutáneas, y la inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, e intrameatal. Las composiciones farmacéuticas se formulan para permitir que los compuestos de la presente descripción contenidos en ellas estén biodisponibles tras la administración.

35 40 45 50 55 En una realización, la composición farmacéutica es una suspensión estable (tal como, pero sin limitación, una suspensión acuosa) de menos de 0,1 μ m, 0,2 μ m o 0,3 μ m, y puede comprender además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, tensioactivos, detergentes, saponinas, lípidos fluorados, y similares. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen las disoluciones para inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del paciente, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. El/los compuesto(s) se puede(n) administrar en un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un líquido estéril o mezcla de líquidos, que incluye agua, solución salina, dextrosa acuosa y disoluciones de carbohidratos relacionados, un alcohol, tal como etanol, isopropanol, o alcohol hexadecílico, glicoles, tales como propilen glicol o polietilen glicol tal como poli(etilenglicol) 400, cetales de glicerol, tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, éteres, un aceite, un ácido graso, un éster de ácido graso o glicérido, o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites que se pueden usar en las formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales, o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen los aceites de cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, petrolato, y aceites minerales. Los ácidos grasos adecuados para el uso en las formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico, y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados. Los jabones adecuados para el uso en las formulaciones parenterales incluyen las sales grasas de metales alcalinos, amonio, y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes cationicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetildialquiamonio, y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo, y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter, y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxietileno y polipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-β-aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquilimidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

Las formulaciones parenterales contienen en general de alrededor del 0,5% a alrededor del 50% en peso de el/los compuesto(s) en disolución. Se pueden usar conservantes y tampones adecuados en tales formulaciones. Para minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de alrededor de 12 a alrededor de 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones oscila de alrededor del 5% a alrededor del 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de polietileno sorbitán, tales como monooleato de sorbitán y los aductos de peso molecular elevado de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados mediante la condensación de óxido de propileno con propilen glicol.

En una realización la composición farmacéutica se formula de una manera que se pueda aerosolizar para la administración por medio de inhalación nasal o pulmonar. Estas formulaciones de aerosol se pueden colocar en propelentes aceptables presurizados, tales como clorodifluorometano, propano y nitrógeno. Tales formulaciones de aerosol se pueden administrar mediante inhaladores de dosis medidas. También se pueden formular como productos farmacéuticos para preparaciones sin presurizar, tal como en un nebulizador o un atomizador.

El/los compuesto(s) de la presente descripción, solo(s) o en combinación con otros componentes adecuados, se puede(n) administrar en una disolución acuosa como un espray nasal o pulmonar, y se puede(n) dispensar en forma de espray mediante una diversidad de métodos conocidos para los expertos en la técnica. Los sistemas para dispensar líquidos en forma de un espray nasal se describen en la pat. de EE.UU. nº 4.511.069. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes multi-dosis, por ejemplo en el sistema de dispensación sellado descrito en la pat. de EE.UU. nº 4.511.069. Las formas de administración de aerosol adicionales pueden incluir, p.ej., los nebulizadores de aire comprimido, chorro, ultrasónicos, y piezoelectrónicos, que administran el agente activo disuelto o suspendido en un disolvente farmacéutico, p.ej., agua, etanol, o una mezcla de los mismos. Las disoluciones nasales y pulmonares de la presente invención comprenden en general el fármaco o fármacos a administrar, opcionalmente formulados con un agente tensioactivo, tal como un tensioactivo no iónico (p.ej., polisorbato-80), y uno o más tampones. En ciertas realizaciones de la presente invención, la disolución de espray nasal comprende además un propelente. El pH de la disolución de espray nasal está opcionalmente entre alrededor de un pH 3,0 y 6,0, preferiblemente $4,5 \pm 0,5$. Los tampones adecuados para el uso en estas composiciones son como se describieron anteriormente, o como se conocen de otra manera en la técnica. Se pueden añadir otros componentes para incrementar o mantener la estabilidad química, que incluyen conservantes, tensioactivos, dispersantes, o gases. Los conservantes adecuados incluyen, pero sin limitación, fenol, metil parabeno, parabeno, m-cresol, tiomersal, clorobutanol, cloruro de benzalconio, y similares. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido oleico, trioleato de sorbitán, polisorbatos, lecitina, fosfatidil colinas, y diversos diglicéridos y fosfolípidos de cadena larga. Los dispersantes adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido etilendiamintetraacético, y similares. Los gases adecuados incluyen, pero sin limitación, nitrógeno, helio, clorofluorocarbonos (CFCs), hidrofluorocarbonos (HFCs), dióxido de carbono, aire, y similares.

Dentro de realizaciones alternativas, las formulaciones nasales y pulmonares se administran en forma de formulaciones de polvos secos que comprenden el agente activo en una forma seca, normalmente liofilizada, de un tamaño de partícula adecuado, o en un intervalo de tamaños de partícula adecuados, para la administración intransal.

El tamaño de partícula mínimo adecuado para el depósito en las fosas nasales o las vías pulmonares es a menudo de un diámetro aerodinámico equivalente mediano en masa (MMEAD) de alrededor de $0,5 \mu\text{m}$, habitualmente un MMEAD de alrededor de $1 \mu\text{m}$, y más en general un MMEAD de alrededor de $2 \mu\text{m}$. El tamaño de partícula máximo adecuado para el depósito en las fosas nasales es a menudo de un MMEAD de alrededor de $10 \mu\text{m}$, habitualmente un MMEAD de alrededor de $8 \mu\text{m}$, y más en general un MMEAD de alrededor de $4 \mu\text{m}$. Los polvos respirables de manera intransal y pulmonar en estos intervalos de tamaños se pueden producir mediante una diversidad de técnicas convencionales, tales como molienda de chorro, secado por pulverización, precipitación con disolventes, condensación de fluidos supercríticos, y similares. Estos polvos secos de MMEAD adecuado se pueden administrar a un paciente por medio de un inhalador convencional de polvos secos (DPI), que se basa en la respiración del paciente, tras la inhalación pulmonar o nasal, para dispersar el polvo en una cantidad aerosolizada. De manera alternativa, el polvo seco se puede administrar por medio de dispositivos impulsados por aire, que usan una fuente de potencia externa para dispersar el polvo en una cantidad aerosolizada, p.ej., una bomba de pistón.

Para formular las composiciones para la administración nasal o pulmonar, el agente activo se puede combinar con diversos aditivos farmacéuticamente aceptables, así como una base o vehículo para la dispersión de el/los agente(s) activo(s). Los aditivos deseados incluyen, pero sin limitación, agentes de control del pH, tales como arginina, hidróxido sódico, glicina, ácido clorhídrico, ácido cítrico, etc. Además, se pueden incluir anestésicos locales (p.ej., alcohol bencílico), agentes isotónicos (p.ej., cloruro sódico, manitol, sorbitol), inhibidores de la adsorción (p.ej., Tween SO), agentes que incrementan la solubilidad (p.ej., ciclodextrinas y derivados de las mismas), estabilizantes (p.ej., albúmina de suero), y agentes reductores (p.ej., glutatió). Cuando la composición para administración nasal o pulmonar es un líquido, la tonicidad de la formulación, tal como se mide con referencia a la tonicidad de una solución salina fisiológica del 0,9% (p/v) tomada como unidad, se ajusta en general a un valor en el que no se inducirá un daño tisular sustancial, irreversible, en la mucosa nasal en el sitio de administración. En general, la tonicidad de la disolución se ajusta a un valor de alrededor de 1/3 a 3, más en general 1/2 a 2, y lo más a menudo 3/4 a 1,7.

En una realización una composición farmacéutica de la descripción es una emulsión. En la técnica se conocen y se pueden usar los sistemas de emulsión simples o multifase. Se pueden usar adyuvantes de emulsión de aceite en agua y emulsiones de agua en aceite. En una realización, una composición farmacéutica de la descripción es una emulsión de aceite en agua en la que el compuesto lipídico disacárido sintético se incorpora en la fase oleosa. El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no es tóxico para el sujeto y que es capaz de transformarse mediante el metabolismo. Los frutos secos (tales como el aceite de cacahuete), semillas, y granos son fuentes habituales de aceites vegetales. El escualeno es un aceite insaturado que se halla en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en cantidades inferiores en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levadura. En una realización, las emulsiones de aceite en agua son emulsiones de escualeno en agua. Tales emulsiones pueden contener componentes adicionales tales como un segundo adyuvante y otros compuestos tales como antioxidantes, y otros compuestos lipídicos para estabilizar la emulsión. El tamaño de las gotículas de aceite halladas en la emulsión estable de aceite en agua es preferiblemente menor de 1 μm , tal como en el intervalo de 25 a 500 nm. Los métodos para producir las emulsiones de aceite en agua son muy conocidos.

Los compuestos y las composiciones de la presente descripción se pueden presentar en dosis unitarias o en recipientes sellados multi-dosis, tales como ampollas y viales, que requieren solamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Ciertas composiciones se pueden almacenar en un estado liofilizado, si se desea. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección improvisada a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. Los requisitos para los vehículos farmacéuticamente aceptables eficaces para las composiciones inyectables son muy conocidos para los expertos habituales en la técnica. Véase Pharmaceutical and Pharmacy Practice, J.B. Lippincott Co., Filadelfia, Pa., Bunker y Chalmers, Eds., 238-250 (1982) y ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4^a ed., 622-630 (1986).

