(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 18 207 T2** 2006.11.09

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 311 522 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 18 207.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/24284**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 959 445.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/012258**
(86) PCT-Anmeldetag: **03.08.2001**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.02.2002**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.05.2003**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **22.03.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.11.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C07H 15/04*** (2006.01)
A61K 31/7052 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
223056 P **04.08.2000** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:
Corixa Corp., Seattle, Wash., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:
JOHNSON, A., David, Hamilton, MT 59840, US; BALDRIDGE, Jory, Victor, MT 59875, US; SOWELL, C. Gregory, Mulkiteo, WA 98275, US

(54) Bezeichnung: **NEUE IMMUNOEFFECTORVERBINDUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung betrifft im Allgemeinen Immuneffektorverbindungen, ihre Verwendung in pharmazeutischen Zusammensetzungen und Verfahren für ihre Herstellung und ihre Verwendung im Rahmen einer prophylaktischen und/oder therapeutischen Impfung. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Adjuvanssystem, das 2-Desoxy-2-amino-β-D-glucopyranose (Glucosamin), glykosidisch an eine zyklische Aminoalkyl-(Aglykon-) Gruppe gebunden, umfasst.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Humorale Immunität und zellvermittelte Immunität sind die zwei Hauptlinien der Immunantwort bei Säugetieren. Humorale Immunität umfasst die Bildung von Antikörpern gegen Fremdantigene. Antikörper werden von B-Lymphozyten produziert. Zellvermittelte Immunität umfasst die Aktivierung von T-Lymphozyten, die entweder auf infizierte Zellen, die Fremdantigene in sich tragen, Wirkung zeigen oder andere Zellen stimulieren, sodass diese auf infizierte Zellen Einfluss nehmen. Beide Linien des Säugetier-Immunsystems sind zur Krankheitsbekämpfung wichtig. Humorale Immunität ist die Hauptverteidigungslinie gegen bakterielle Pathogene. Im Fall von Viruserkrankungen scheint die Induktion zytotoxischer Lymphozyten (CTLs) für schützende Immunität maßgeblich zu sein. Somit stimuliert eine wirksame Vakzine vorzugsweise beide Linien des Immunsystems, um gegen Erkrankungen zu schützen.

[0003] Vakzinen bieten einem Wirt Fremdantigene aus Erkrankungs-auslösenden Agenzien dar, sodass der Wirt eine schützende Immunantwort entwickeln kann. Häufig sind Vakzinen-Antigene abgetötete oder abgeschwächte Formen der Mikroben, die die Erkrankung auslösen. Die Gegenwart von nicht maßgeblichen Komponenten und Antigenen in diesen abgetöteten oder abgeschwächten Vakzinen motivierte zu beträchtlichen Bemühungen, Vakzinenkomponenten zu verfeinern, einschließlich der Entwicklung gut definierter, synthetischer Antigene unter Verwendung von chemischen Verfahren und Rekombinationsverfahren. Die Verfeinerung und Vereinfachung von Mikrobenvakzinen führte jedoch zu einem gleichzeitigen Verlust des Potenzials.

[0004] Niedermolekulare synthetische Antigene, auch wenn sie frei von potenziell schädlichen Verunreinigungen sind, sind an sich häufig nicht ausreichend immunogen. Diese Beobachtungen führten die Forscher dazu, Immunsystemstimulatoren, die als Adjuvanzien bekannt sind, zu Vakzinenzusammensetzungen zuzusetzen, um die Aktivität der Vakzinenkomponenten zu potenzieren.

[0005] Immunadjuvanzien sind Verbindungen, die, wenn sie einem Individuum verabreicht werden oder in vitro getestet werden, die Immunantwort auf ein Antigen in einem Individuum, dem das Antigen verabreicht wurde, steigern oder bestimmte Aktivitäten von Zellen für das Immunsystem fördern. Zahlreiche Verbindungen, die verschiedene Grade an Adjuvansaktivität aufweisen, wurden bereits hergestellt und getestet (siehe beispielsweise Shimizu et al. (1985), Bulusu et al. (1992), Ikeda et al. (1993), Shimizu et al. (1994), Shimizu et al. (1995), Miyajima et al. (1996)). Diese und andere frühere Adjuvanssysteme weisen jedoch häufig toxische Eigenschaften auf, sind instabil und/oder zeigen inakzeptabel geringe immunstimulierende Wirkung.

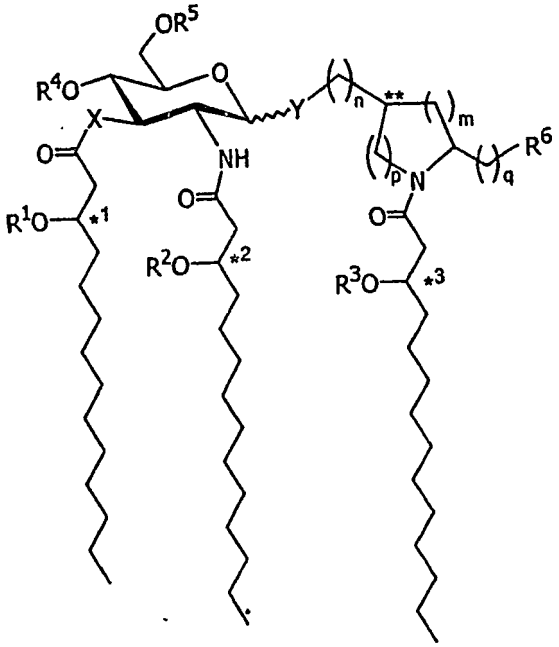
[0006] Zur Zeit ist das einzige Adjuvans, das in den Vereinigten Staaten zur Verwendung bei Menschen zugelassen ist, Alaun, eine Gruppe von Aluminiumsalzen (z.B. Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat), in denen Vakzinen-Antigene formuliert werden. Partikelträger wie Alaun fördern laut Studien die Aufnahme, Verarbeitung und Präsentation von löslichen Antigenen durch Makrophagen. Alaun ist jedoch nicht frei von Nebenwirkungen und ist leider ausschließlich auf humorale (Antikörper-) Immunität eingeschränkt.

[0007] Die WO 98/50399 und Johnson et al. (Bioorg. Med. Chem. Let. 9, 2273–2278 (1999)) offenbaren Aminoalkylglucosaminphosphat als Vakzinenadjuvanzien.

[0008] Die Entdeckung und Entwicklung von wirksamen Adjuvanssystemen ist für die Verbesserung der Wirksamkeit und Sicherheit bestehender und zukünftiger Vakzinen wesentlich. Somit besteht permanent Bedarf an neuen und verbesserten Adjuvanssystemen, insbesondere jenen, die beide Effektorlinien des Immunsystems steuern, um die Entwicklung einer nächsten Generation synthetischer Vakzinen besser zu unterstützen. Die vorliegende Erfindung erfüllt diesen Bedarf und wird auch anderen Anforderungen gerecht.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

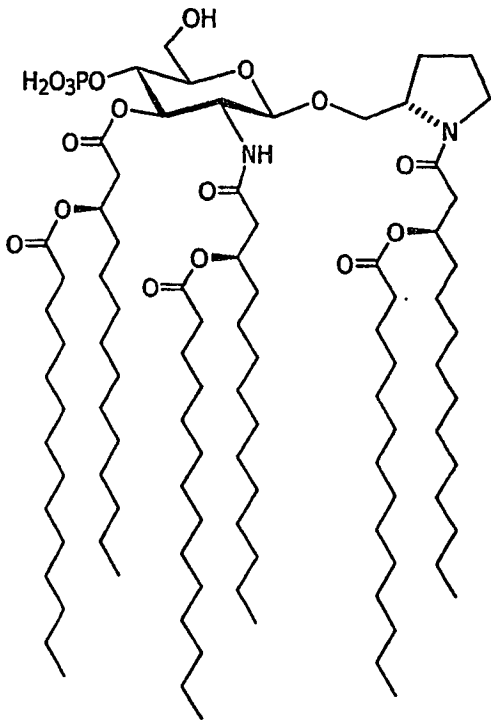
[0009] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind Immuneffektormoleküle, die humorale und zellvermittelte Immunantworten auf Vakzinen-Antigene steigern. Die Verbindungen umfassen eine 2-Desoxy-2-amino-β-D-glucopyranose (Glucosamin), die glykosidisch an eine zyklische Aminoalkyl- (Aglykon-) Gruppe gebunden ist. Die Verbindungen sind an der 4- oder 6-Position des Glucosaminrings phosphoryliert und mit Alkanoyloxytetradecanoylresten am Aglykonstickstoff und der 2- und der 3-Position des Glucosaminrings acyliert. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung werden im Allgemeinen durch Formel (I) beschrieben:



(I)

und umfassen auch pharmazeutisch annehmbare Salze davon, worin X -O- oder -NH- ist und Y -O- oder -S- ist; R^1, R^2 und R^3 unabhängig voneinander eine (C_2-C_{24})-Acylgruppe, einschließlich gesättigter, ungesättigter und verzweigter Acylgruppen, sind; R^4 -H- oder $-PO_3R^7R^8$ ist, worin R^7 und R^8 unabhängig voneinander H oder (C_1-C_4)-Alkyl sind; R^5 -H, $-CH_3$ oder $-PO_3R^9R^{10}$ ist, worin R^9 und R^{10} unabhängig voneinander aus -H und (C_1-C_4)-Alkyl ausgewählt sind; die R^6 unabhängig voneinander aus H, OH, (C_1-C_4)-Alkoxy, $-PO_3R^{11}R^{12}$, $-OPO_3R^{11}R^{12}$, $-SO_3R^{11}$, $-OSO_3R^{11}$, $NR^{11}R^{12}$, $-SR^{11}$, -CN, $-NO_2$, -CHO, CO_2R^{11} und $-CONR^{11}R^{12}$ ausgewählt ist, worin R^{11} und R^{12} unabhängig voneinander aus H und (C_1-C_4)-Alkyl ausgewählt sind; mit der Maßgabe, dass, wenn R^4 $-PO_3R^7R^8$ ist, R^5 nicht $-PO_3R^9R^{10}$ ist, worin "*1–3" und "**" für Chiralitätszentren stehen; worin die Indices n, m, p und q unabhängig voneinander ganze Zahlen von 0 bis 6 sind, mit der Maßgabe, dass die Summe p + m = 0 bis 6 ist.

[0010] In manchen Ausführungsformen enthalten die Verbindungen der vorliegenden Erfindung ein -O- an X und Y, ist R^4 $-PO_3R^7R^8$, sind R^5 und R^6 H und sind die Indices n, m, p und q ganze Zahlen von 0 bis 3. In einer bevorzugteren Ausführungsform sind R^7 und R^8 -H. In noch einer bevorzugteren Ausführungsform ist Index n = 1, Index m = 2 und sind die Indices p und q = 0. In noch einer bevorzugteren Ausführungsform sind R_1, R_2 und R_3 Tetradecanoylreste. In wiederum einer noch bevorzugteren Ausführungsform liegen $*^1$, $*^2$ und $*^3$ in R-Konfiguration vor, liegt Y in äquatorialer Stellung vor und liegt ** in S-Konfiguration vor (N-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoyl](S)-2-pyrrolid
inomethyl-2-desoxy-4-O-phosphono-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]-3-O-[(R)-3-tetradecanoyl
oxytetradecanoyl]-β-D-glucopyranosid und pharmazeutisch annehmbare Salze davon; RC-553; Formel II).



(II)

[0011] Die vorliegende Erfindung stellt auch Verbindungen bereit, die als pharmazeutische Zusammensetzungen verwendet werden können, die Verbindungen der oben gezeigten allgemeinen Formel enthalten. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können mit zahlreichen verschiedenen Antigenen und in zahlreichen verschiedenen Formulierungen, die Fachleuten bekannt sind, kombiniert werden.

[0012] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind auch in Verfahren zur Induktion einer Immunantwort in einem Individuum nützlich. Das Verfahren umfasst das Verabreichen einer Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge eines pharmazeutisch annehmbaren Träger und einer Verbindung der vorliegenden Erfindung enthält.

[0013] Die vorliegende Erfindung umfasst auch Verfahren zur Behandlung eines Säugetiers, das an einer pathogenen Infektion, an Krebs oder einer Autoimmunerkrankung leidet oder für solch eine Erkrankung oder ein Leiden empfänglich ist. Das Verfahren umfasst das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die einen pharmazeutisch annehmbaren Träger und eine Verbindung der vorliegenden Erfindung enthält, an das Säugetier.