En una realización, la composición farmacéutica está en forma de un liposoma u otro mecanismo de liberación lenta. Los mecanismos adecuados de liberación lenta se describen en la patente de EE.UU. nº 5.888.519, e incluyen polímeros de diversos tipos, microcápsulas, y microesferas.

Bangham (Bangham et al., 1965) describe los métodos preferidos para producir preparaciones de liposomas. Esta preparación implica disolver fosfolípidos en un disolvente orgánico que se evapora después hasta sequedad, lo que deja una película lipídica fina en el interior del tubo de ensayo. La película lipídica seca se hidrata después en una cantidad adecuada de fase acuosa, y la mezcla se calienta por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos y se deja "hinchar". Los liposomas resultantes que consisten en vesículas multilamelares (MLVs) se dispersan agitando el tubo de ensayo. Los lípidos que constituyen las membranas de la bicapa vesicular se organizan de forma que las "colas" de los hidrocarburos hidrófobos se orientan hacia el centro de la bicapa mientras las "cabezas" hidrófilas se orientan hacia el interior y el exterior de la fase acuosa, respectivamente. Esta preparación proporciona la base para producir vesículas unilamelares (UV) mediante métodos tales como sonicación (Papahadjopoulos et al., 1967) o extrusión como se describe en Cullis et al. en la pat. de EE.UU. nº 5.008.050.

Generalmente se entiende que los liposomas consisten en membranas lipídicas que son capaces de encerrar un espacio acuoso interno, y las membranas pueden consistir en una diversidad de tipos de lípidos. Por claridad, no se debería considerar que el término liposoma requiera la presencia de una membrana cerrada, más bien se debería entender que el término requiere que los lípidos se auto-asocien de forma que formen una estructura particulada. Entre los lípidos que se han usado solos o en combinación con otros lípidos para construir liposomas, se incluyen los fosfolípidos, glicolípidos, glicofosfolípidos, diglicéridos, triglicéridos, esteroles, esteroides, terpenoides, ácidos grasos libres, y vitaminas lipoidiales.

La liberación de los materiales de los liposomas se da muy habitualmente mediante difusión, pero también pueden ser aplicables otros diversos mecanismos de liberación. Además, el liposoma puede actuar únicamente como vehículo, en vez de como depósito de liberación de fármacos. El resultado es una liberación lenta del compuesto desde el liposoma. Estos mecanismos se describen con más detalle en Langer, R., New methods of drug delivery. Science 249:1527-1533 (1990). En una realización particular, los liposomas para el uso en las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción comprenden una mezcla de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), y colesterol (Col). En una realización particular, los DMPC/DMPG/Col están presentes en proporciones molares de 9/1/7. En otra realización particular, los DMPC/DMPG/Col están presentes en proporciones molares de 1,8/0,2/1,5. Los compuestos de la presente descripción se pueden incorporar en tales liposomas como se conoce en

la técnica (véanse, por ejemplo, los números de publicación PCT WO2007/068411 y WO2005/081872) descrita en la presente memoria.

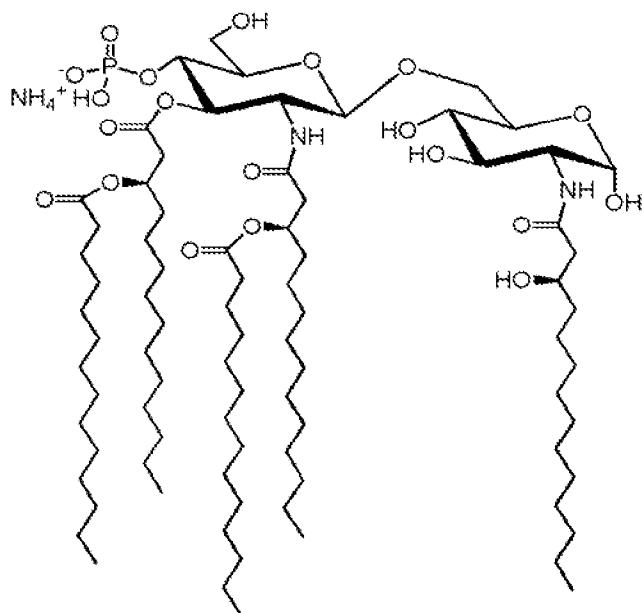
Ejemplos

Ejemplo 1 - Pureza de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos

5 Se sintetizaron y se caracterizaron los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción. Los compuestos según la reivindicación 1 sintetizados incluyen los compuestos de la fórmula estructural general X (a veces denominados MPLA-D) y XV (a veces denominado MPLA-C).

Pureza de MPLA-B

10 MPLA-B (que no entra dentro del alcance de la reivindicación 1) tiene la estructura mostrada a continuación. El peso molecular de este compuesto es 1537,11 ($C_{82}H_{158}N_3O_{20}P$).



En este compuesto hay presentes cadenas acilo en las posiciones 2, 2' y 3', y hay presentes 2 cadenas acilo en las posiciones 2' y 3'. Cada cadena acilo tiene una longitud de cadena de 14 carbonos, y cada cadena acilo está saturada.

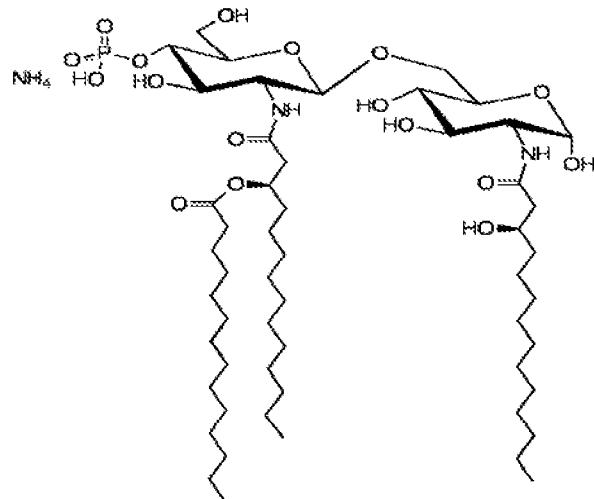
15 El compuesto se analizó mediante CCF, RMN de fósforo, RMN de protón y espectroscopía de masas. Los resultados se muestran en la Tabla 1A a continuación. Como se puede observar, se determinó que el compuesto tuvo una pureza superior al 99%, y tuvo una estructura coherente con la estructura mostrada anteriormente.

Tabla 1A

Ensayo	Límites	Resultados
CCF	>99% de pureza	>99% de pureza
Ninhidrina	Negativo	Negativo
Fósforo	Positivo	Positivo
Yodo	Un punto	Un punto
Carbón vegetal	Positivo	Positivo
RMN de fósforo	Coherente con la estructura, 1 pico que contiene fósforo	Pasado
RMN de protón	Coherente con la estructura	Pasado
Espectroscopía de masas	$[M-NH_4]^+ = 1518,11 \pm 1$ uma	$[M-NH_4]^+ = 1518,40$ uma

Pureza de MPLA-D

MPLA-D tiene la estructura mostrada a continuación (así como en la fórmula estructural general X). El peso molecular de este compuesto es 1100,40 ($C_{54}H_{106}N_3O_{17}P$).



- 5 En este compuesto hay presentes cadenas acilo en las posiciones 2 y 2', hay presentes 2 cadenas acilo en la posición 2', y hay presente una cadena acilo en la posición 2. Cada cadena acilo tiene una longitud de cadena de 14 carbonos, y cada cadena acilo está saturada.

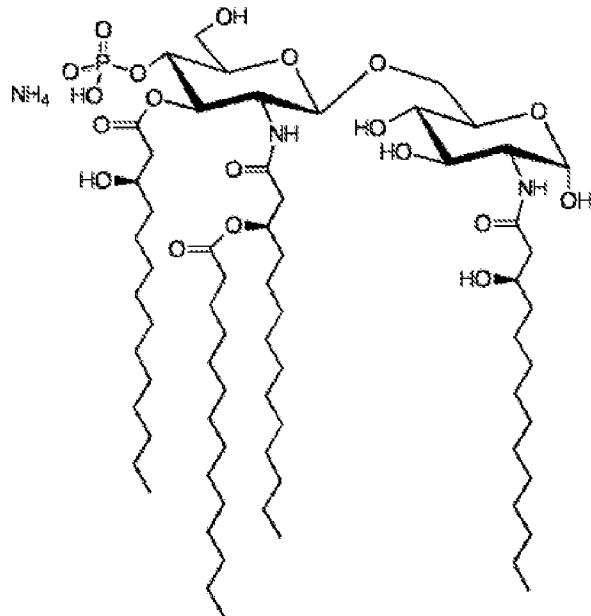
El compuesto se analizó mediante CCF, RMN de fósforo, RMN de protón y espectroscopía de masas. Los resultados se muestran en la Tabla 1B a continuación. Como se puede observar, se determinó que el compuesto tuvo una pureza superior al 99%, y tuvo una estructura coherente con la estructura mostrada anteriormente.

Tabla 1B

Ensayo	Límites	Resultados
CCF	>99% de pureza	>99% de pureza
Ninhidrina	Negativo	Negativo
Fósforo	Positivo	Positivo
Yodo	Un punto	Un punto
Carbón vegetal	Positivo	Positivo
RMN de protón	Coherente con la estructura	Pasado
Espectroscopía de masas	$[M-NH_4]^+ = 1082,4 \pm 1$ uma	$[M-NH_4]^+ = 1082,4$ uma

Pureza de MPLA-C

MPLA-C tiene la estructura mostrada a continuación (así como en la fórmula estructural general XV). El peso molecular de este compuesto es 1326,76 ($C_{68}H_{132}N_3O_{19}P$).