[0014] Weiters umfasst die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Krankheiten oder Leiden, die durch Stickstoffperoxidproduktion in einem Individuum gelindert werden können. Das Verfahren umfasst das Kontaktieren des Individuums mit einer wirksamen Menge einer Verbindung der vorliegenden Erfindung. In manchen Ausführungsformen können die Verbindungen der vorliegenden Erfindung 48 Stunden vor dem bis zum Einsetzen von Ischämie verabreicht werden.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Definitionen

[0015] Die Bezeichnung "Acyl" bezieht sich auf jene Gruppen, die aus einer organischen Säure durch Entfernen des Hydroxylteils der Säure stammen. Folglich umfasst Acyl beispielsweise Acetyl, Propionyl, Butyryl, Decanoyl, Pivaloyl, Benzoyl und dergleichen.

[0016] Ein "(C_2-C_{24})-Acyl" ist eine Acylgruppe mit 2 bis 24 Kohlenstoffatomen.

[0017] Die Bezeichnung "Alkyl" alleine oder als Teil eines anderen Substituenten bezieht sich, außer es wird anders festgelegt, auf eine unverzweigte oder verzweigte Kette oder einen zyklischen Kohlenwasserstoffrest oder eine Kombination davon, die/der vollständig gesättigt, ein- oder mehrfach ungesättigt sein kann und zwei-

oder mehrwertige Reste umfassen kann, wobei die Anzahl der Kohlenstoffatome angegeben wird (d.h. C_1-C_{10} bedeutet ein bis zehn Kohlenstoffatome). Beispiele für gesättigte Kohlenwasserstoffreste umfassen Gruppen wie Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, t-Butyl, Isobutyl, sec-Butyl, Cyclohexyl, (Cyclohexyl)ethyl, Cyclopropylmethyl, Homologe und Isomere von beispielsweise n-Pentyl, n-Hexyl, n-Heptyl, n-Octyl und dergleichen. Eine ungesättigte Alkylgruppe ist eine, die eine oder mehrere Doppelbindungen oder Dreifachbindungen aufweist. Beispiele für ungesättigte Alkylgruppen umfassen Vinyl, 2-Propenyl, Crotyl, 2-Isopentenyl, 2-(Butadienyl), 2,4-Pentadienyl, 3-(1,4-Pentadienyl), Ethinyl, 1- und 3-Propinyl, 3-Butinyl und die höheren Homologen und Isomere. Alkylgruppen, die auf Kohlenwasserstoffgruppen beschränkt sind, werden als "Homoalkyl" bezeichnet.

[0018] Ein "(C_1-C_4)-Alkyl" ist eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen.

[0019] Die Bezeichnung "Alkylen" alleine oder als Teil eines anderen Substituenten bezieht sich auf einen zweiwertigen Rest, der von einem Alkan herrührt, beispielsweise -$CH_2CH_2CH_2CH_2$-, und umfasst weiters jene Gruppen, die als "Heteroalkylene" bekannt sind.

[0020] Die Bezeichnungen "Alkoxy", "Alkylamino" und "Alkylthio" beziehen sich auf jene Gruppen, die eine über ein Sauerstoff-, Stickstoff- bzw. Schwefelatom an den Rest des Moleküls gebundene Alkylgruppe aufweisen.

[0021] Die Bezeichnung "(C_1-C_4)-Alkoxy" bezieht sich auf eine Alkoxygruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen.

[0022] Jede der oben genannten Bezeichnungen (z.B. "Alkyl", "Acyl") umfasst sowohl substituierte als auch unsubstituierte Formen des angegebenen Rests. Bevorzugte Substituenten für jeden Typ von Rest werden nachstehend genannt.

[0023] Substituenten für die Alkyl- und Acylreste können aus zahlreichen verschiedenen Gruppen, ausgewählt aus: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -Halogen, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO_2R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''$C(O)_2$R', -NH-$C(NH_2)$=NH, -NR'$C(NH_2)$=NH, -NH-$C(NH_2)$=NR', -S(O)R', -$S(O)_2$R', -$S(O)_2$NR'R'', -CN und -NO_2 in einer Anzahl im Bereich von 0 bis (2m' + 1), worin m' für die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen in solch einem Rest steht, ausgewählt werden. R', R'' und R''' beziehen sich unabhängig voneinander auf Wasserstoff und unsubstituiertes (C_1-C_8)-Alkyl. Sind R' und R'' an dasselbe Stickstoffatom gebunden, so können sie zusammen mit dem Stickstoffatom einen 5-, 6- oder 7-gliedrigen Ring bilden. Beispielsweise soll -NR'R'' 1-Pyrrolidinyl und 4-Morpholinylumfassen. Aus der obigen Erläuterung der Substituenten wird es Fachleuten ersichtlich sein, dass die Bezeichnung "Alkyl" auch Gruppen wie Halogenalkyl (z.B. -CF_3 und -CH_2CF_3) und dergleichen umfassen soll.

[0024] Die Bezeichnung "pharmazeutisch annehmbare Salze" soll Salze der aktiven Verbindungen umfassen, die mit relativ nichttoxischen Säuren oder Basen, in Abhängigkeit der jeweiligen Substituenten an den hierin beschriebenen Verbindungen, hergestellt werden. Enthalten Verbindungen der vorliegenden Erfindung relativ saure Funktionalitäten, so können Basenadditionssalze durch Kontaktieren der neutralen Form solcher Verbindungen mit einer ausreichenden Menge der gewünschten Base, entweder nur damit oder in einem geeigneten inerten Lösungsmittel, gewonnen werden. Beispiele für pharmazeutisch annehmbare Basenadditionssalze umfassen Natrium-, Kalium-, Calcium-, Ammonium-, organische Amino- oder Magnesiumsalze oder ein ähnliches Salz. Enthalten Verbindungen der vorliegenden Erfindung relativ basische Funktionalitäten, so können Säureadditionssalze durch Kontaktieren der neutralen Form solcher Verbindungen mit einer ausreichenden Menge der gewünschten Säure, entweder nur damit oder in einem geeigneten inerten Lösungsmittel, gewonnen werden. Beispiele für pharmazeutisch annehmbare Säureadditionssalze umfassen jene, die von anorganischen Säuren wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Salpetersäure, Kohlensäure, Monohydrogenkohlensäure, Phosphorsäure, Monohydrogenphosphorsäure, Dihydrogenphosphorsäure, Schwefelsäure, Monohydrogenschwefelsäure, lodwasserstoffsäure oder Phosphor(III)-säure und dergleichen abgeleitet sind, sowie jene Salze, die von relativ nichttoxischen organischen Säuren wie Essig-, Propan-, Isobutter-, Oxal-, Malein-, Malon-, Benzoe-, Bernstein-, Suberin-, Fumar-, Mandel-, Phthal-, Benzolsulfon-, p-Toluolsulfon-, Zitronen-, Wein-, Methansulfonsäure und dergleichen abgeleitet sind. Auch umfasst sind Salze von Aminosäuren, wie Arginat und dergleichen, und Salze von organischen Säuren wie Glucuron- oder Galacturonsäuren und dergleichen (siehe beispielsweise S.M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science 66, 1–19 (1977)). Bestimmte spezifische Verbindungen der vorliegenden Erfindung enthalten sowohl basische als auch saure Funktionalitäten, die es ermöglichen, dass die Verbindungen entweder zu Basen- oder zu Säureadditionssalzen umgesetzt werden.

[0025] Die neutralen Formen der Verbindungen können durch Kontaktieren des Salzes mit einer Base oder Säure und Isolieren der Ausgangsverbindung auf herkömmliche Weise wiederhergestellt werden. Die Ausgangsform der Verbindung unterscheidet sich von den verschiedenen Salzformen bezüglich bestimmter physikalischer Eigenschaften, wie z.B. Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln, abgesehen davon sind jedoch die Salze mit der Ausgangsform der Verbindung für die Zwecke der vorliegenden Erfindung äquivalent.

[0026] Zusätzlich zu Salzformen stellt die vorliegende Erfindung Verbindungen bereit, die in einer Prodrug-Form vorliegen. Prodrugs der hierin beschriebenen Verbindungen sind jene Verbindungen, die unter physiologischen Bedingungen leicht chemische Veränderungen erfahren können, um die Verbindungen der vorliegenden Erfindung bereitzustellen. Darüber hinaus können Prodrugs durch chemische oder biochemische Verfahren in einer Ex-vivo-Umgebung zu den Verbindungen der vorliegenden Erfindung umgesetzt werden. Beispielsweise können Prodrugs langsam zu den Verbindungen der vorliegenden Erfindung umgesetzt werden, wenn sie zusammen mit einem geeigneten Enzym oder chemischen Reagens in ein Reservoir eines transdermalen Pflasters eingefüllt werden.

[0027] Bestimmte Verbindungen der vorliegenden Erfindung können in unsolvatisierten Formen sowie in solvatisierten Formen, einschließlich hydratisierten Formen, vorliegen. Im Allgemeinen sind die solvatisierten Formen mit den unsolvatisierten Formen gleichwertig und sollen im Schutzumfang der vorliegenden Erfindung enthalten sein. Bestimmte Verbindungen der vorliegenden Erfindung können in mehreren Kristalloder amorphen Formen vorliegen. Allgemein sind alle physikalischen Formen für die in der vorliegenden Erfindung erwogenen Verwendungen gleichwertig und sollen im Schutzumfang der vorliegenden Erfindung liegen.

[0028] Bestimmte Verbindungen der vorliegenden Erfindung verfügen über asymmetrische Kohlenstoffatome (optische Zentren) oder Doppelbindungen; die Racemate, Diastereomere, geometrischen Isomere und einzelnen Isomere sollen alle im Schutzumfang der vorliegenden Erfindung liegen.

[0029] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können auch unnatürliche Anteile an atomaren Isotopen eines oder mehrerer der Atome enthalten, die solche Verbindungen bilden. Die Verbindungen können beispielsweise mit radioaktiven Isotopen, wie beispielsweise Tritium (^{3}H), Iod-125 (^{125}I) oder Kohlenstoff-14 (^{14}C) radioaktiv markiert sein. Alle Isotopenvariationen der Verbindungen der vorliegenden Erfindung, unabhängig davon, ob radioaktiv oder nicht, sollen im Schutzumfang der vorliegenden Erfindung liegen.

Einführung

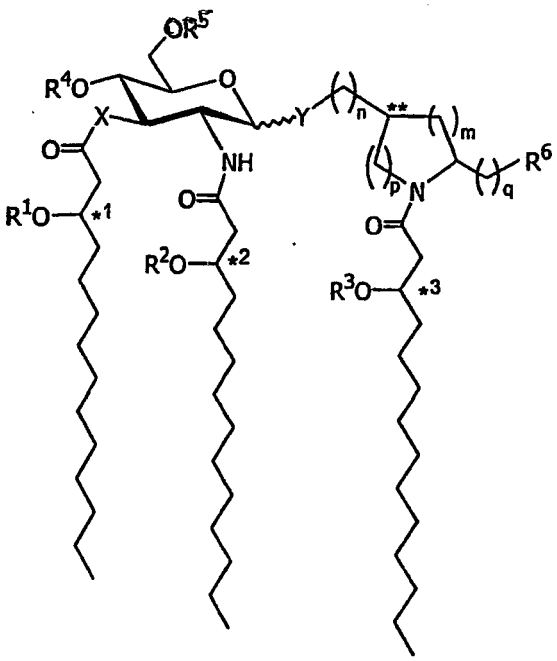
[0030] Im Bemühen, die Sicherheit von Vakzinen zu verbessern, vermeiden Hersteller abgetötete Ganzzellen-Vakzinen und stellen rekombinante oder Untereinheits-Vakzinen her. Bei der Herstellung dieser sichereren Vakzinen werden fremde Bakterien- oder Virenkomponenten eliminiert, während die minimalen Strukturen oder Epitope, die für die schützende Immunität als erforderlich erachtet werden, zurückbleiben. Die Sicherheit dieser Vakzinen wird durch die Eliminierung fremder Bakterien- oder Virenkomponenten verbessert, die sich häufig als toxisch oder pyrogen erweisen. Dieselben Komponenten jedoch, die zu Toxizität führen, stellen auch unspezifische Immunstimulierung bereit, die Ganzzellen-Vakzinen so wirksam macht. Ohne die zusätzliche Immunstimulierung sind die minimalen Strukturen und Epitope, die rekombinante und Untereinheits-Vakzinen enthalten, häufig nur schwach immunogen.