En este compuesto hay presentes cadenas acilo en las posiciones 2, 2' y 3', hay presentes 2 cadenas acilo en la posición 2', y hay presente una cadena acilo en las posiciones 3' y 2. Cada cadena acilo tiene una longitud de cadena de 14 carbonos, y cada cadena acilo está saturada.

- 5 El compuesto se analizó mediante CCF, RMN de fósforo, RMN de protón y espectroscopía de masas. Los resultados se muestran en la Tabla 1C a continuación. Como se puede observar, se determinó que el compuesto tuvo una pureza superior al 99%, y tuvo una estructura coherente con la estructura mostrada anteriormente.

Tabla 1C		
Ensayo	Límites	Resultados
CCF	>99% de pureza	>99% de pureza
Ninhidrina	Negativo	Negativo
Fósforo	Positivo	Positivo
Yodo	Un punto	Un punto
Carbón vegetal	Positivo	Positivo
RMN de protón	Coherente con la estructura	Pasado
Espectroscopía de masas	$[M-NH4]^+ = 1308,76 \pm 1$ uma	$[M-NH4]^+ = 1305,5$ uma

Ejemplo 2 - Los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos estimulan el receptor TLR-4 humano y de ratón

- 10 En este ejemplo, se ensayó la capacidad de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción con respecto a su capacidad de activar el receptor de tipo Toll 4 (TLR-4) humano y de ratón. TLR-4 detecta el lipopolisacárido (LPS) hallado en la mayoría de bacterias gram-negativas, y por tanto es importante en la activación del sistema inmunitario innato. TLR-4 también se ha denominado CD284. TLR-4 señala la presencia de LPS mediante la asociación con otras dos proteínas de la superficie celular, LY96 (o MD2) y CD14, y cuando el complejo TLR-4:LY96:CD14 se une a LPS se activa la ruta de señalización de NFkB intracelular. Las mutaciones en el gen *TLR4* se han asociado con diferencias en la sensibilidad hacia LPS. Los resultados muestran que los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción fueron eficaces en la estimulación del receptor TLR-4 humano y de ratón.
- 15 Se utilizaron líneas celulares HEK-293 modificadas para sobreexpresar funcionalmente el receptor TLR-4 humano o murino en los experimentos siguientes. Estas células también contienen un gen indicador (una fosfatasa alcalina secretada) bajo control de un promotor inducible por NFkB. Los resultados de la activación de TLR-4 se proporcionan

- 20

como los valores de densidad óptica (DO) tras la estimulación durante 18 horas de las líneas celulares HEK-293 designadas.

Las muestras y los controles se ensayan por duplicado en líneas celulares HEK-293 recombinantes. Los controles negativos para el ensayo fueron las líneas celulares HEK-293 originales transfectadas solamente con el gen indicador.

5 Las células del control negativo se estimularon con TNF- α , un inductor de la actividad de NF κ B. Los controles positivos para el ensayo fueron células HEK-293 transfectadas con TLR-4 humano (hTLR-4) o TLR-4 de ratón (mTLR-4) junto con la construcción indicadora, y se activaron con LPS 0111 (obtenido de la cepa 0111:B4 de *E. coli*) de 100 ng/ml a 0,01 ng/ml o con LPS K12 (obtenido de la cepa K12 de *E. coli*) de 100 ng/ml a 0,01 ng/ml.

10 El compuesto lipídico disacárido sintético usado en este ensayo fue el compuesto de estructura V (denominado en la presente memoria MPLA-B). Como comparación, también se presentan los resultados mediante el uso del compuesto lipídico disacárido hexa-acilado conocido como PHADTM (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Se ha demostrado que PHADTM tiene propiedades inmunoestimuladoras. Los compuestos de ensayo se usaron a concentraciones de 10 μ g/ml (que correspondieron a 5,7 μ M para PHADTM y a 6,5 μ M para MPLA-B) a 0,01 μ g/ml cuando se ensayaron solos, o a 5 μ g/ml a 0,005 μ g/ml cada uno cuando se ensayaron en combinación.

15 Los resultados se presentan en las Tablas 2-10. Las Tablas 2 y 3 muestran los resultados de los controles negativos para las células hTLR-4, que indican que ninguno de los compuestos de ensayo, solos o en combinación, estimularon la línea celular original murina (mTLR).

Tabla 2

	100 ng/ml	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml
TNF- α	0,477	0,470	0,047	0,005	0,009	0,004
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	0,3 μ g/ml	0,1 ng/ml	0,03 μ g/ml	0,01 μ g/ml
MPLA-B	-0,015	0,005	0,019	0,011	0,003	0,031
PHAD TM	-0,009	-0,026	0,015	-0,013	-0,003	0,003

20 Tabla 3

	100 ng/ml	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml
TNF- α	0,477	0,470	0,047	0,005	0,009	0,004
	5 μ g/ml	0,5 μ g/ml	0,15 μ g/ml	0,05 μ g/ml	0,015 μ g/ml	0,005 μ g/ml
MPLA-B + PHAD TM	0,002	-0,003	0,011	0,001	0,002	0,021

Las Tablas 4 y 5 muestran que los compuestos de ensayo, tanto solos como en combinación, estimularon el receptor hTLR-4.

Tabla 4

	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml	0,1 ng/ml
LPS 0111	1,387	1,262	1,135	0,899	0,577	0,275
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	0,3 μ g/ml	0,1 μ g/ml	0,03 μ g/ml	0,01 μ g/ml
MPLA-B	1,169	0,835	0,697	0,510	0,102	-0,017
PHAD TM	1,539	1,347	1,187	1,191	0,071	0,033

ES 2 992 314 T3

Tabla 5

	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml	0,1 ng/ml
TNF- α	1,387	1,262	1,135	0,899	0,577	0,275
	5 μ g/ml	0,5 μ g/ml	0,15 μ g/ml	0,05 μ g/ml	0,015 μ g/ml	0,005 μ g/ml
MPLA-B + PHAD TM	1,487	1,332	1,234	0,866	-0,002	0,014

Las Tablas 6 y 7 muestran los resultados de los controles negativos para las células mTLR-4, que indican que ninguno de los compuestos de ensayo, solos o en combinación, estimularon la línea celular original murina (mTLR).

5 Tabla 6

	100 ng/ml	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml
TNF- α	3,935	3,586	1,233	0,033	0,017	0,035
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	0,3 μ g/ml	0,1 μ g/ml	0,03 μ g/ml	0,01 μ g/ml
MPLA-B	-0,004	-0,016	0,007	-0,009	0,000	0,165
PHAD TM	-0,021	-0,010	0,001	-0,019	0,010	0,024

Tabla 7

	100 ng/ml	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml
LPS 0111	3,935	3,586	1,233	0,033	0,017	0,035
	5 μ g/ml	0,5 μ g/ml	0,15 μ g/ml	0,05 μ g/ml	0,015 μ g/ml	0,005 μ g/ml
MPLA-B + PHAD TM	-0,012	0,003	0,003	-0,023	-0,001	0,016

10 Las Tablas 8 y 9 muestran que los compuestos de ensayo, tanto solos como en combinación, estimularon el receptor mTLR-4.

Tabla 8

	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml	0,1 ng/ml
LPS 0111	3,470	3,473	3,382	3,106	2,578	1,795
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	0,3 μ g/ml	0,1 μ g/ml	0,03 μ g/ml	0,01 μ g/ml
MPLA-B	3,179	2,667	2,450	2,267	1,552	0,065
PHAD TM	3,490	3,308	3,164	3,171	0,869	0,373

Tabla 9

	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml	0,1 ng/ml
LPS 0111	1,387	1,262	1,135	0,899	0,577	0,275
	5 ng/ml	0,5 μ g/ml	0,15 μ g/ml	0,05 μ g/ml	0,015 μ g/ml	0,005 μ g/ml
MPLA-B + PHAD TM	3,416	3,129	2,993	2,627	0,449	0,155

Otro compuesto lipídico disacárido sintético usado en este ensayo en un experimento independiente fue el compuesto de estructura X (denominado en la presente memoria MPLA-D). Como comparación, también se presentan los resultados mediante el uso del compuesto lipídico disacárido hexa-acilado conocido como PHAD™ (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Se ha demostrado que PHAD™ tiene propiedades inmunoestimuladoras. Los compuestos de ensayo se usaron a las siguientes concentraciones: 5,7 μ M/ 570 nM/ 171 nM/ 57 nM/ 17 nM/ 5,7 nM/pocillo para estimular por duplicado las líneas celulares que expresaban mTLR4.

5 Los resultados se presentan en la Tabla 10. La Tabla 10 muestra que MPLA-D activa la línea celular que expresaba mTLR4 hasta 570 nM.

Tabla 10

	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml	0,1 ng/ml	0,03 ng/ml	0,01 ng/ml
LPS K12	3,108	2,709	1,878	0,984	0,485	0,101	-0,065
	5,7 μ M	570 nM	171 nM	57 nM	17 nM	5,7 nM	
MPLA-D	2,541	0,880	0,251	0,073	-0,004	0,003	
PHAD™	3,884	3,917	3,756	3,703	3,640	3,368	

10

La Tabla 11 muestra los resultados de los controles negativos que indican que ninguno de los compuestos de ensayo (PHAD™ y MPLA-D) estimularon la línea celular original murina (mTLR).