[0031] Ein Disaccharidmolekül, das aus dem LPS von Salmonella minnesota R595 stammt, MPL®-Immunstimulans (Corixa Corp.), weist immunstimulierende Eigenschaften auf. MPL®-Immunstimulans, Monophosphoryllipid A, ist ein strukturelles Derivat von Lipid A (oder LPS) und hat im Vergleich zu Lipid A einen verbesserten therapeutischen Index (siehe das US-Patent Nr. 4.987.237 bezüglich der Struktur von Monophosphoryllipid A; die US-Patente Nr. 4.436.727 und 4.436.728 bezüglich einer Beschreibung der Herstellung von Monophosphoryllipid A). Andere nützliche Immunstimulanzien umfassen 3-de-O-acyliertes Monophosphoryllipid A (3D-MPL), das im US-Patent Nr. 4.912.094 beschrieben wird. Die Verbindung kann Menschen in Dosierungen bis zu zumindest 20 µg/kg sicher verabreicht werden, wenn auch Temperaturerhöhung, Grippe-ähnliche Symptome, erhöhte Herzfrequenz und geringfügiger Anstieg des Blutdrucks bei manchen Patienten bei Dosierungen von ≥ 10 µg/kg auftreten können. Zellkultur- und Tierbewertungen bestätigen, dass MPL®-Immunstimulans stets eine gewisse immunstimulierende Aktivität des verwandten LPS dahingehend beibehält, dass Pyrogenität und die Fähigkeit, entzündungsfördernde Cytokine wie TNF und IL-8 zu induzieren, vorhanden bleiben, wenn auch bei höheren Dosierungsniveaus. Somit ist der Bedarf an wirksamen Vakzinenadjuvanzien durchwegs bekannt. Im Idealfall fördern diese Adjuvanzien die schützende Immunantwort, ohne unerwünschte Toxizität und Pyrogenität zu induzieren.

[0032] Im Bemühen, ein Immunstimulans zu erhalten, das geringe Pyrogenität aufweist, wurden synthetische Moleküle hergestellt, die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem MPL®-Immunstimulans zeigen (siehe US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 09/810.915, eingereicht am 16. März 2001, und die vorliegende Erfindung). Diese neuen Moleküle, die kollektiv als Aminoalkylglucosaminidphosphate (AGPs) bezeichnet werden, bestehen aus einer acylierten Glucosegruppierung, die an eine acylierte Aminoalkylgruppe gebunden ist (Johnson et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 9, 2273-2278 (1999); PCT/WO98/50399 und die darin zitierten Verweise). Jedes Molekül weist 6 Fettsäureketten auf, wovon angenommen wird, dass dies die optimale Anzahl für Spitzen-Adjuvansaktivität ist. Die Substitution verschiedener chemischer Gruppierungen innerhalb der Aminoalkylstrukturen wurde in den AGPs in der Erwartung, Stabilitäts- und Löslichkeitseigenschaften zu verbessern, konzipiert. Somit können die AGPs basierend auf der Struktur ihrer Aminoalkylgruppen grob in mehrere Familien eingeteilt werden. Nach anfänglicher biologischer Bewertung wurde ersichtlich, dass die Aminoalkylmotive die pyrogenen Eigenschaften von AGPs extrem stark beeinflussen konnten (siehe die US-Patentanmeldungen mit den Serien-Nr. 09/810915 (eingereicht am 16. März 2001), 09/439.839, 09/074.720 und US-Patent Nr. 6.113.918 (das aus der USSN 08/853.826 hervorgegangen ist)). Als Teil des anfänglichen Screening-Verfahrens der synthetischen Adjuvansverbindungen wurde Daten zu Kaninchen-Pyrogenität bestimmt. Es wurde bemerkt, dass mehrere der Verbindungen keine Fieberreaktion hervorriefen, wenn sie i.v. in Dosierungen von 10 µg/kg verabreicht wurden. Im Allgemeinen konnten dieselben Verbindungen keine nachweisbaren Konzentrationen von Entzündungscytokinen TNF-α oder IL-1β in einem Ex-vivo-Cytokininduktionstest an menschlichen einkernigen Peripherblutzellen hervorrufen. Im Anschluss berichten die Erfinder von Studien zu den Adjuvanseigenschaften einer Klasse von AGPs, die sowohl im Kaninchen-Pyrogenitätstest als auch im Ex-vivo-Cytokintest minimale Aktivität induzieren.

Verbindungen und Zusammensetzungen

[0033] Die vorliegende Erfindung stellt Verbindungen bereit, die allgemein durch die Formel



(I)

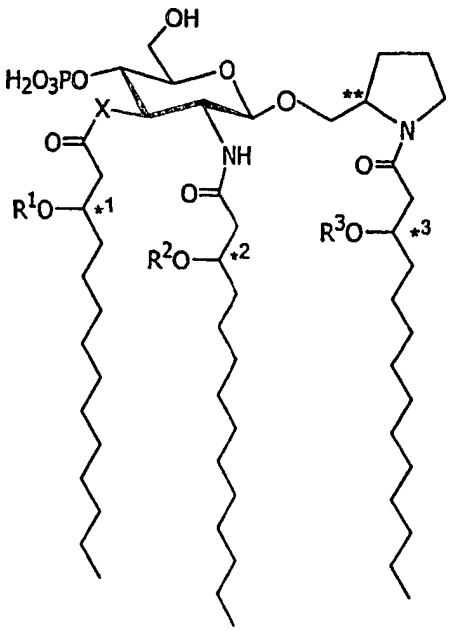
beschrieben werden, sowie pharmazeutisch annehmbare Salze davon, worin X -O- oder -NH- ist und Y -O- oder -S- ist; R^1, R^2 und R^3 unabhängig voneinander eine (C_2-C_{24})-Acylgruppe, einschließlich gesättigter, ungesättigter und verzweigter Acylgruppen, sind; R^4 -H- oder -$PO_3R^7R^8$ ist, worin R^7 und R^8 unabhängig voneinander H oder (C_1-C_4)-Alkyl sind; R^5 -H, -CH_3 oder -$PO_3R^9R^{10}$ ist, worin R^9 und R^{10} unabhängig voneinander aus -H und (C_1-C_4)-Alkyl ausgewählt sind; R^6 unabhängig aus H, OH, (C_1-C_4)-Alkoxy $PO_3R^{11}R^{12}$, -$OPO_3R^{11}R^{12}$, SO_3R^{11}, OSO_3R^{11}, $NR^{11}R^{12}$, -NO_2, -CHO, -CO_2R^{11} und -$CONR^{11}R^{12}$ ausgewählt ist, worin R^{11} und R^{12} unabhängig voneinander aus H und (C_1-C_4)-Alkyl ausgewählt sind; mit der Maßgabe, dass, wenn R^4 -$PO_3R^7R^8$ ist, R^5 nicht -$PO_3R^9R^{10}$ ist, worin "*1–3" und "**" für Chiralitätszentren stehen; worin die Indices n, m, p und q unabhängig voneinander ganze Zahlen von 0 bis 6 sind, mit der Maßgabe, dass die Summe p + m = 0 bis 6 ist.

[0034] Auch wenn das Hexopyranosid in Formel I in der Gluco-Konfiguration gezeigt ist, fallen auch andere Glykoside in den Schutzumfang der Erfindung. Glykopyranoside beispielsweise, einschließlich anderer Hexo-

pyranoside (z.B. Allo-, Altro-, Manno-, Gulo-, Ido-, Galacto-, Talo-), liegen im Schutzumfang der Erfindung.

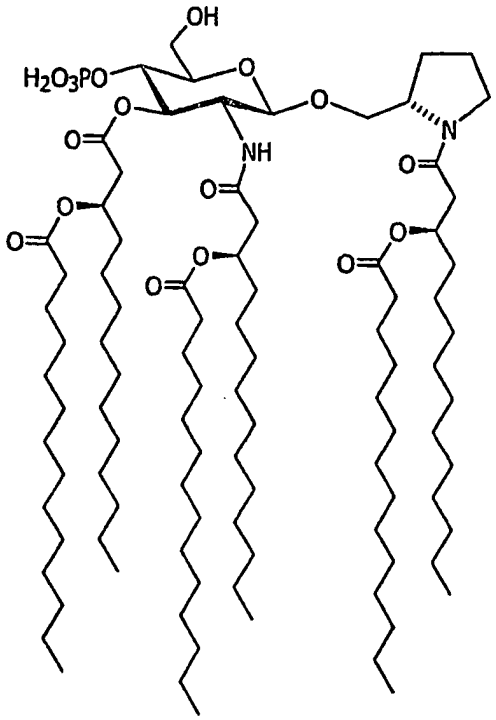
[0035] In der oben gezeigten, allgemeinen Formel liegen die 3'-stereogenen Zentren, an die die normalen Fettsäure-Acylreste gebunden sind, bezeichnet als "*1", "*1" und "*3", in R- oder S-Konfiguration, vorzugsweise jedoch R-Konfiguration, vor. Die absolute Stereochemie der Kohlenstoffatome der zyklischen Aglykoneinheit, an die R^6 und die Glucosamineinheit, direkt oder indirekt gebunden sind (bezeichnet als "**"), kann R oder S sein. In der oben gezeigten, allgemeinen Formel kann Y in äquatorialer oder axialer Stellung vorliegen, liegt jedoch vorzugsweise in äquatorialer Stellung vor. Alle Stereoisomere, Enantiomere, Diastereomere und Gemische davon gelten als im Schutzumfang der vorliegenden Erfindung liegend.

[0036] In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind X und Y -O-, ist R^4 Phosphono, sind R^5 und R^6 H und sind die Indices n, m, p und q ganze Zahlen von 0 bis 3, noch bevorzugter von 0 bis 2. Noch bevorzugter ist die ganze Zahl n = 1, die ganze Zahl m = 2 und sind die ganzen Zahlen p und q = 0. In dieser bevorzugten Ausführungsform sind die Verbindungen dieser Erfindung 2-Pyrrolidinomethyl-β-D-glucosaminid-4-phosphate der allgemeinen Formel (III):



(III)

[0037] In der am meisten bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind R^1, R^2 und R^3 aus Formel (III) Tetradecanoylreste, und die 3'-stereogenen Zentren ("*1–3"), an die sie gebunden sind, liegen in R-Konfiguration vor, Y liegt in äquatorialer Stellung vor, und die absolute Stereochemie des stereogenen Pyrrolidinzentrums ("**") ist S. Insbesondere ist die Verbindung der am meisten bevorzugten Ausführungsform N-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoyl]-(S)-2-pyrrolidinomethyl-2-desoxy-4-O-phosphono-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylaminoj-3-O-[(R)-3-tetra-decanoyloxytetradecanoyl]-β-D-glucopyranosid und pharmazeutisch annehmbare Salze davon. Diese am meisten bevorzugte Ausführungsform ist auch als RC-553 bekannt und ist in Formel II dargestellt:



(II)

Herstellung von Verbindungen

[0038] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können mittels Verfahren, die in Johnson et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 9, 2273-2278 (1999), und in der PCT/WO 98/50399 und den darin zitierten Verweisen erläutert werden, hergestellt werden. Im Allgemeinen sind die Syntheseverfahren, die in den oben genannten Verweisen beschrieben werden, durchwegs bei der Herstellung von Verbindungen mit verschiedenen Acylgruppen und Substitutionen anwendbar. Fachleuten wird bekannt sein, dass die hierin beschriebenen, zusammenlaufenden Verfahren so modifiziert werden können, dass alternative Acylierungsmittel zum Einsatz kommen oder dass sie mit handelsüblichen Materialien mit geeigneten gebundenen Acylgruppen begonnen werden können.

Evaluierung von Verbindungen

[0039] Die hierin bereitgestellten Verbindungen können in zahlreichen verschiedenen Testformaten evaluiert werden, um auf eine Verbindung mit einem geeigneten pharmakophoren Profil zu selektieren. Das US-Patent Nr. 6.013.640 beschreibt beispielsweise Tiermodelle, die zur Evaluierung kardioprotektiver Wirkungen von hierin beschriebenen Verbindungen geeignet sind. Die nachstehend genannten Beispiele stellen auch Tests zur Evaluierung der Pyrogenität der vorliegenden Verbindungen sowie weitere Tests zur Evaluierung der entzündungsfördernden Wirkungen der Verbindungen bereit.

[0040] Die vorliegende Erfindung stellt weiters pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, die die hierin bereitgestellten Verbindungen im Gemisch mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Trägern umfasst. Geeignete Träger hängen vom zu behandelnden Leiden sowie von der Art der Verabreichung ab. Folglich werden nachstehend die Träger in Verbindung mit den Verwendungsverfahren erörtert.

Pharmazeutische Zusammensetzungen und ihre Verwendungen

[0041] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, die eine Verbindung der vorliegenden Erfindung und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger enthalten. Die Verbindung ist in einer therapeutisch wirksamen Menge vorhanden, die die erforderliche Menge an Verbindung ist, um die gewünschte Wirkung, d.h. die Behandlung einer Krankheit oder eines Leidens oder das Erreichen eines biologischen Ereignisses, zu erzielen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können als Adjuvans wirken, wenn sie zusammen mit einem Antigen verabreicht werden.

[0042] Somit sind die Adjuvanssysteme der Erfindung besonders bei der Herstellung und Verwendung von

Vakzinen- und anderen immunstimulierenden Zusammensetzungen zur Behandlung oder Prävention von Erkrankungen, beispielsweise zur Induktion von aktiver Immunität gegenüber Antigenen in Säugetieren, vorzugsweise in Menschen, von großem Vorteil. Die Herstellung von Vakzinen ist ein weit entwickeltes Verfahren, und allgemeine Anweisungen zur Herstellung und Formulierung von Vakzinen sind leicht aus zahlreichen verschiedenen Quellen erhältlich. Ein Beispiel hierfür ist New Trends and Developments in Vaccines, herausgegeben von Voller et al., University Park Press, Baltimore, Md., USA (1978).

[0043] In einer veranschaulichenden Ausführungsform ist das Antigen in einer Vakzinenzusammensetzung der Erfindung ein Peptid, Polypeptid oder ein immunogener Teil davon. Ein "immunogener Teil", wie hierin verwendet, bezeichnet einen Teil eines Proteins, der von einem B-Zellen- und/oder T-Zellen-Oberflächenantigenrezeptor erkannt (d.h. spezifisch gebunden) wird. Solche immunogenen Teile umfassen im Allgemeinen zumindest 5 Aminosäurereste, noch bevorzugter zumindest 10, und noch bevorzugter zumindest 20 Aminosäurereste, eines antigenen Proteins oder einer Variante davon.

[0044] Immunogene Teile von Antigen-Polypeptiden können im Allgemeinen unter Anwendung bekannter Verfahren, wie beispielsweise jenen, die in Paul, Fundamental Immunology, 3. Auflage, Raven Press, 243–247 (1993), und den darin zitierten Verweisen zusammengefasst werden, identifiziert werden. Solche Verfahren umfassen das Screenen von Polypeptiden auf ihre Fähigkeit, mit Antigen-spezifischen Antikörpern, Antiseren und/oder T-Zelllinien oder Klonen zu reagieren. Wie hierin verwendet sind Antiseren und Antikörper "Antigen-spezifisch", wenn sie sich spezifisch an ein Antigen binden (d.h. wenn sie mit dem Protein in einer ELISA oder einem anderen Immuntest reagieren und nicht nachweisbar mit nicht verwandten Proteinen reagieren). Solche Antiseren und Antikörper können wie hierin beschrieben und unter Verwendung bekannter Verfahren hergestellt werden. Ein immunogener Teil eines Proteins ist ein Teil, der mit solchen Antiseren und/oder T-Zellen zu einem Grad reagiert, der nicht wesentlich geringer als die Reaktivität des Polypeptids voller Länge ist (z.B. in einer ELISA und/oder einem T-Zell-Reaktivitätstest). Solche immunogenen Teile können im Rahmen solcher Tests in einem Ausmaß reagieren, das mit der Reaktivität des Polypeptids voller Länge vergleichbar oder höher als diese ist. Solche Screens können allgemein unter einsatz von Verfahren, die durchschnittlichen Fachleuten durchwegs bekannt sind, durchgeführt werden, wie beispielsweise jene, die in Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), beschrieben werden, Ein Polypeptid kann beispielsweise an einem festen Träger immobilisiert und mit Patientenseren kontaktiert werden, um Bindung von Antikörpern innerhalb der Seren an das immobilisierte Polypeptid zu ermöglichen. Ungebundene Seren können dann entfernt und gebundene Antikörper unter Verwendung von beispielsweise mit ^{125}I markiertem Protein A entfernt werden.

[0045] Peptid- und Polypeptid-Antigene werden unter Verwendung jedes beliebigen aus einer Vielzahl von bekannten Verfahren hergestellt werden. Rekombinante Polypeptide, für die DNA-Sequenzen kodieren, können leicht aus isolierten DNA-Sequenzen unter Verwendung zahlreicher Expressionsvektaren, die durchschnittlichen Fachleuten bekannt sind, hergestellt werden. Expression kann in jeder beliebigen, geeigneten Wirtszelle erzielt werden, die mit einem Expressionsvektor transformiert oder transfiziert wurde, der ein DNA-Molekül enthält, das für ein rekombinantes Polypeptid kodiert. Geeignete Wirtszellen umfassen Prokaryoten, Hefe und höhere eukaryotische Zellen, wie beispielsweise Säugetierzellen und Pflanzenzellen. Vorzugsweise sind die verwendeten Wirtszellen E. coli, Hefe oder eine Säugetierzelllinie wie COS oder CHO.

[0046] Teile und andere Varianten eines Protein-Antigens mit weniger als etwa 100 Aminosäuren, und im Allgemeinen weniger als etwa 50 Aminosäuren, können auch auf synthetischem Weg unter Anwendung von Verfahren, die durchschnittlichen Fachleuten durchwegs bekannt sind, hergestellt werden. Beispielsweise können solche Polypeptide unter Anwendung jedes beliebigen der im Handel erhältlichen Festphasenverfahren, wie beispielsweise des Merrifield-Festphasensynthese-Verfahrens, worin Aminosäuren nacheinander einer wachsenden Aminosäurekette hinzugefügt werden, synthetisiert werden. Siehe Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149–2146 (1963). Die Geräte für die automatisierte Synthese von Polypeptiden sind im Handel bei Lieferanten wie Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA) erhältlich und können gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt werden.

[0047] Im Rahmen bestimmter spezifischer Ausführungsformen kann ein Polypeptid-Antigen, das in den Vakzinenzusammensetzungen der Erfindung verwendet wird, ein Fusionsprotein sein, das zwei oder mehrere unterschiedliche Polypeptide umfasst. Ein Fusionspartner kann beispielsweise beim Bereitstellen von T-Helferepitopen (ein immunologischer Fusionspartner), vorzugsweise T-Helferepitopen, die von Menschen erkannt werden, helfen oder kann die Expression des Proteins (ein Expressionsenhancer) mit höheren Ausbeuten als im Fall des nativen rekombinanten Proteins unterstützen. Bestimmte bevorzugte Fusionspartner sind sowohl immunologische als auch expressionsfördernde Fusionspartner. Andere Fusionspartner können so ausge-

wählt werden, dass die Löslichkeit des Proteins gesteigert wird oder dass ermöglicht wird, dass das Protein auf erwünschte intrazelluläre Kompartimente gerichtet wird. Wiederum andere Fusionspartner umfassen Affinitätsmarkierungen, die das Reinigen des Proteins erleichtern.

[0048] Fusionsproteine können allgemein unter Anwendung herkömmlicher Verfahren, einschließlich chemischer Anbindung, hergestellt werden. Vorzugsweise wird ein Fusionsprotein als rekombinantes Protein exprimiert, was die Produktion erhöhter Konzentrationen im Vergleich zu einem nichtfusionierten Protein in einem Expressionssystem ermöglicht. Kurz zusammengefasst können DNA-Sequenzen, die für die Polypeptidkomponenten kodieren, separat assembliert und in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Das 3'-Ende der DNA-Sequenz, die für eine Polypeptidkomponente kodiert, wird mit oder ohne Peptidlinker an das 5'-Ende einer DNA-Sequenz, die für die zweite Polypeptidkomponente kodiert, ligiert, sodass sich die Leseraster der Sequenzen in Phase befinden. Dies ermöglicht Translation in zu einem einzelnen Fusionsprotein, das die biologische Aktivität beider Komponentenpolypeptide beibehält.

[0049] Eine Peptidlinkersequenz kann verwendet werden, um die erste und die zweite Polypeptidkomponente durch eine Distanz zu trennen, die ausreichend ist, um sicher zu stellen, dass sich jedes Polypeptid zu seiner Sekundär- und Tertiärstruktur faltet. Solch eine Peptidlinkersequenz wird in das Fusionsprotein unter Verwendung von Standardverfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt sind, eingebaut. Geeignete Peptidlinkersequenzen können auf Grundlage der folgenden Faktoren ausgewählt werden: (1) ihrer Fähigkeit, eine flexible erweiterte Konformation anzunehmen; (2) ihrer Unfähigkeit, eine Sekundärstruktur anzunehmen, die mit funktionellen Epitopen an den ersten und zweiten Polypeptiden wechselwirken könnte; und (3) mangelnder hydrophober oder geladener Reste, die mit den funktionellen Polypeptidepitopen reagieren könnten. Bevorzugte Peptidlinkersequenzen enthalten Gly-, Asn- und Ser-Reste. Andere nahe, neutrale Aminosäuren, wie Thr und Ala, können in der Linkersequenz auch verwendet werden. Aminosäuresequenzen, die als Linker auf nützliche Weise verwendet werden können, umfassen jene, die in Maratea et al., Gene 40, 39–46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8258–8262 (1986); im US-Patent Nr. 4.935.233 und im US-Patent Nr. 4.751.180 offenbart sind. Die Linkersequenz kann im Allgemeinen eine Länge von 1 bis etwa 50 Aminosäuren aufweisen. Linkersequenzen sind nicht erforderlich, wenn das erste und das zweite Polypeptid nicht wesentliche, N-terminale Aminosäureregionen aufweisen, die verwendet werden können, um die funktionellen Domänen voneinander zu trennen und störende sterische Einflüsse zu unterbinden.

[0050] Im Rahmen von bevorzugten Ausführungsformen wird ein immunologischer Fusionspartner von Protein D, einem Oberflächenprotein des gramnegativen Bakteriums Haemophilus influenza B (WO 91/18926) abgeleitet. Vorzugsweise umfasst ein Protein-D-Derivat etwa das erste Drittel des Proteins (z.B. die ersten N-terminalen 100-110 Aminosäuren), und ein Protein-D-Derivat kann lipidiert sein. Bei bestimmten bevorzugten Ausführungsformen sind die ersten 109 Reste eines Lipoprotein-D-Fusionspartners am N-Terminus eingebunden, um das Polypeptid mit zusätzlichen exogenen T-Zellepitopen zu versehen und das Expressionsniveau in E. coli zu steigern (wodurch er als Expressionsenhancer wirkt). Das Lipidende stellt die optimale Präsentation des Antigens gegenüber Antigen-präsentierenden Zellen sicher. Andere Fusionspartner umfassen das nichtstrukturelle Protein aus Influenza-Virus NS1 (Hämagglutinin). Typischerweise werden die N-terminalen 81 Aminosäuren verwendet, wobei auch andere Fragmente, die T-Helferepitope umfassen, verwendet werden können.

[0051] In einer anderen Ausführungsform ist der immunologische Fusionspartner das als LYTA bekannte Protein oder ein Teil davon (vorzugsweise ein C-terminaler Teil). LYTA stammt aus Streptococcus pneumoniae, der eine als Amidase LYTA bekannte N-Acetyl-L-alanin-Amidase (für die das LytA-Gen kodiert; Gene 43, 265–292 (1986)) synthetisiert. LYTA ist ein Autolysin, das bestimmte Bindungen in der Peptidoglykan-Hauptkette abbaut. Die C-terminale Domäne des LYTA-Proteins ist für die Affinität für Cholin oder bestimmte Cholinanaloga wie DEAE verantwortlich. Diese Eigenschaft kann für die Entwicklung von E.-coli-C-LYTA-exprimierenden Plasmiden genutzt werden, die für die Expression von Fusionsproteinen nützlich sind. Die Reinigung von Hybridproteinen, die das C-LYTA-Fragment am Aminoterminus enthalten, wurde bereits beschrieben (siehe Biotechnology 10, 795–798 (1992)). In einer bevorzugten Ausführungsform kann ein Wiederholungsabschnitt von LYTA in ein Fusionsprotein eingebaut werden. Ein Wiederholungsabschnitt ist in der C-terminalen Region, beginnend an Rest 178, zu finden. Ein besonders bevorzugter Wiederholungsabschnitt umfasst die Reste 188–305.