Tabla 11

	100 ng/ml	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml
TNF- α	3,628	3,502	0,553	0,027	0,003	0,025
	5,7 μ M	570 nM	171 nM	57 nM	17 nM	5,7 nM
PHAD™	-0,033	0,001	-0,024	-0,029	-0,031	-0,019
MPLA-D	-0,034	-0,028	-0,044	-0,019	-0,020	-0,034

15 Otro compuesto lipídico disacárido sintético usado en este ensayo en un experimento independiente fue el compuesto de estructura XV (denominado en la presente memoria MPLA-C). Como comparación, también se presentan los resultados mediante el uso del compuesto lipídico disacárido hexa-acilado conocido como PHAD™ (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Se ha demostrado que PHAD™ tiene propiedades inmunoestimuladoras. Los compuestos de ensayo se usaron a las siguientes concentraciones: 5,7 μ M/ 570 nM/ 171 nM/ 57 nM/ 17 nM/ 5,7 nM/pocillo para estimular por duplicado las líneas celulares que expresaban hTLR4 y mTLR4.

20 Los resultados se presentan en las Tablas 12-15. La Tabla 12 muestra que MPLA-C activa la línea celular que expresa hTLR4.

Tabla 12

	10 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml	0,1 ng/ml	0,03 ng/ml	0,01 ng/ml
LPS 0111	1,841	1,418	0,948	0,624	0,172	0,032
LPS K12	1,806	1,749	1,598	1,182	0,532	0,290
	5,7 μ M	570 nM	171 nM	57 nM	17 nM	5,7 nM
PHAD™	1,982	1,716	1,674	1,588	0,630	0,348
MPLA-C	0,944	0,700	0,529	0,370	0,164	0,045

25 La Tabla 13 muestra los resultados de los controles negativos que indican que ninguno de los compuestos de ensayo (PHAD™ y MPLA-C) estimularon la línea celular original murina (hTLR).

Tabla 13

	100 ng/ml	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml
TNF- α	1,272	1,268	0,257	0,034	0,029	0,052
	5,7 μ M	570 nM	171 nM	57 nM	17 nM	5,7 nM
PHAD TM	-0,012	-0,032	-0,010	0,011	-0,011	-0,004
MPLA-C	-0,010	-0,007	-0,013	0,030	-0,006	0,041

La Tabla 14 muestra que MPLA-C activa la línea celular que expresa mTLR4.

Tabla 14

	10 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml	0,1 ng/ml	0,03 ng/ml	0,01 ng/ml
LPS 0111	3,810	3,474	2,632	1,440	0,747	0,255
LPS K12	3,695	3,275	2,387	1,395	0,463	0,168
	5,7 μ M	570 nM	171 nM	57 nM	17 nM	5,7 nM
PHAD TM	4,298	4,146	4,081	3,936	1,624	1,258
MPLA-C	3,438	3,348	3,182	3,023	2,705	1,787

5

La Tabla 15 muestra los resultados de los controles negativos que indican que ninguno de los compuestos de ensayo (PHADTM y MPLA-C) estimularon la línea celular original murina (mTLR).

Tabla 15

	100 ng/ml	30 ng/ml	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,3 ng/ml
TNF- α	4,061	3,663	0,393	0,024	0,045	0,027
	5,7 μ M	570 nM	171 nM	57 nM	17 nM	5,7 nM
PHAD TM	-0,019	-0,015	-0,019	-0,036	-0,013	0,000
MPLA-C	-0,035	-0,019	-0,035	-0,039	-0,011	-0,007

10 Los resultados muestran que los compuestos disacáridos sintéticos de la presente descripción son eficaces en la activación de TLR-4 humano y murino.

Ejemplo 3 - Los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos estimulan la proliferación de esplenocitos y células B de ratón y una viabilidad incrementada *in vitro*

15 En este ejemplo, se ensayó la capacidad de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción por su capacidad de estimular la proliferación y de incrementar la viabilidad de esplenocitos y células B de ratón *in vitro*. El compuesto lipídico disacárido sintético usado en este ensayo fue el compuesto de estructura V (denominado en la presente memoria MPLA-B). Como comparación, también se presentan los resultados mediante el uso del compuesto lipídico disacárido hexa-acilado conocido como PHADTM (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Se ha demostrado que PHADTM tiene propiedades inmunoestimuladoras.

20 Se proporcionaron PHADTM y MPLA-B en forma de polvo, y se solubilizaron en DMSO a 5 mg/ml, después se diluyeron con agua destilada apirógena estéril para una concentración de disolución de reserva de 500 μ g/ml. Estas disoluciones de reserva se diluyeron además en medios completos RPMI para hacer disoluciones de trabajo a 300 μ g/ml, 100 μ g/ml, y 30 μ g/ml, que se diluyeron después en el pocillo de cultivo celular adecuado a una dilución 1:100 para concentraciones de ensayo finales de 3, 1, y 0,3 μ g/ml; para la combinación de PHADTM y MPLA-B, las disoluciones de reserva de trabajo de 300 μ g/ml se diluyeron en el pocillo de cultivo celular adecuado a una dilución 1:200 para concentraciones de ensayo finales de 1,5 μ g/ml cada una. Como control de disolvente, se diluyó un 10% de DMSO (en agua destilada apirógena estéril) en medios completos RPMI para conseguir una concentración del 6% de DMSO,

que se diluyó después en el pocillo de cultivo celular adecuado a 1:100 para una concentración final del 0,06% de DMSO.

Se recogieron los bazos de 6 ratones C57BL/6 y cada bazo se disoció mecánicamente en una suspensión de células individuales con un colador de células de 70 μ m. Cada suspensión de células individuales de esplenocitos se diluyó después en medios completos (RPMI + 10% de FBS inactivado térmicamente, L-glutamina 2 mM, 100 U de penicilina/mL, 100 μ g de estreptomicina/mL y 2-mercaptoetanol 50 μ M), y se llevaron a cabo recuentos manuales de las células viables nucleadas (es decir, todas las células excepto los eritrocitos). Se usaron los esplenocitos de 3 ratones para el aislamiento de las células B como se describe a continuación.

Se aislaron las células B a partir de los esplenocitos de 3 ratones mediante el uso de un kit de enriquecimiento de células B de ratón EasySep™ (STEMCELL Technologies, Catálogo 19754A, Lote 11K41946) según las instrucciones del fabricante. Para determinar la pureza tras la separación de las células, se tiñeron las células con anticuerpos hacia CD45 (marcador hematopoyético; BD Bioscience, Catálogo 553080, Lote 49362) y CD19 (marcador de células B; eBioscience, Catálogo 1209382, Lote E01113-1620), y se analizaron mediante citometría de flujo (citómetro de flujo Accuri® C6) el porcentaje de CD45+/CD19+.

Para el análisis de la proliferación, se cultivaron esplenocitos y células B en presencia de PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, o el control de disolvente a 37 °C en un 5% de CO₂. Después de 48 horas, se midió la detección y la cuantificación de la proliferación celular mediante el uso de un ELISA de la proliferación celular, BrdU (Roche Diagnostics, Catálogo 11 647 229 001, Lote 13073200) según las instrucciones del fabricante, mediante la utilización de un lector de placas M5 SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Tras la incubación con BrdU, las placas celulares se centrifugaron para sedimentar las células (placa 1), y los sobrenadantes se transfirieron a una placa nueva (placa 2) que también se centrifugó para sedimentar las células flotantes restantes. Los sobrenadantes de la placa 2 se transfirieron después a una placa nueva y se congelaron a -20 °C. Las placas celulares 1 y 2 se usaron después en el ensayo de proliferación para determinar la cantidad de proliferación, tal como se indica mediante la absorbancia (DO) de cada pocillo. Los valores de DO de cada muestra se ajustaron respecto de la unión inespecífica restando los valores de DO de los pocillos de control. Los valores de DO de las placas 1 y 2 se sumaron después para proporcionar el índice de proliferación total para cada muestra. Para las muestras con valores ajustados de DO por debajo de 0,05 se asignaron a 0,05 en las FIGs. 2A y 2B.

Para el análisis de la viabilidad, se cultivaron esplenocitos y células B en presencia de PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, o el control de disolvente a 37 °C en un 5% de CO₂. Después de una incubación de 72 horas, las placas celulares se centrifugaron para sedimentar las células y los sobrenadantes se transfirieron a una placa nueva y se centrifugaron de nuevo para sedimentar las células flotantes restantes. Los sobrenadantes se transfirieron después a una placa nueva y se congelaron a -20 °C para la evaluación posterior de IgM/IgG (véase más adelante), mientras los sedimentos celulares de las dos placas se combinaron y se sometieron a una determinación de la viabilidad mediante el uso de un ensayo Cell-Titer Glo (Promega, Catálogo G7571/2/3, Lote 9218) según las instrucciones del fabricante.

Para los ensayos de la proliferación y la viabilidad celular, se sembraron las células en placas de cultivo de tejidos tratadas de 96 pocillos de fondo plano (Corning® Costar® 3595). Los esplenocitos se colocaron en las placas a una densidad de 1×10^5 células/pocillo para el ensayo de proliferación (2 pocillos/condición) y 1×10^6 células/pocillo para el ensayo de viabilidad (1 pocillo/condición); las células B se colocaron en placas a 1×10^5 células/pocillo para ambos ensayos (2 pocillos/condición). Cada pocillo contuvo un volumen final de 250 μ L. Los cultivos celulares se monitorizaron diariamente en busca de cambios en la morfología del cultivo o en los medios (p.ej., amarilleamiento de los medios).

Como se muestra en las FIGs. 1A y 1B, después de 48 horas de incubación, PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, estimularon la proliferación de los esplenocitos y las células B de ratón *in vitro*. Los esplenocitos y las células B se incubaron con PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, o disolvente como control para examinar la inducción de la proliferación celular. Después de una incubación de 48 horas, se midió la cuantificación de la proliferación celular mediante el uso de un inmunoensayo colorimétrico basado en la medida de la incorporación de BrdU en las células en proliferación. Las FIGs. 1A y 1B muestran la proliferación de los esplenocitos y las células B para cada condición de ensayo basándose en la incorporación de BrdU. Tanto PHAD™ como MPLA-B indujeron la proliferación de una manera dependiente de la dosis en los esplenocitos (FIG. 1A) y en las células B (FIG. 1B), con niveles de proliferación ligeramente mayores observados en los cultivos de células B. La combinación de PHAD™ y MPLA-B (1,5 μ g/ml de cada uno; total de 3 μ g/ml) indujo niveles similares de proliferación que PHAD™ (3 μ g/ml) y MPLA-B (3 μ g/ml).

Como se muestra en las FIGs. 2A y 2B, después de 72 horas la incubación con PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, no tuvo un impacto perjudicial sobre la viabilidad de los esplenocitos o las células B de ratón. De hecho, PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, incrementaron la viabilidad de los esplenocitos y las células B ensayadas. Los esplenocitos y las células B se incubaron con PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, o disolvente como control. Después de una incubación de 72 horas, se recogieron los sobrenadantes para la determinación de IgM/IgG (véase más adelante), y se determinó la viabilidad de las células restantes mediante el uso del ensayo Cell Titer Glo. La FIG. 2A y la FIG. 2B muestran la viabilidad de los esplenocitos y las células B,

respectivamente, para cada condición de ensayo. Los esplenocitos tratados con PHAD™ y MPLA-B solos mostraron niveles incrementados similares de viabilidad en comparación con el control de disolvente; los cultivos tratados con la combinación de PHAD™ y MPLA-B (1,5 µg/ml de cada uno; total de 3 µg/ml) indujeron niveles similares de viabilidad que PHAD™ (3 µg/ml) y MPLA-B (3 µg/ml) (FIG. 2A). En contraste, los cultivos de células B tratadas con PHAD™ y

5 MPLA-B mostraron un incremento dependiente de la dosis en la viabilidad en comparación con el control de disolvente; los cultivos tratados con la combinación de PHAD™ y MPLA-B (1,5 µg/ml de cada uno; total de 3 µg/ml) mostraron niveles similares de viabilidad que PHAD™ (3 µg/ml) y MPLA-B (3 µg/ml) (FIG. 2B).

Ejemplo 4 - Los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos estimulan la secreción de IgM e IgG de esplenocitos y células B de ratón *in vitro*

10 En este ejemplo, se ensayó la capacidad de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción por su capacidad de estimular la secreción de IgM e IgG de esplenocitos y células B de ratón *in vitro*. El compuesto lipídico disacárido sintético usado en este ensayo fue el compuesto de estructura V (denominado en la presente memoria MPLA-B). Como comparación, también se presentan los resultados mediante el uso del compuesto lipídico disacárido hexa-acilado conocido como PHAD™ (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Se ha demostrado que PHAD™

15 tiene propiedades inmunoestimuladoras.

Los materiales y las condiciones para los cultivos de esplenocitos y células B son como se describieron en el Ejemplo 3. Los esplenocitos se colocaron en placas a una densidad de 1×10^6 células/pocillo (1 pocillo/condición) y las células B se colocaron en placas a 1×10^5 células/pocillo (2 pocillos/condición).

20 Para la determinación de la secreción de IgM e IgG, se cultivaron esplenocitos y células B en presencia de PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, o el control de disolvente a 37 °C en un 5% de CO₂. Después de una incubación de 72 horas, las placas celulares se centrifugaron para sedimentar las células y los sobrenadantes se transfirieron a una placa nueva y se centrifugaron de nuevo para sedimentar las células flotantes restantes. Los sobrenadantes se transfirieron después a una placa nueva y se congelaron a -20 °C. Se llevaron a cabo ELISAs para

25 IgM (equipo de cuantificación mediante ELISA de IgM de ratón, Bethyl Laboratories, Catálogo E90-101, Lote E90-101-25) e IgG (equipo de cuantificación mediante ELISA de IgG de ratón, Bethyl Laboratories, Catálogo E90-131, Lote E90-131-29) según las instrucciones del fabricante. Todas las muestras de los sobrenadantes se diluyeron antes del ELISA a 1:2, 1:10, y 1:50. Para la determinación de las concentraciones de inmunoglobulinas, solamente aquellas muestras con valores de DO que se hallaron en el intervalo del 90-10% de la DO media de la concentración más alta de la curva patrón se consideraron como aceptables y se usaron para determinar las concentraciones de inmunoglobulinas, mientras el valor del 10% se consideró como el límite de cuantificación (LOQ) del ensayo. Para cada condición de ensayo, se realizó la media de todos los puntos de datos aceptables, y se determinó la desviación estándar, cuando fue posible. Si no se pudieron determinar los valores de la concentración, los valores de la concentración se informan como menores del valor de la concentración correspondiente al LOQ multiplicado por la dilución más baja usada en el ensayo. Para los cálculos y la presentación en los gráficos, se usó el LOQ multiplicado por la dilución más baja.

30 Los esplenocitos y las células B se incubaron durante 72 horas con PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, o el control de disolvente para examinar los efectos sobre la secreción de IgM. Después de 72 horas de incubación, los sobrenadantes se recogieron para la determinación de IgM. Los niveles de IgM, tal como se cuantificaron mediante ELISA, se muestran en las FIGs. 3A y 3B para los esplenocitos y las células B, respectivamente.

35 40 En general, PHAD™ y MPLA-B indujeron ambos una producción de IgM de una manera dependiente de la dosis en los esplenocitos (FIG. 3A) y en las células B (FIG. 3B), y los niveles de IgM totales mayores se observaron en los cultivos de esplenocitos. La combinación de PHAD™ y MPLA-B (1,5 µg/ml de cada uno; total de 3 µg/ml) indujo niveles similares de IgM que PHAD™ (3 µg/ml) y MPLA-B (3 µg/ml).

45 Los esplenocitos y las células B se incubaron durante 72 horas con PHAD™ y MPLA-B, tanto solos como en combinación, o el control de disolvente para examinar los efectos sobre la secreción de IgG. Después de 72 horas de incubación, los sobrenadantes se recogieron para la determinación de IgG. Los niveles de IgG, tal como se cuantificaron mediante ELISA, se muestran en las FIGs. 4A y 4B para los esplenocitos y las células B, respectivamente. En los esplenocitos, PHAD™ y MPLA-B indujeron en general niveles similares de IgG a todas las concentraciones en los ratones 2 y 3, y la combinación de PHAD™ y MPLA-B mostró los niveles de IgG más altos, mientras se indujo IgG de una manera dependiente de la dosis en el ratón 1 (FIG. 4A). En las células B, IgG se observó en general en los 3 ratones a niveles detectables solamente a las concentraciones más altas de PHAD™ y MPLA-B (3 µg/ml) (FIG. 4B).

Ejemplo 5 - Los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos estimulan la producción de IL-12 *in vitro*

55 En este ejemplo, se ensayó la capacidad de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción con respecto a su capacidad de estimular la producción de interleucina (IL)-12 a partir de células J774A (monocitos/macrófagos murinos derivados de un tumor en un ratón BALB/c hembra) *in vitro*. IL-12 es un modulador inmunitario importante, ya que su producción durante las infecciones microbianas regula las respuestas innatas y determina el tipo y la duración de la respuesta inmunitaria adaptativa. IL-12 induce la producción de interferón-γ (IFN-γ) por las células citotóxicas naturales, las células T, las células dendríticas, y los macrófagos. IL-12 también estimula la diferenciación de las células T CD4⁺ indiferenciadas hasta células T auxiliares 1 (Th1), lo que a su vez produce IFN-

y y ayuda en la inmunidad mediada por células. Por tanto, IL-12 desempeña un papel central en la coordinación de la inmunidad innata y adaptativa, y su producción es un marcador para las propiedades inmunoestimuladoras de un compuesto.

5 El compuesto lipídico disacárido sintético usado en este ensayo fue el compuesto de estructura V (denominado en la presente memoria MPLA-B). Como comparación, también se presentan los resultados mediante el uso del compuesto lipídico disacárido hexa-acilado conocido como PHADTM (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Se ha demostrado que PHADTM tiene propiedades inmunoestimuladoras.

10 Las células J774A se colocaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 10⁵ células/pocillo y se cultivaron durante 48 horas en DMEM con un 10% de FBS en condiciones habituales de cultivo celular. Las células se privaron de suero durante 18 h en un medio que contuvo DMEM + 0,5% de FBS. Se diluyeron en serie PHADTM y MPLA-B, disueltos en DMSO, y se añadieron a las células privadas de suero (10 µL a 1 mL de medio) y se incubaron 24 horas adicionales. Los pocillos de control recibieron vehículo de DMSO solamente. Despues se recogieron los medios de las células y se centrifugaron a 16.900 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y se congelaron a -80 °C hasta el análisis. Se determinó la IL-12 de ratón (p40) con un kit Quantikine ELISA inespecífico de alelo de p40 de IL-12 de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN; nº de catálogo MP 400).