[0052] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird das hierin beschriebene Adjuvanssystem bei der Herstellung von DNA-basierten Vakzinenzusammensetzungen verwendet. Veranschaulichende Vakzinen von diesem Typ enthalten DNA, die für ein oder mehrere Polypeptid-Antigene kodiert, sodass das Antigen in situ gebildet wird. Die DNA kann innerhalb jedes beliebigen aus zahlreichen verschiedenen Zufuhrsystemen, die

durchschnittlichen Fachleuten bekannt sind, vorhanden sein, einschließlich Nucleinsäure-Expressionssystemen, Bakterien- und Virusexpressionssystemen. Zahlreiche Genzufuhrverfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt, wie beispielsweise jene, die von Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15, 143–198 (1998), und in den darin zitierten Verweisen beschrieben werden. Geeignete Nucleinsäure-Expressionssysteme enthalten die erforderlichen DNA-Sequenzen zur Expression im Patienten (wie beispielsweise einen geeigneten Promotor und ein Terminationssignal). Bakterienzufuhrsysteme umfassen die Verabreichung eines Bakteriums (wie Bacillus-Calmette-Guerrin), das einen immunogenen Teil des Polypeptids an seiner Zelloberfläche exprimiert oder solch ein Epitop sekretiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die DNA unter Verwendung eines Virusexpressionssystems (z.B. Vakzinia- oder ein anderes Pockenvirus, Retrovirus oder Adenovirus) eingeführt, das typischerweise die Verwendung eines nicht-pathogenen (defekten), replikationsfähigen Virus umfasst. Veranschaulichende Systeme sind beispielsweise in Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 317–321 (1989); Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 569, 86–103 (1989); Flexner et al., Vaccine 8, 17-21 (1990); in den US-Patenten Nr. 4.603.112; 4.769.330; und 5.017.487; der WO 89/01973; dem US-Patent Nr. 4.777.127; der GB 2.200.651; der EP 0.345.242; der WO 91/02805; in Berkner, Biotechniques 6, 616–627 (1988); Rosenfeld et al., Science 252, 431–434 (1991); Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 215–219 (1994); Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11498–11502 (1993); Guzman et al., Circulation 88, 2838–2848 (1993); und Guzman et al., Cir. Res. 73, 1202–1207 (1993), beschrieben. Verfahren zum Einbau von DNA in solche Expressionssysteme sind durchschnittlichen Fachleuten durchwegs bekannt.

[0053] Alternativ dazu kann die DNA "nackt" sein, wie beispielsweise in Ulmer et al., Science 259, 1745–1749 (1993), beschrieben und von Cohen, Science 259, 1691–1692 (1993), neuerlich erörtert wurde. Die Aufnahme von nackter DNA kann durch Aufphaseen der DNA auf biologisch abbaubare Perlen, die effizient in die Zellen transportiert werden, gesteigert werden. Es versteht sich, dass eine Vakzine, falls gewünscht, sowohl eine Polynucleotid- als auch eine Polypeptidkomponente umfassen kann.

[0054] Darüber versteht es sich, dass eine Vakzine pharmazeutisch annehmbare Salze der gewünschten Polynucleotid-, Polypeptid- und/oder Kohlenhydrat-Antigene enthalten kann. Solche Salze können beispielsweise aus pharmazeutisch annehmbaren, nichttoxischen Basen, einschließlich organischer Basen (z.B. Salze von primären, sekundären oder tertiären Aminen und basischen Aminosäuren) und anorganischer Basen (z.B. Natrium-, Kalium-, Lithium-, Ammonium-, Calcium- und Magnesiumsalze) hergestellt werden.

[0055] Das Adjuvanssystem der vorliegenden Erfindung zeigt starke Adjuvanswirkung, wenn es über einen breiten Dosierungsbereich und einen breiten Bereich an verschiedenen Verhältnissen verabreicht wird.

[0056] Die Menge an Antigen in jeder Vakzinendosierung wird im Allgemeinen als eine Menge ausgewählt, die eine schützende Immunantwort ohne signifikante negative Nebenwirkungen in typischen Vakzinen induziert. Eine solche Menge variiert je nachdem, welches spezifische Immunogen verwendet wird und wie es präsentiert wird. Im Allgemeinen wird erwartet, dass jede Dosis etwa 1–1.000 µg Protein, am typischsten etwa 2–100 µg, vorzugsweise etwa 5–50 µg, umfasst. Natürlich kann die verabreichte Dosierung auch von Alter und Gewicht, der Art von gleichzeitigen Behandlungen, sofern welche erfolgen, und der Beschaffenheit des verabreichten Antigens abhängen.

[0057] Die immunogene Aktivität einer bestimmten Menge einer Vakzinenzusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann leicht bestimmt werden, beispielsweise durch Beobachten der Steigerung des Titers eines Antikörpers gegen das in der Vakzinenzusammensetzung verwendete Antigen (K. Dalsgaard, Acta Veterinia Scandinavica 69, 1–40 (1978)). Ein anderes übliches Verfahren umfasst das intradermale Injizieren verschiedener Mengen einer Vakzinenzusammensetzung in CD-1-Mäuse und das anschließende Ernten von Seren aus den Mäusen und Testen auf Anti-Immunogen-Antikörper, z.B. mittels ELISA. Diese und andere ähnliche Ansätze werden Fachleuten bekannt sein.

[0058] Das Antigen kann aus im Wesentlichen jeder beliebigen gewünschten Quelle, je nach Infektionskrankheit, Autoimmunerkrankung, Leiden, Krebs, Pathogen oder Erkrankung, die/das/den es mit einer bestimmten Vakzinenzusammensetzung zu behandeln gilt, abgeleitet und/oder isoliert werden. Beispielsweise können die Antigene aus einer Virusquelle, z.B. aus Influenza-Virus, felinem Leukämie-Virus, felinem Immunschwächevirus, menschlichem HIV-1, HIV-2, Herpes-Simplex-Virus Typ 2, humanem Zytomegalie-Virus, Hepatitis A, B, C oder E, respiratorischem Synzytial-Virus, humanem Papilloma-Virus, Tollwut, Masern oder Maul- und Klauenseucheviren, stammen. Beispielhafte Antigene können auch aus bakteriellen Quellen wie Anthrax, Diphtherie, Borreliose, Malaria, Tuberkulose, Leishmaniase, T. cruzi, Ehrlichia, Candida und dergleichen oder aus Protozoen wie Babeosis bovis oder Plasmodium stammen. Das/Die Antigen(e) besteht/bestehen typischerweise

aus natürlichen oder synthetischen Aminosäuren, z.B. in Form von Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen, können sich aus Polysacchariden zusammensetzen oder ein Gemisch davon sein. Beispielhafte Antigene können aus natürlichen Quellen isoliert, mittels Festphasensynthese synthetisiert oder mittels DNA-Rekombinationsverfahren gewonnen werden.

[0059] In einer anderen Ausführungsform werden Tumorantigene in den Vakzinenzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Krebs verwendet. Krebszellen weisen häufig unterschiedliche Antigene an ihren Oberflächen auf, wie beispielsweise trunkierten Epidermiswachstumsfaktor, Folatbindungsprotein, Epithelmucine, Melanoferrin, karzinoembryonales Antigen, Prostataspezifisches Membranantigen, HER2-neu, die Kandidaten zur Verwendung in therapeutischen Krebsvakzinen sind. Da Tumorantigene normale Komponenten des Körpers sind oder mit normalen Komponenten des Körpers verwandt sind, schafft es das Immunsystem häufig nicht, eine wirksame Immunantwort gegen jene Antigene hervorzubringen, um die Tumorzellen zu zerstören. Um solch eine Antwort zu erzielen, können die hierin beschriebenen Adjuvanssysteme verwendet werden. Als Resultat dessen können die exogenen Proteine in den Stoffwechselweg zur Verarbeitung endogener Antigene eintreten, was zur Produktion von zytolytischen oder zytotoxischen T-Zellen (CTL) führt. Diese Adjuvanswirkung erleichtert die Produktion von Antigenspezifischen CTLs, die diese Tumorzellen, die an ihrer Oberfläche das/die zur Immunisierung verwendete(n) Tumorantigen(e) tragen, suchen und zerstören. Beispiele für Krebstypen, für die dieser Ansatz verwendet werden kann, umfassen Prostata-, Dickdarm-, Brust-, Eierstock-, Bauchspeicheldrüsen-, Hirn-, Kopf- und Hals-, Melanom-, Blut- oder Lymphkrebs und dergleichen.

[0060] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann das Adjuvanssystem der vorliegenden Erfindung alleine, d.h. ohne ein gleichzeitig verabreichtes Antigen, verabreicht werden, um das Immunsystem zur Behandlung chronischer Infektionskrankheiten, insbesondere an immungeschwächten Patienten, zu potenzieren. Veranschaulichende Beispiele für Infektionskrankheiten, für die dieser Ansatz zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung verwendet werden kann, sind um US-Patent Nr. 5.508.310 zu finden. Eine Potenzierung des Immunsystems auf diese Weise kann auch als eine Präventivmaßnahme nützlich sein, um die Risiken von nosokomialen Infektionen und/oder Infektionen nach chirurgischen Eingriffen einzuschränken.

[0061] In einer anderen Ausführungsform ist das in den Vakzinenzusammensetzungen vorhandene Antigen kein Fremdantigen, sondern ein Selbstantigen, z.B. richtet sich die Vakzinenzusammensetzung gegen eine Autoimmunerkrankung wie Typ-I-Diabetes, herkömmliche organspezifische Autoimmunerkrankungen, neurologische Erkrankungen, rheumatische Erkrankungen, Psoriasis, Bindegewebeerkrankungen, Autoimmunzytopenien und andere Autoimmunerkrankungen. Solche herkömmliche organspezifische Autoimmunerkrankungen können Thyroiditis (Graves- & Hashimoto-Thyroiditis), Gastritis, Adrenalitis (Addison-A.), Eierstockentzündung, primäre biliäre Leberzirrhose, Myasthenia gravis, Gonadenversagen, Hyperparathyroidismus, Alopecia, Malabsorptionssyndrom, perniziöse Anämie, Hepatitis, Anti-Rezeptor-Antikörper-Erkrankungen und Vitiligo umfassen. Solche neurologischen Erkrankungen können Schizophrenie, Alzheimer-Krankheit, Depression, Hypopituitarismus, Diabetes insipidus, Sicca-Syndrom und multiple Sklerose umfassen. Solche rheumatischen Erkrankungen/Bindegewebeerkrankungen können rheumatoide Arthritis, systemischen Lupus erythematodes (SLE) oder Lupus, Sklerodermie, Polymyositis, Reizdarmsyndrom, Dermatomyositis, Colitis ulcerosa, Crohn-Krankheit, Vascularitis, Arthritis psoriatica, Dermatitis psoriatica exfoliativa, Pemphigus vulgaris Sjögren-Syndrom umfassen. Andere verwandte Autoimmunerkrankungen können autoimmune Uvoretinitis, Glomerulonephritis, Kardiotomiesyndrom nach einem Myokardinfarkt, Lungenhämosiderose, Amyloidose, Sarkoidose, Stomatitis aphthosa und andere, mit dem Immunsystem in Verbindung stehende Erkrankungen umfassen, wie sie hierin dargestellt und auf verwandten Gebieten bekannt sind.

[0062] Während jeglicher geeignete Träger, der durchschnittlichen Fachleuten bekannt ist, in den Vakzinenzusammensetzungen dieser Erfindung verwendet werden können, variiert der Typ des Trägers typischerweise je nach der erwünschten Art der Verabreichung. Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können für jegliche geeignete Art der Verabreichung formuliert werden, einschließlich beispielsweise topischer, oraler, nasaler, intravenöser, intrakranieller, intraperitonealer, intradermaler, subkutaner oder intramuskulärer Verabreichung. Für parenterale Verabreichung, wie beispielsweise subkutane Injektion, umfasst der Träger häufig Wasser, Kochsalzlösung, Alkohol, ein Fett, ein Wachs oder einen Puffer. Für orale Verabreichung werden die oben genannten Träger häufig verwendet, oder ein fester Träger wie Mannit, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Talk, Cellulose, Glucose, Saccharose und Magnesiumcarbonat können auch verwendet werden. Biologisch abbaubare Mikroperlen (z.B. Polylactatpolyglycolat) können auch als Träger für die Zusammensetzungen dieser Erfindung verwendet werden. Geeignete, biologisch abbaubare Mikroperlen sind beispielsweise in den US-Patenten Nr. 4.897.268; 5.075.109; 5.928.647; 5.811.128; 5.820.883; 5.853.763; 5.814.344 und 5.942.252 offenbart, deren Offenbarungen hierin in ihrer Gesamtheit durch Verweis aufgenom-

men sind. Modifizierte Hepatitis-B-Kernprotein-Trägersysteme sind auch nützlich, wie beispielsweise jene, die in der WO 99/40934 und den darin zitierten Verweisen beschrieben werden, die alle hierin durch Verweis aufgenommen sind. Auch kann ein Träger verwendet werden, der Partikel-Protein-Komplexe umfasst, wie beispielsweise jene, die im US-Patent Nr. 5.928.647 beschrieben werden, dessen Offenbarung hierin in ihrer Gesamtheit durch Verweis aufgenommen ist, die in der Lage sind, auf Klasse I eingeschränkte, zytotoxische T-Lymphozytenantworten in einem Wirt zu induzieren.