15 Los resultados se presentan en la FIG. 5. Como se puede observar, tanto MPLA-B como PHADTM estimularon la producción de IL-12 a partir de células J774A a concentraciones similares. La estimulación máxima se observó en el intervalo de 1-10 µg/ml.

Ejemplo 6 - Los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos estimulan una respuesta inmunitaria *in vivo*

20 En este ejemplo, se ensayó la capacidad de los compuestos lipídicos disacáridos sintéticos de la presente descripción respecto de su capacidad de estimular una respuesta inmunitaria *in vivo* en un modelo de ratón. Los ratones C57BL/6 hembra recibieron un total de tres inyecciones subcutáneas de 0,2 ml (en el día 0, día 14 y día 28) de un compuesto disacárido sintético ejemplar de la presente descripción (el compuesto mostrado que tiene la estructura general V, también denominado MPLA-B o congénere B), el compuesto lipídico disacárido hexa-acilado conocido como PHADTM (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) o una combinación de los anteriores. Se ha demostrado que PHADTM tiene propiedades inmunoestimuladoras. Se usó un antígeno patentado (Pal1-15) en combinación con una formulación de vacuna liposómica patentada (AC Immune, Lausana, Suiza) en la preparación de vacuna, y para la inducción de una respuesta de anticuerpos específicos de amiloide-beta (Aβ). La preparación de vacuna se describe en el número de publicación PCT WO2007/068411, titulado Vacuna Terapéutica. En los días 7, 21 y 35, se recogieron muestras de sangre y se determinó la respuesta de anticuerpos específicos de Aβ totales mediante ELISA. Se ensayaron tres diluciones de vacuna diferentes. Los datos del protocolo de administración de la vacuna son como se muestran en la Tabla 10. Se hicieron las diluciones indicadas en solución salina tamponada con fosfato.

Tabla 10

Grupo	Ratones por grupo	Lote y volumen ^a	Vía de Administración ^b	Pal1-15 (µg/dosis) ^c	Cantidad de PHAD (µg/dosis) ^c	Cantidad de MPLA-B (µg/dosis) ^c
A	5	0,2 ml (vacuna sin diluir)	s.c.	98,2	9,4	-
B	5	0,2 ml (vacuna sin diluir)	s.c.	91,6	-	12,4
C	5	0,2 ml (vacuna diluida 10x)	s.c.	9,82	0,94	-
D	5	0,2 ml (vacuna diluida 10x)	s.c.	9,16	-	1,24
E	5	0,2 ml (vacuna diluida 100x)	s.c.	0,98	0,09	-
F	5	0,2 ml (vacuna diluida 100x)	s.c.	0,92	-	0,12
G	5	0,2 ml (vacuna sin diluir) Lote de Referencia	s.c.	84	9,6	7
H	10	0,2 ml (vacuna sin diluir)	s.c.	94,6	5,6	4,8

^a Volumen teórico/dosis

35 ^b Subcutáneo

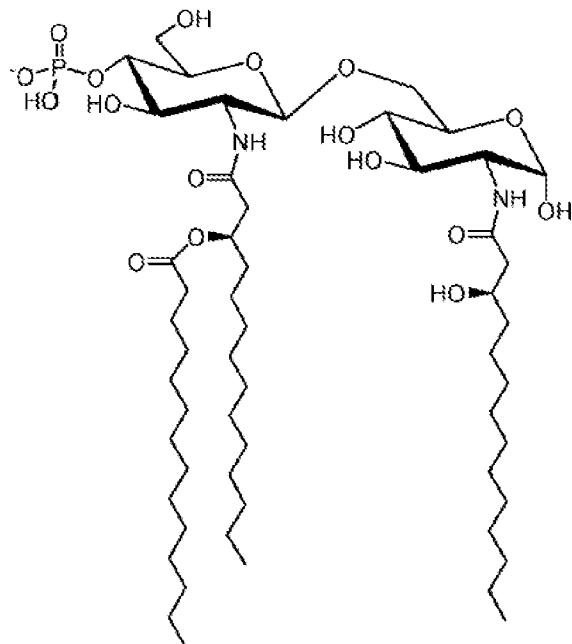
^c Cantidad medida determinada tras el análisis

Como se muestra en la FIG. 6, todas las preparaciones de vacuna indujeron una respuesta elevada de anticuerpos IgG anti-Aβ similar al lote de referencia (el eje y muestra la concentración de anticuerpo en ng/ml). No hubo diferencia

en el nivel de IgG anti-A_β entre las dos vacunas preparadas con PHADTM o MPLA-B en cualquier punto temporal (ANOVA bidireccional, post-test de Bonferroni: P>0,05). También se ensayaron las vacunas diluidas (véase la Tabla 10). El nivel de IgG anti-A_β siguió siendo elevado y similar a las vacunas sin diluir. Sin embargo, se observó un efecto de refuerzo en el día 35 con un incremento significativo de los títulos de anticuerpo en el día 35 para las vacunas con las diluciones 10x y 100x en comparación con las vacunas sin diluir (ANOVA bidireccional, post-test de Bonferroni: P<0,05 para las vacunas diluidas que contenían PHADTM; P<0,001 para las vacunas diluidas que contenían MPLA-B). A una dosis igual (0,1 µg, 1 µg o 10 µg de PHADTM o MPLA-B por inyección), no se halló una diferencia significativa entre PHADTM y MPLA-B, lo que demostró la inmunogenicidad equivalente de las vacunas anti-A_β preparadas con PHADTM o MPLA-B. La combinación de PHADTM y MPLA-B también fue eficaz. Los resultados se expresan como la media + desviación estándar obtenida en grupos de 5 o 10 ratones.

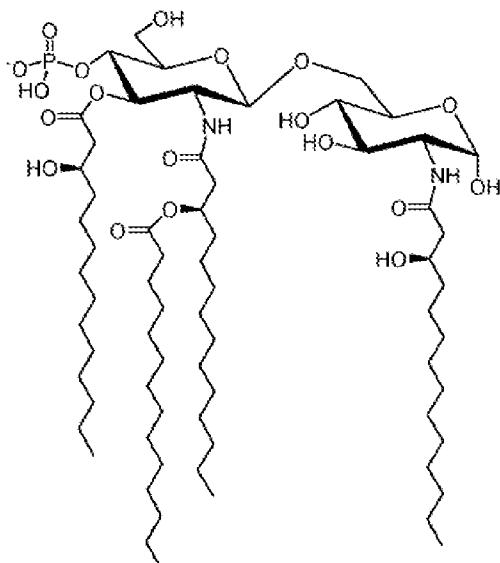
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto lipídico disacárido sintético que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

- 5 o que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto lipídico disacárido sintético de la reivindicación 1, en donde el compuesto lipídico disacárido sintético tiene una actividad estimuladora del receptor de tipo Toll 4.

- 10 3. El compuesto lipídico disacárido sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el compuesto lipídico disacárido sintético tiene una pureza de al menos un 99%, tal como se mide basándose en el peso.

4. Una composición farmacéutica que comprende:

- a. un vehículo farmacéuticamente aceptable;

- b. un antígeno opcional; y
 - c. un compuesto lipídico disacárido sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en donde la composición comprende además un segundo adyuvante.
- 5 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el segundo adyuvante es un disacárido hexaacilado mono-fosforilado.
7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende el antígeno.
8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es un liposoma.
- 10 9. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde la composición es una composición de vacuna.

FIG. 1A

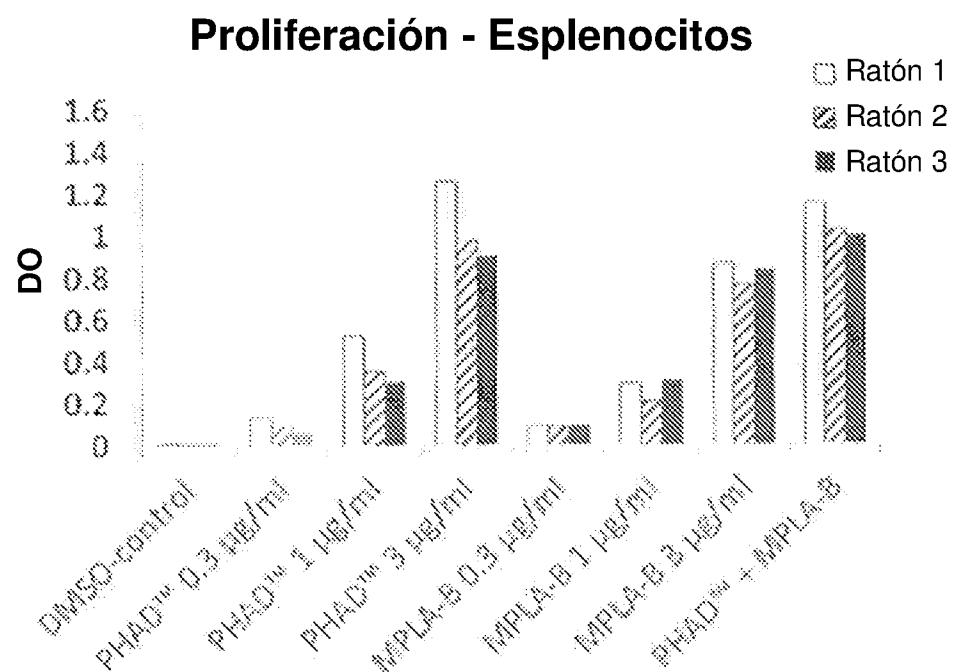


FIG. 1B

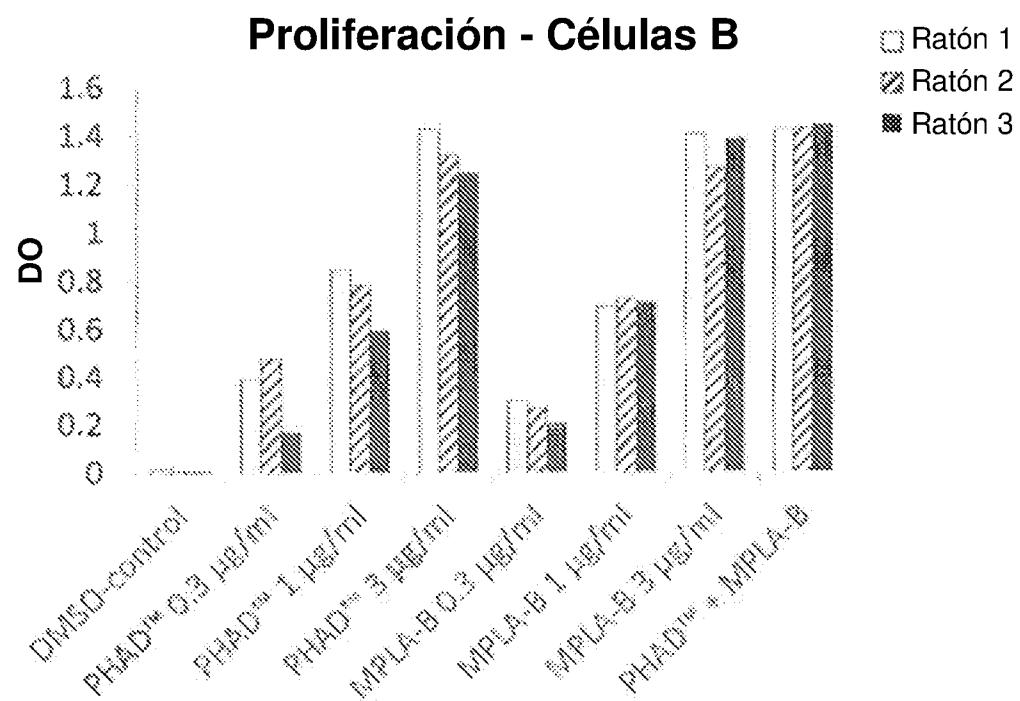


FIG. 2A

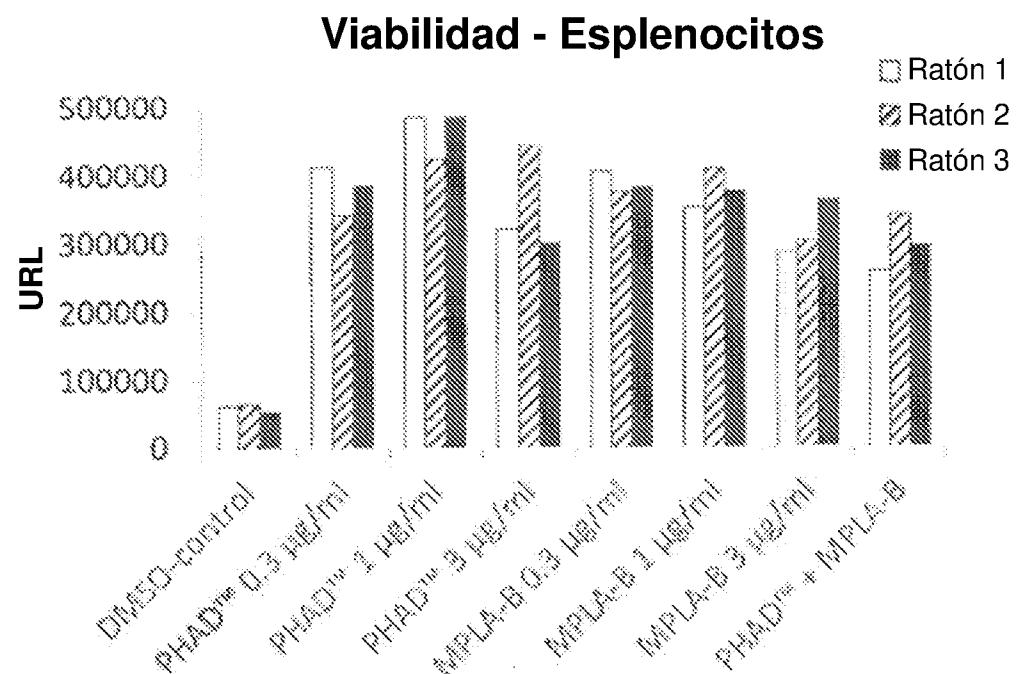


FIG. 2B

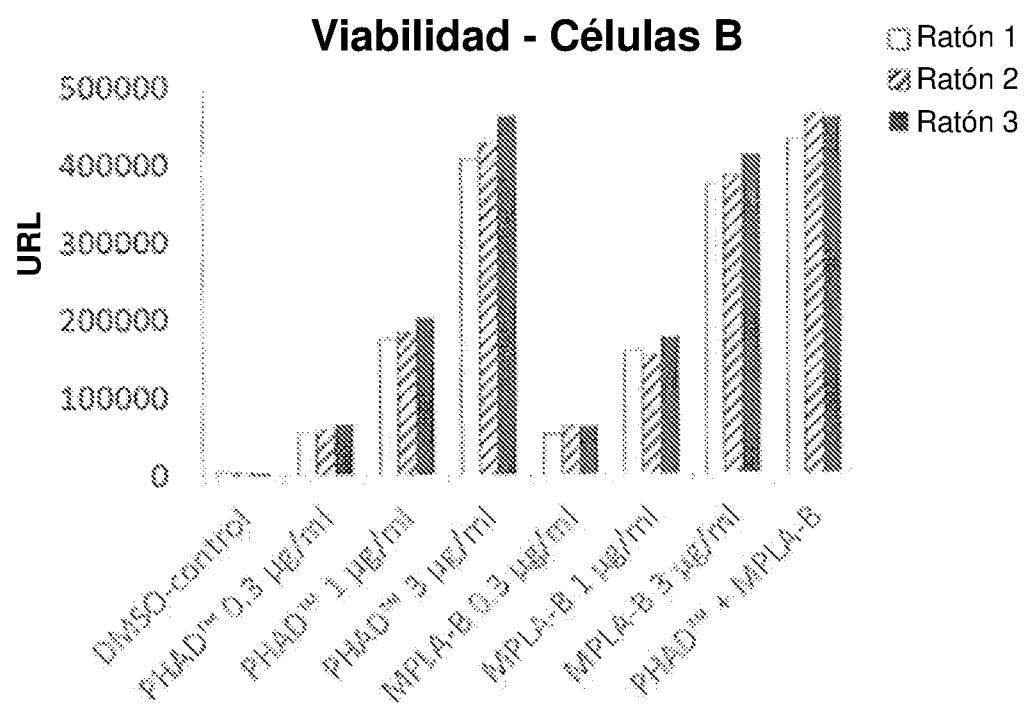


FIG. 3A

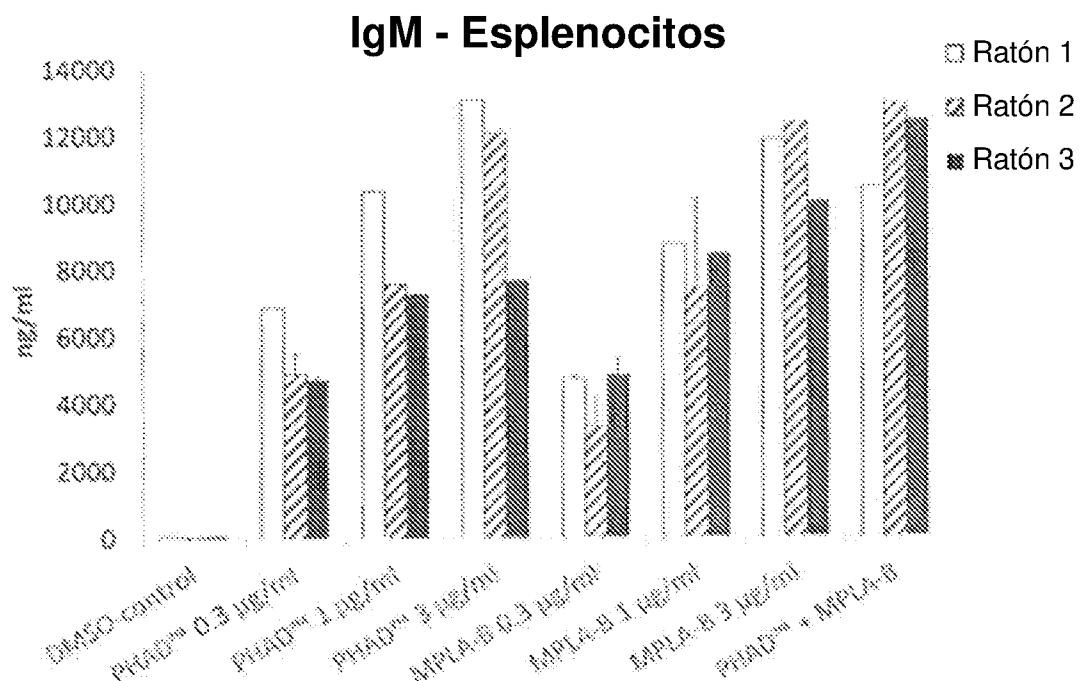