[0063] In einer veranschaulichenden Ausführungsform werden die Vakzinenformulierungen an die Schleimhaut, insbesondere die Mundhöhle, und vorzugsweise an einer sublingualen Stelle, verabreicht, um eine Immunantwort hervorzurufen. Verabreichung in die Mundhöhle kann in zahlreichen Fällen gegenüber herkömmlicher parenteraler Zufuhr aufgrund der einfachen und praktischen Verabreichung, die diese nicht invasiven Verabreichungsverfahren ermöglichen, bevorzugt werden. Darüber hinaus stellt dieser Ansatz weiters ein Mittel zur Auslösung von Schleimhautimmunität bereit, was mittels herkömmlicher parenteraler Zufuhr häufig nur schwer erreicht wird und was Schutz vor in der Luft enthaltenen Pathogenen und/oder Allergenen bieten kann. Ein weiterer Vorteil von Verabreichung in die Mundhöhle ist, dass die Verabreichung durch sublinguale Vakzinenzufuhr für den Patienten angenehmer gestaltet werden kann, insbesondere im Fall von Anwendungen bei Kindern oder von Anwendungen, die üblicherweise zahlreiche Injektionen über einen längeren Zeitraum hinweg erfordern, wie beispielsweise bei Allergiedesensibilisierungstherapien.

[0064] Die Vakzinenzusammensetzungen können auch Puffer (z.B. neutral gepufferte Kochsalzlösung, phosphatgepufferte Kochsalzlösung oder Phosphatpuffer mit oder ohne Kochsalzlösung), Kohlenhydrate (z.B. Glucose, Mannose, Saccharose oder Dextrane), Mannit, Proteine, Polypeptide oder Aminosäuren wie Glycin, Antioxidanzien, Bakteriostatika, Chelatbildner wie EDTA oder Glutathion, Adjuvanzien (z.B. Aluminiumhydroxid), gelöste Stoffe, die die Formulierung mit dem Blut eines Rezipienten isotonisch, hypotonisch oder schwach hypertonisch machen, Suspensionsmittel, Verdickungsmittel und oder Konservierungsmittel umfassen. Alternativ dazu können die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung als Lyophilisat formuliert werden. Die Zusammensetzungen können auch unter Verwendung von durchwegs bekannten Verfahren in Liposomen eingekapselt werden.

[0065] Daher sind in einer Ausführungsform die Vakzinenzusammensetzungen wässrige Formulierungen, die eine wirksame Menge an einem oder mehreren Tensiden umfassen. Beispielsweise kann die Zusammensetzung in Form einer Mizellendispersion vorliegen, die zumindest ein geeignetes Tensid, z.B. ein Phospholipidtensid, umfasst. Veranschaulichende Beispiele für Phospholipide umfassen Diacylphosphatidylglycerine, wie Dimyristoylphsophatidylglycerin (DPMG), Dipalmitoylphosphatidylglycerin (DPPG) und Distearoylphosphatidylglycerin (DSPG), Diacylphosphatidylcholine, wie Dimyristoylphosphatidylcholin (DPMC), Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Distearoylphosphatidylcholin (DSPC); Diacylphosphatidsäuren wie Dimyristoylphosphatidsäure (DPMA), Dipalmitoylphosphatidsäure (DPPA), Distearoylphosphatidsäure (DSPA); und Diacylphosphatidylehtanolamine wie Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DPME), Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE) und Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE).

[0066] Typischerweise liegt das Tensid:Adjuvans-Verhältnis in einer wässrigen Formulierung bei etwa 10:1 bis etwa 1:10, noch typischer 5:1 bis etwa 1:5, wobei jedoch jegliche wirksame Menge an Tensid in einer wässrigen Formulierung verwendet werden kann, wenn sie den spezifischen beabsichtigten Zielen bestmöglich dient.

[0067] In einer anderen Ausführungsform ist die Zusammensetzung eine Emulsion, wie beispielsweise eine Wasser-in-Öl-Emulsion oder eine Öl-in-Wasser-Emulsion. Solche Emulsionen sind Fachleuten auf diesem Gebiet allgemein bekannt.

[0068] Das Adjuvanssystem der vorliegenden Erfindung kann als eigenständiges Adjuvanssystem verwendet werden, oder es kann alternativ dazu zusammen mit anderen Adjuvanzien oder Immuneffektoren verabreicht werden. Solche Adjuvanzien können beispielsweise ölbasierte Adjuvanzien (z.B. komplettes und inkomplettes Freundsches Adjuvans), Liposomen, Mineralsalze (z.B. $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, Siliciumdioxid, Alaun, $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, Kaolin und Kohlenstoff), Polynucleotide (z.B. Poly-IC und Poly-AU-Säuren), Polymere (z.B. nichtionische Blockpolymere, Polyphosphazene, Cyanoacrylate, Polymerase-(DL-lactid-co-glycosid), unter anderem, und bestimmte natürliche Substanzen (z.B. Lipid A und seine Derivate, Wachs D aus Mycobacterium tuberculosis sowie Substanzen, die in Corynebacterium parvum, Bordetella pertussis und Mitglieder der Gattung Brucella zu finden sind, Rinderserumalbumin, Diphtherietoxoid, Tetanustoxoid, Edestin, Schlüssellochnapfschnecken-Hämocyanin, Pseudomonas-Toxin A, Choleragenoid, Choleratoxin, Pertussistoxin, Virusproteine und eukaryotische Proteine wie Interferone, Interleukine oder Tumornekrosefaktor umfas-

sen. Solche Proteine können aus natürlichen oder rekombinanten Quellen gemäß Verfahren, die Fachleuten bekannt sind, gewonnen werden. Wenn es aus rekombinanten Quellen gewonnen wird, kann das Adjuvans ein Proteinfragment umfassen, das zumindest den immunstimulierenden Teil des Moleküls umfasst. Andere bekannte, immunstimulierende Makromoleküle, die bei der praktischen Durchführung der Erfindung verwendet werden können, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Polysaccharide, tRNA, nicht-metabolisierte synthetische Polymere wie Polyvinylamin, Polymethacrylsäure, Polyvinylpyrrolidon, gemischte Polykondensate (mit relativ hohem Molekulargewicht) von 4',4-Diaminodiphenylmethan-3,3'-dicarbonsäure und 4-Nitro-2-aminobenzoesäure (siehe M. Sela, Science 166, 1365–1374 (1969)) oder Glykolipide, Lipide oder Kohlenhydrate.

[0069] In einer Ausführungsform ist das Adjuvanssystem vorzugsweise so gestaltet, dass es eine Immunantwort vorwiegend vom Th1-Typ induziert. Hohe Konzentrationen von Th1-Typ-Cytokinen (z.B. IFN-γ, TNFα, IL-2 und IL-12) neigen dazu, die Induktion von zellvermittelten Immunantworten auf ein verabreichtes Antigen zu begünstigen. Dahingegen neigen hohe Konzentration von Th2-Typ-Cytokinen (z.B. IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10) dazu, die Induktion von humoralen Immunantworten zu begünstigen. Nach der Verabreichung einer Vakzine wie hierin bereitgestellt sorgt der Patient für eine Immunantwort, die TH1- und TH2-Typ-Antworten umfasst. Bei einer bevorzugten Ausführungsform, in der eine Antwort vorwiegend vom Th1-Typ ist, steigt die Konzentration an Th1-Typ-Cytokinen stärker als die Konzentration an Th2-Typ-Cytokinen. Die Konzentrationen dieser Cytokine können leicht unter Verwendung von Standardtests bewertet werden. Einen Überblick über die Cytokinfamilien stellen Mosmann & Coffman in: Ann. Rev. Immunol. 7, 145–173 (1989), bereit.

[0070] Zusätzliche Adjuvanzien zur Verwendung beim Hervorrufen einer vorwiegenden Th1-Typ-Antwort umfassen beispielsweise eine Kombination aus Monophosphoryllipid A, wie 3-de-O-acetyliertes Monophosphoryllipid A (3D-MPL), mit einem Aluminiumsalz. MPL-Adjuvanzien sind bei Corixa Corporation (Seattle, WA; siehe die US-Patente Nr. 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 und 4.912.094) erhältlich. CpG-hältige Oligonucleotide (in denen das CpG-Dinucleotid nicht methyliert ist) induzieren auch vorwiegend eine Th1-Antwort. Solche Oligonucleotide sind durchwegs bekannt und werden beispielsweise in der WO 96/02555, der WO 99/33488 und in den US-Patenten Nr. 6.008.200 und 5.856.462 beschrieben. Immunstimulierende DNA-Sequenzen werden ebenfalls beschrieben, beispielsweise von Sato et al., Science 273, 352 (1996). Andere veranschaulichende Adjuvanzien, die in die Vakzinenzusammensetzungen eingebunden werden können, umfassen Montanide ISA 720 (Seppic, Frankreich), SAF (Chiron, Kalifornien, Vereinigte Staaten), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), Detox™-Adjuvans (Corixa, Hamilton, MT).

[0071] Die hierin beschriebenen Zusammensetzungen können als Teil einer Retard-Formulierung (z.B. einer Formulierung wie einer Kapsel, eines Schaums oder Gels (zusammengesetzt aus Polysacchariden beispielsweise), die eine langsame Freisetzung der Verbindung nach der Verabreichung bewirkt) verabreicht werden. Solche Formulierungen können allgemein unter Verwendung bekannter Verfahren hergestellt (siehe z.B. Coombes et al., Vaccine 14, 1429–1438 (1996)) und durch beispielsweise orale, rektale oder subkutane Zufuhr oder durch Zufuhr an der erwünschten Targetstelle verabreicht werden. Retard-Formulierungen können ein Polypeptid, Polynucleotid oder einen Antikörper, in einer Trägermatrix dispergiert und/oder innerhalb eines Reservoirs, das von einer freisetzungssteuernden Membran umgeben ist, enthalten, umfassen. Träger zur Verwendung in solchen Formulierungen sind bioverträglich und können auch biologisch abbaubar sein; vorzugsweise stellt die Formulierung ein relativ konstantes Niveau an aktiver Komponentenfreisetzung bereit. Solche Träger umfassen Mikropartikel von Poly(lactid-co-glykolid), Polyacrylat, Latex, Stärke, Cellulose, Dextran und dergleichen. Andere Träger, die zu verzögerter Freisetzung führen, umfassen supramolekulare Biovektoren, die einen nicht-flüssigen, hydrophilen Kern (z.B. ein vernetztes Polysaccharid oder Oligosaccharid) und, gegebenenfalls, eine äußere Schicht, die eine amphipathische Verbindung wie Phospholipid enthält, umfassen (siehe z.B. das US-Patent Nr. 5.151.254 und die PCT-Anmeldungen WO 94/20078, WO 94/23701 und WO 96/06638). Die Menge an aktiver Verbindung, die in einer Retard-Formulierung enthalten ist, variiert je nach der Stelle der Zufuhr, der Geschwindigkeit und erwarteten Dauer der Freisetzung und der Art des zu behandelnden Leidens oder des Leidens, dem es vorzukehren gilt.

[0072] Jedes beliebige der bekannten Zufuhrvehikel kann in pharmazeutischen Zusammensetzungen und Vakzinen verwendet werden, um die Entstehung einer Antigen-spezifischen Immunantwort, die sich auf Zellen richtet, zu erleichtern. Zufuhrvehikel umfassen Antigen-präsentierende Zellen (APCs), wie dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen, Monozyten und andere Zellen, die bearbeitet werden können, um effiziente APCs zu bilden. Solche Zellen können, müssen jedoch nicht gentechnisch modifiziert werden, um die Fähigkeit, das Antigen zu präsentieren, zu steigern, um Aktivierung und/oder Aufrechterhaltung der T-Zell-Antwort zu verbessern, um Anti-Target-Wirkungen an sich zu zeigen und/oder um immunologisch für den Empfänger verträglich zu sein (d.h. der HLA-Haplotyp stimmt überein). APCs können allgemein aus jedem beliebigen aus zahlreichen verschiedenen, biologischen Flüssigkeiten und Organen isoliert werden, einschließlich Tumor- und peritumo-

rale Gewebe, und können autologe, allogene, syngene oder xenogene Zellen sein.

[0073] Bestimmte bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung verwenden dendritische Zellen oder Vorläufer davon als Antigen-präsentierende Zellen. Dendritische Zellen sind äußerst potente APCs (Banchereau & Steinuran, Nature 392, 245–251 (1998)), und es wurde für sie gezeigt, dass sie als ein physiologisches Adjuvans zum Hervorrufen von prophylaktischer oder therapeutischer Antitumorimmunität wirksam sind (siehe Timmerman & Levy, Ann. Rev. Med. 50, 507–529 (1999)). Im Allgemeinen können dendritische Zellen basierend auf ihrer typischen Form (sternförmig in situ, mit ausgeprägten zytoplasmatischen Fortsätzen (Dendriten) in vitro), ihrer Fähigkeit, Antigene mit hoher Wirksamkeit aufzunehmen, zu verarbeiten und zu präsentieren, und ihrer Fähigkeit, naive T-Zell-Antworten zu aktivieren, identifiziert werden. Dendritische Zellen können natürlich gentechnisch so verändert werden, dass sie spezifische Zelloberflächenrezeptoren oder Liganden exprimieren, die üblicherweise nicht an dendritischen Zellen in vivo oder ex vivo zu finden sind, und solche modifizierte dendritische Zellen werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen. Als eine Alternative zu dendritischen Zellen können sekretierte Vesikel, Antigen-beladene dendritische Zellen (Exosomen genannt) in einer Vakzine verwendet werden (siehe Zitvogel et al., Nature Med. 4, 594–600 (1998)).

[0074] Dendritische Zellen und Vorläufer können aus peripherem Blut, Knochenmark, tumorinfiltrierenden Zellen, peritumorales Gewebe infiltrierenden Zellen, Lymphknoten, Milz, Haut, Nabelschnurblut oder jeglichem anderen, geeigneten Gewebe oder Fluid gewonnen werden. Dendritische Zellen können beispielsweise ex vivo durch Zusetzen einer Kombination von Cytokinen wie GM-CSF, IL-4, IL-13 und/oder TNFα zu Kulturen von Monozyten, die aus peripherem Blut abgenommen werden, differenziert werden. Alternativ dazu können CD34-positive Zellen, die aus peripherem Blut, Nabelschnurblut oder Knochenmark abgenommen wurden, durch Zusetzen von Kombinationen aus GM-CSF, IL-2, TNFα, CD40-Ligand, LPS, flt3-Ligand und/oder (einer) anderen Verbindung(en), die Differenzierung, Reifung und Proliferation dendritischer Zellen induzieren, zum Kulturmedium zu dendritischen Zellen differenziert werden.

[0075] Dendritische Zellen werden günstigerweise den Gruppen "unreife" und "reife" Zellen zugeordnet, was eine einfache Weise bietet, zwischen zwei gut charakterisierten Phänotypen zu unterscheiden. Diese Nomenklatur sollte jedoch nicht so verstanden werden, dass sie alle möglichen Zwischenstadien der Differenzierung ausschließt. Unreife dendritische Zellen sind als APC mit einer guten Fähigkeit zur Antigen-Aufnahme und -Verarbeitung charakterisiert, was mit dem hohen Expressionsniveau von Fcγ-Rezeptor und Mannose-Rezeptor korreliert. Der reife Phänotyp ist typischerweise durch eine geringere Expression dieser Marker gekennzeichnet, jedoch durch ein hohes Expressionsniveau von Zelloberflächenmolekülen, die für T-Zell-Aktivierung verantwortlich sind, wie beispielsweise Klasse-I- und Klasse-II-MHC, Adhäsionsmolekülen (z.B. CD54 und CD11) und co-stimulierenden Molekülen (z.B. CD40, CD80, CD86 und 4-1BB).

[0076] APCs können im Allgemeinen mit einem Polynucleotid transfiziert werden, das für ein Antigen-Polypeptid (oder einen Teil oder eine Variante davon) kodiert, sodass das Antigen-Polypeptid, oder ein immunogener Teil davon, an der Zelloberfläche exprimiert wird. Solche Transfektion kann ex vivo stattfinden, und eine Zusammensetzung oder Vakzine, die solche transfizierte Zellen und das hierin beschriebene Adjuvans umfasst, können dann für therapeutische Zwecke verwendet werden.

[0077] Alternativ dazu kann ein Genzufuhrvehikel, das auf eine dendritische Zelle oder eine andere, Antigen-präsentierende Zelle gerichtet ist, einem Patienten verabreicht werden, was zur Transfektion führt, die in vivo eintritt. In-vivo- und Ex-vivo-Transfektion von dendritischen Zellen kann beispielsweise unter Verwendung von auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren, wie jenen, die in der WO 97/24447 beschrieben werden, oder unter Verwendung des Genkanonenansatzes, der von Mahvi et al., Immunology and Cell Biology 75, 456–460 (1997)), beschrieben wird, erfolgen. Antigen-Laden auf dendritische Zellen kann durch Inkubieren von dendritischen Zellen oder Vorläuferzellen mit dem Antigen-Polypeptid, DNA (nackt oder innerhalb eines Plasmidvektors) oder RNA; oder mit Antigen-exprimierendem, rekombinanten Bakterien oder Viren (z.B. Vakzinia-, Geflügelpocken-, Adenovirus- oder Lentivirusvektoren) erreicht werden. Vor dem Laden kann das Polypeptid kovalent an einen immunologischen Partner konjugiert werden, der T-Zell-Hilfe bereitstellt (z.B. ein Trägermolekül). Alternativ dazu kann eine dendritische Zelle mit einem nicht-konjugierten, immunologischen Partner, separat oder in Gegenwart des Polypeptid, gepulst werden.

Behandlung von Stickstoffoxid-assoziierten Störungen

[0078] In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verbindungen oder Zusammensetzungen zur Behandlung von Erkrankungen oder Leiden, die durch Stickstoffoxid vermittelt werden, insbesondere Ischämie und Reperfusionsverletzung, bereit. Es ist allgemein anerkannt, dass Induktoren von iNOS-Gentranskription

und Proteinsynthese entzündungsfördernd und daher in gewisser Weise "toxisch" sind und von Tieren und Menschen nur schlecht toleriert werden. Endotoxin (LPS) und entzündungsfördernde Cytokine wie IL-1, TNF-α und IFN-γ sind bekannte Induktoren von iNOS. Alle sind inhärent toxisch und in der Lage, eine systemische Entzündungsreaktion, Atemnotsyndrom bei Erwachsenen (ARDS), mehrfaches Organversagen und Kardiovaskulärversagen zu induzieren, wenn sie Tieren verabreicht werden.

[0079] Eine Untersuchung der kardioprotektiven Aktivität von MPL®-Immunstimulans zeigte, dass die Induktion von Stickstoffoxidsynthasen (iNOS) für die verzögerte kardioprotektive Wirkung der Verbindung wichtig ist. Darüber hinaus ist Stickstoffoxid- (NO-) Signalgebung, wahrscheinlich durch konstitutive Pools von NOS, für die akute kardioprotektiven Wirkung der Verbindung wichtig. In Anbetracht der verbleibenden Endotoxin-ähnlichen Aktivität von MPL®-Immunstimulans ist es nicht überraschend, dass die Verbindung in der Lage sein könnte, Stickstoffoxidsignalgebung induzieren könnte. Darüber hinaus wurde Stickstoffoxidsignalgebung als ein möglicher Stoffwechselweg vorgeschlagen, über den ischämische Vorbehandlung zu kardioprotektiver Wirkung führt. Diese Beobachtung unterstützt in Verbindung mit der Tatsache, dass Stickstoffoxiddonoren kardioprotektiv sind, die Erwägung des NOS/NO-Stoffwechselweges als Weg für kardioprotektive Wirkung durch MPL®-Immunstimulans noch stärker.

[0080] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung, einschließlich RC-553, sind zur Behandlung von Erkrankungen oder Leiden geeignet, die durch Stickstoffoxid moduliert oder gelindert werden, insbesondere von Ischämie und Reperfusionsverletzung (siehe die US-Patentanmeldung der Serien-Nr. 09/808669, eingereicht am 14. März 2001, in der eine Beschreibung der kardioprotektiven Eigenschaften von Aminoalkylglucosaminidphosphaten und Verfahren zum Testen auf kardioprotektive Eigenschaften bereitgestellt wird).

BEISPIELE

[0081] Die folgenden Beispiele werden als Veranschaulichung und nicht als Einschränkung der beanspruchten Erfindung bereitgestellt.

Beispiel 1 – Herstellung von RC-553

[0082] Herstellung von N-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoyl]-(S)-2-pyrrolidinomethyl-2-desoxy-4-O-phosphono-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-β-D-glucopyranosidtriethylammoniumsalz (Formel (I), $R^1=R^2=R^3=C_{13}H_{27}CO$, X=Y=O, n=1, m=2, p=q=0, $R^5=R^6=H$, $R^4=PO_3H_2$; Formel (II) $R^1=R^2=R^3=C^{13}H^{27}CO$); RC-553.

(1) Zu einer Lösung von 2-Desoxy-4-O-diphenylphosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-6-O-(2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethoxycarbonyl)-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosylbromid (1,05 g, 0,81 mmol) in trockenem 1,2-Dichlorethan (10 ml) wurden 4-Å-Molekularsieb (0,5 g), wasserfreies $CaSO_4$ (2,2 g, 16 mmol) und N-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoyl]-(S)-2-pyrrolidinomethanol (0,40 g, 0,75 mmol) zugesetzt. Das resultierende Gemisch wurde 1 h lang bei Raumtemperatur gerührt, mit $Hg(CN)_2$ (1,02 g, 4,05 mmol) behandelt und 16 h lang im Dunklen rückflusserhitzt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde mit CH_2Cl_2 verdünnt und filtriert. Das Filtrat wurde mit 1 N wässrigem KI gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4) und eingeengt. Flash-Chromatographie über Kieselgel (Gradientenelution, 15 → 20 % EtOAc/Hexan) ergab 0,605 g (43 %) N-((R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoyl]-(S)-2-pyrrolidinomethyl-2-desoxy-4-O-diphenylphosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-6-O-(2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethoxycarbonyl)-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosid in Form eines amorphen Feststoffs.
(2) Eine Lösung der in (1) oben hergestellten Verbindung (0,50 g, 0,29 mmol) in AcOH (10 ml) bei 60 °C wurde mit Zinkstaub (0,98 g, 15 mmol) in drei gleichen Teilen über eine Zeitspanne von 1 h behandelt. Das gekühlte Reaktionsgemisch wurde beschallt, über einen Celite-Polster filtriert und eingeengt. Der resultierende Rückstand wurde zwischen CH_2Cl_2 und gesättigtes wässriges $NaHCO_3$ verteilt, und die Phasen wurden getrennt. Die organische Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4) und eingeengt. Eine Lösung des gewonnenen rohen Aminoalkohols und von (R)-3-Tetradecanoyloxytetradecansäure (0,155 g, 0,34 mmol) in CH_2Cl_2 (3,5 ml) wurde mit pulverförmigem 4-Å-Molekularsieb (0,25 g) 0,5 h lang gerührt und anschließend mit 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin (0,11 g, 0,44 mmol) behandelt. Das resultierende Gemisch wurde bei Raumtemperatur 8 h lang gerührt, durch Celite filtriert und eingeengt. Flash-Chromatographie über Kieselgel mit 50 % EtOAc/Hexan ergab 0,355 g (68 %) N-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoyl]-(S)-2-pyrrolidinomethyl-2-desoxy-4-O-diphenylphosphono-2-[(R)

-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-β-D-glucopyranosid in Form eines farblosen Sirups.