FIG. 3B

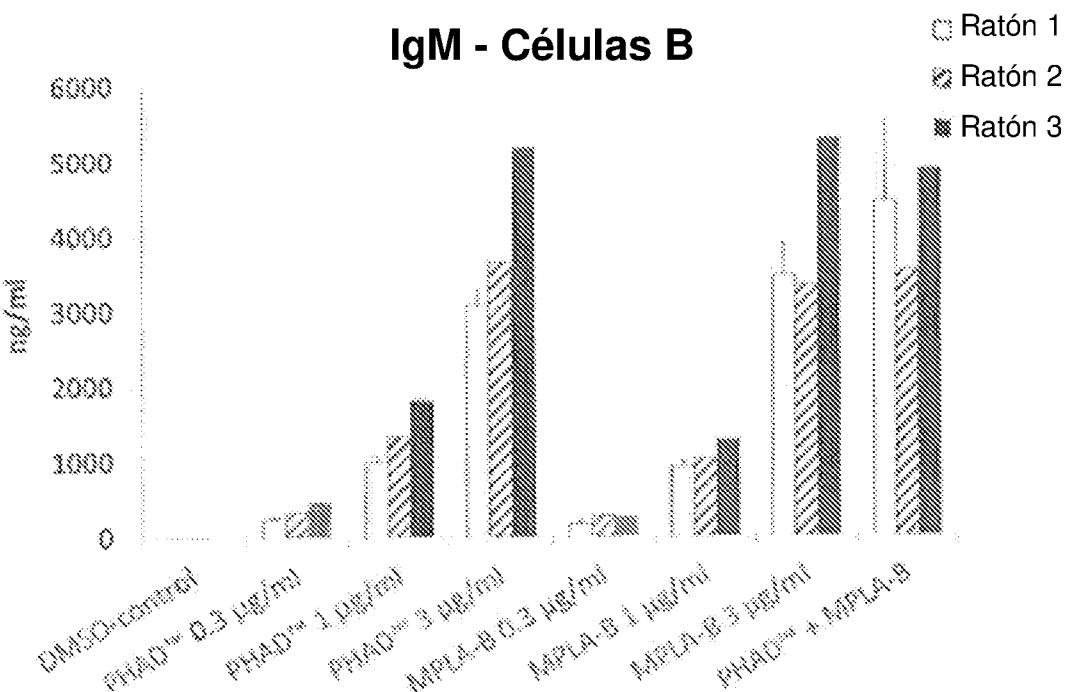


FIG. 4A

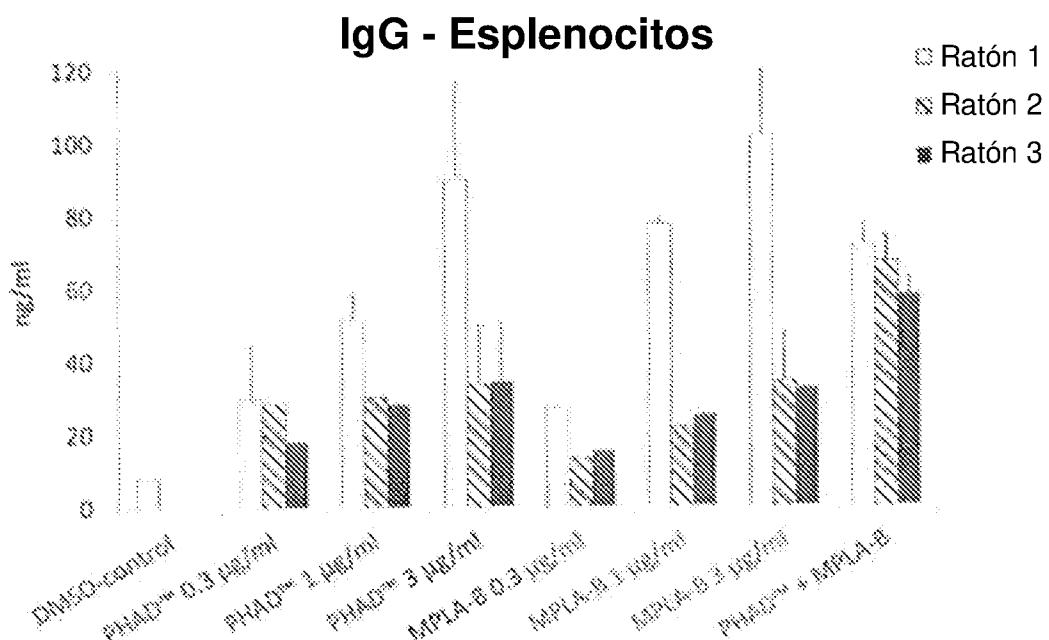


FIG. 4B

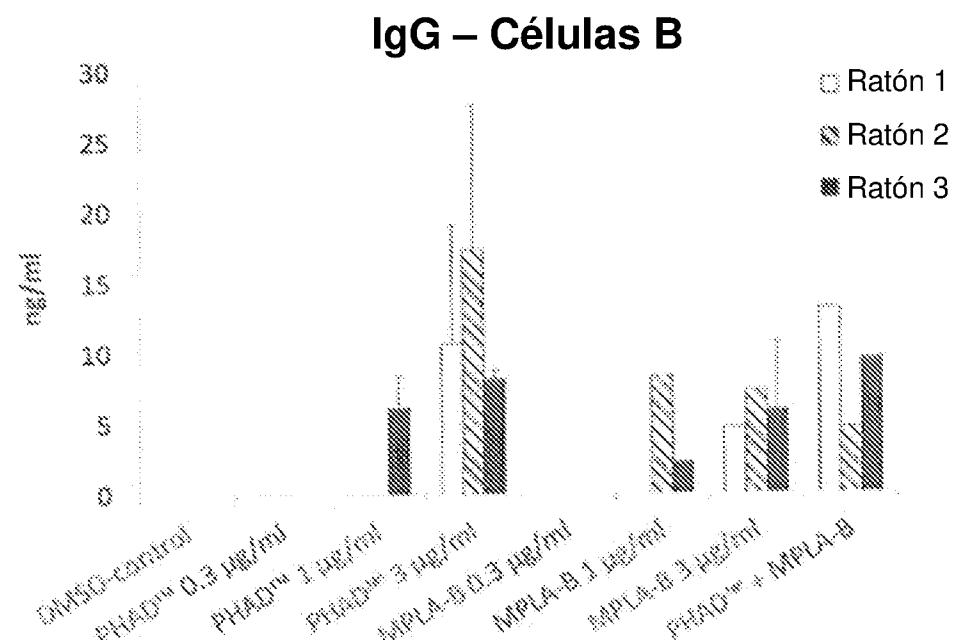


FIG. 5

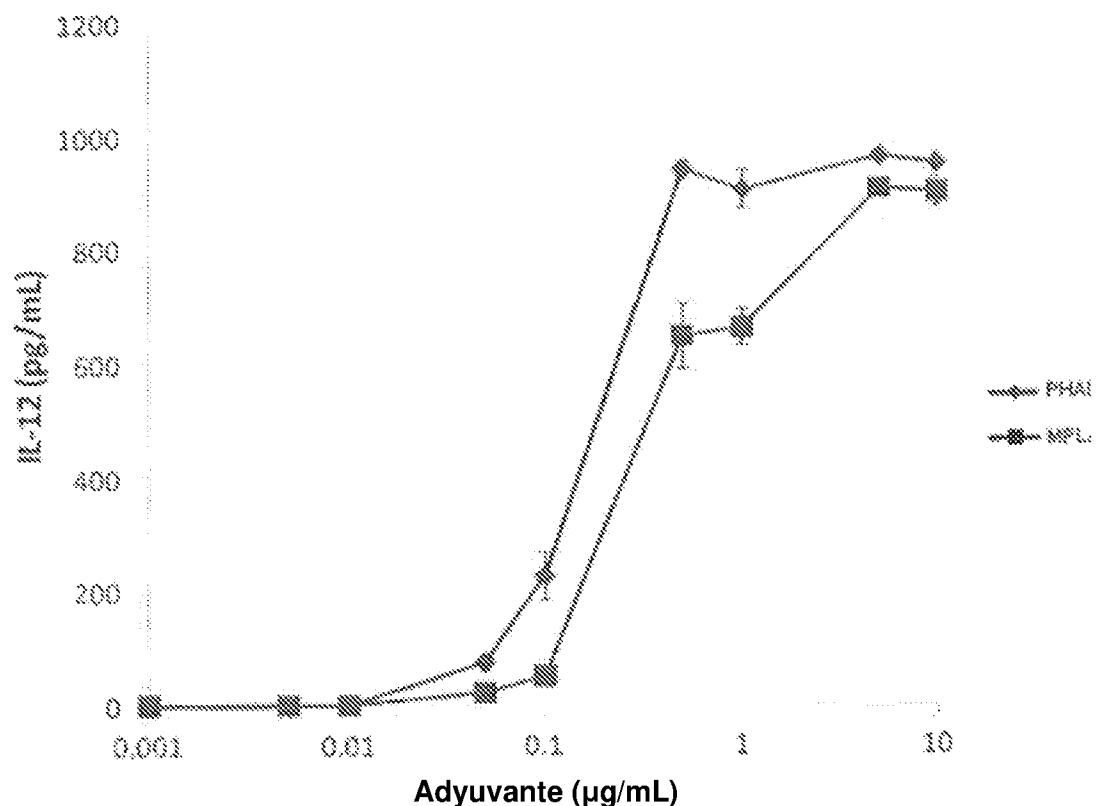


FIG. 6

Títulos de IgG anti- $\text{A}\beta$