(3) Eine Lösung der unter (2) oben hergestellten Verbindung (0,300 g, 0,166 mmol) in einem Gemisch aus AcOH (1 ml) und Tetrahydrofuran (9 ml) wurde in Gegenwart von PtO_2 (0,15 g) bei Raumtemperatur und 70 psi 18 h lang hydriert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 2:1 $CHCl_3$-MeOH (50 ml) verdünnt und kurz beschallt. Der Katalysator wurde gesammelt und mit 2:1 $CHCl_3$-MeOH gewaschen, und das kombinierte Filtrat und die Waschlösungen wurden eingeengt. Flash-Chromatographie über Kieselgel mit $CHCl_3$-MeOH-H_2O-Et_3N (90:10:0,5:0,5) ergab ein teilweise gereinigtes Produkt, das in eiskaltem 2:1 $CHCl_3$-MeOH (30 ml) gelöst und mit eiskalter 0,1 N wässriger HCl (12 ml) gewaschen wurde. Die organische Phase wurde abfiltriert und aus 2 % wässrigem Et_3N (5 ml, pyrogenfrei) lyophilisiert, um 0,228 g (79 %) N-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoyl]-(S)-2-pyrrolidinomethyl-2-desoxy-4-O-phosphono-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-β-D-glucopyranosidtriethylammoniumsalz in Form eines farblosen Pulvers zu ergeben: Fp.: 67–70 °C, IR (Film) 3306, 2955, 2923, 2853, 1736, 1732, 1644, 1548, 1466, 1378, 1245, 1177, 1110, 1053, 844 cm^{-1}; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$-CD_3OD) δ 0.88 (m,18 H), 1.0-1.2.05 (mH), 2.20-2.70 (m, 12 H), 3.06 (q, 6 H, J = 7.2 Hz), 3.3-325 (mH), 4.52 (d, 1 H, J = 8 Hz), 5.05-5.28 (m, 4 H), 7.44 (d, 1 H, J = 9 Hz); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 173.3, 173.0, 170.3, 169.6,168.6, 101.8, 100.4, 75.8, 72.5, 72.4, 70.9, 70.8, 70.3, 70.2, 69.9, 69.3, 67.9, 66.6, 56.5, 56.3, 54.5, 47.4, 45.8, 44.6, 41.4, 41.0, 39.7, 39.2, 39.0, 34.5, 34.3, 34.1, 32.0, 29.7, 29.4, 28.1, 27.3, 25.7, 25.3, 25.2, 25.1, 24.0, 22.7, 21.6, 14.1, 8.6.

Anal. ber. für $C_{101}H_{194}N_3O_{17}P{\cdot}H_2O$: C, 68.47; H, 11.15;N, 2.37; P, 1.75. Gef.: C, 68.79; H, 11.00; N, 2.24; P,1.97.

BEISPIELE 2–6

[0083] Das primäre Ziel der Beispiele 2–6 war zu bestimmen, ob RC-553 minimale Pyrogenität fördern und Adjuvansaktivität vermitteln konnte, wenn es mit Vakzinenantigenen formuliert wurde.

Beispiel 2 – Adjuvansaktivität gegenüber HBsAg (Hepatitis-B-Oberflächenantigen)

[0084] Gruppen von BALB/c-Mäusen (Jackson Laboratories Bar Harbor, Maine), 6–8 Wochen alt, wurden subkutan 2 µg HBsAg (Laboratorio Pablo Cassara) ± 20 µg Adjuvans (MPL®-Immunstimulans oder RC-553) an Tag 0 und Tag 21 injiziert. Vakzinen wurden durch Vermischen der Adjuvans-hältigen TEoA- (Triethanolamin-) Formulierungen mit rekombinantem HBsAg hergestellt. Titer gegen HBsAg wurden mittels ELISA aus gesammelten Seren (5 Mäuse/Gruppe), die 21 Tage nach der zweiten Impfung abgenommen wurden, bestimmt (Tabelle 1). Die Nichtimmun-Kontrollen wurden nicht geimpft.

[0085] Serumtiter aus Mäusen, die RC-553 erhielten, wiesen signifikant höhere Anti-HBsAg-Antworten auf als Kontrollseren, die Antigen alleine erhielten (Tabelle 1). Besonders bemerkenswert war die Steigerung der Titer für die IgG2a- und IgG2b-Isotopen. Diese Titer waren mit jenen gleichwertig, die von Kontrollgruppen, die MPL®-Immunstimulans erhielten, exprimiert wurden.

Tabelle 1. Vergleich von schwach pyrogenen Adjuvanzien mit HBsAg

Gruppen	Pyrogenität[a]	Serumtiter			
		IgG	*IgG1*	*IgG2a*	*IgG2b*
Nichtimmun	—	<100	<100	<100	<100
TEoA-Vehikel	N.T.	51,200	102,400	25,600	1600
MPL®-TEoA	2-3	409,600	204,800	204,800	51,200
RC-553-TEoA	0.3	409,600	204,800	409,600	51,200

a. Die Daten zur Pyrogenität zeigen den gesamten Anstieg von °C bei 3 Kaninchen nach i.v. Verabreichung einer 10-Eig/kg-Dosis. Im Pyrogentest wurden die Verbindungen in 10 % EtOH/WFI (USP-Wasser zur Injektion) bei 100 µg/ml solubilisiert und dann mit 5 % Dextrose in Wasser verdünnt. N.T. bedeutet, dass die Verbindung nicht getestet wurde.

Beispiel 3 – Adjuvansaktivität gegenüber Hämagglutininprotein in FluZone-Influenzavakzine

[0086] Gruppen von BALB/c-Mäusen (Jackson Laboratories Bar Harbor, Maine), 6–8 Wochen alt, wurden subkutan 0,2 µg Hämagglutininprotein in FluZone-Influenzavakzine (Connaught Laboratories, Swiftwater, PA) ± 20 µg Adjuvans (MPL®-Immunstimulans oder RC-553) an Tag 0 und Tag 14 injiziert. Titer gegen FluZone wur-

den mittels FluZone-ELISA aus gesammelten Seren von 5 Mäusen, die 14 Tage nach der zweiten Impfung abgenommen wurden, bestimmt (Tabelle 2). Die Nichtimmun-Kontrollen wurden nicht geimpft. Die anfängliche verwendete Verdünnung der Seren aus den Testgruppen belief sich auf 1:1.600.

[0087] Die Resultate waren jenen aus dem vorangehenden Beispiel ähnlich. Wiederum zeigte RC-553 signifikant höhere Titer als Kontrollseren, die Antigen alleine erhielten (Tabelle 2). Die Steigerung der Titer zeigte sich auch in gesteigerten IgG2a- und IgG2b-Antworten. Diese Titer waren mit jenen gleichwertig, die von Kontrollgruppen, die MPL®-Immunstimulans erhielten, exprimiert wurden.

Tabelle 2. Vergleich von schwach pyrogenen Adjuvanzien mit einer Influenzavakzine

Gruppen	Pyrogenität[a]	Serumtiter			
		IgG	*IgG1*	*IgG2a*	*IgG2b*
Nichtimmun	—	<100	<100	<100	<100
TEoA-Vehikel	N.T.	12,800	51,200	1600	<1600
MPL®-TEoA	2-3	102,400	102,400	25,600	12,800
RC-553-TEoA	0.3	51,200	102,400	25,600	6400

a. Die Daten zur Pyrogenität zeigen den gesamten Anstieg von °C bei 3 Kaninchen nach i.v. Verabreichung einer 10-µg/kg-Dosis. Im Pyrogentest wurden die Verbindungen in 10 % EtOH/WFI (USP-Wasser zur Injektion) bei 100 µg/ml solubilisiert und dann mit 5 % Dextrose in Wasser verdünnt N.T. bedeutet, dass die Verbindung nicht getestet wurde.

Beispiel 4 – Adjuvansaktivität gegenüber HBsAg

[0088] Gruppen von BALB/c-Mäusen wurden subkutan 2,0 µg HBsAg (Rhein Americana & Rhein Biotech) ± 25 µg Adjuvans (MPL®-Immunstimulans oder RC-553) an Tag 0 und Tag 21 injiziert. IgG1- und IgG2a-Isotop-Titer gegen HBsAg wurden mittels ELISA aus gesammelten Seren, die 21 Tage nach der zweiten Impfung abgenommen wurden, bestimmt (Tabelle 3). Die Nichtimmun-Kontrollen wurden nicht geimpft. In diesem Versuch vermittelte RC-553 im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Antigen in PBS erhielt, erhöhte Titer. RC-553 stimulierte Titer, die mit den positiven Kontrollen, MPL®-Immunstimulans, gleichwertig waren (Tabelle 3).

Tabelle 3. Vergleich von schwach pyrogenen Adjuvanzien mit HBsAg

Gruppen	Pyrogenität[a]	Serumtiter	
		IgG1	*IgG2a*
Nichtimmun	—	<100	<100
PBS-Kontrolle	N.T.	64,000	4000
MPL®-TEoA	2-3	128,000	1,024,000
RC-553-TEoA	0.3	32,000	2,048,000

a. Die Daten zur Pyrogenität zeigen den gesamten Anstieg von °C bei 3 Kaninchen nach i.v. Verabreichung einer 10-µg/kg-Dosis. Im Pyrogentest wurden die Verbindungen in 10 % EtOH/WFI (USP-Wasser zur Injektion) bei 100 µg/ml solubilisiert und dann mit 5 % Dextrose in Wasser verdünnt. N.T. bedeutet, dass die Verbindung nicht getestet wurde.

Beispiel 5 – CTL-Aktivität wird mit RC-553 gegenüber HBsAg-immunisierten Mäusen gesteigert

[0089] Manche Mäuse aus jeder Gruppe aus Beispiel 4 wurden auch als Spender von Milzzellen verwendet, um CTL-Aktivität zu bewerten. Auf HBsAg gerichtete, spezifische Lyse wurde in einem Standard-4h-^{51}Cr-Freisetzungstest (Moore et al., Cell 55, 777–785 (1988)) bewertet. Einzelne Zellsuspensionen wurden aus den Milzen von Mäusen 9 Tage nach der Impfung hergestellt. Die Milzzellen wurden mit tris-gepuffertem NH_4Cl behandelt, um Erythrozyten zu entfernen, und in einer Konzentration von 7,5 × 10^6/ml in RPMI/10 % FCS, ergänzt mit 5 mM HEPES, 4 mM L-Glutamin, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol und Antibiotika, resuspendiert. Ein synthetisches Peptid, das ein bekanntes L^d-eingeschränktes CTL-Epitop der MHC-Klasse I (IPQSLDSWWTSL) aufweist, wurde zu den Zellen in einer Endkonzentration von 75 nM zugesetzt. Nach einer viertägigen Inkubation wurden die Zellen gewonnen und auf CTL-Aktivität bewertet. Spezifische Tötung wurde gegen ^{51}Cr-markierte, transfizierte P815S-Zellen, die das L^d-eingeschränkte Epitop exprimierten, gemessen. Die Targetzellen waren

eine transfizierte P815-Zelllinie (P815S), die das L^d-eingeschränkte CTL-Epitop exprimierten. Nicht-spezifische Lyse betrug <10 % bei einem E:T-Verhältnis von 50:1 gegen P815-Target (Tabelle 4). Im Gegensatz zur Antikörperreaktion stimulierte RC-553, im Vergleich zu den "Nur-Antigen-Kontrollen", signifikant höhere Niveaus an CTL-Aktivität (Tabelle 4).

Tabelle 4. Vergleich von schwach pyrogenen Adjuvanzien mit HBsAg

		Prozent Spezifische Tötung (Effektor: Target-Verhältnis)			
Gruppen	Pyrogenität[a]	*50:1*	*25:1*	*12.5:1*	*6.25:1*
Nichtimmun	---	6	3	1	0
PBS	N.T.	29	20	11	7
MPL®-TEoA	2-3	80	71	47	32
RC-553-TEoA	0.3	85	77	53	37

a. Die Daten zur Pyrogenität zeigen den gesamten Anstieg von °C bei 3 Kaninchen nach i.v. Verabreichung einer 10-µg/kg-Dosis. Im Pyrogentest wurden die Verbindungen in 10% EtOH/WFI (USP-Wasser zur Injektion) bei 100 µg/ml solubilisiert und dann mit 5 % Dextrose in Wasser verdünnt

N.T. bedeutet, dass die Verbindung nicht getestet wurde.

Beispiel 6 – Ex-vivo-Cytokininduktion durch RC-553

[0090] Die Wirkung von RC-553 auf die Entwicklung von TNF-α und IL-1β wurde unter Exvivo-Bedingungen an menschlichen einkernigen peripheren Blutzellen gemessen.

[0091] MPL®-Immunstimulans und RC-553 wurden in wässrigen Lösungen von 0,2 % TEoA/WFI formuliert.

[0092] Menschliches Gesamtblut wurde verwendet, um die Fähigkeit von Glykolipiden (AGPs) zu evaluieren, entzündungsfördernde Cytokine zu induzieren. Menschliches Gesamtblut wird in heparinisierten Röhrchen abgenommen, und 0,45 ml Gesamtblut werden mit 0,05 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4), die das Glykolipid (d.h. die Testverbindungen) enthält, vermischt. Die Röhrchen werden 4 h lang bei 37 °C an einer Schüttelvorrichtung inkubiert. Die Proben werden anschließend mit 1,5 ml steriler PBS verdünnt und zentrifugiert. Die Überstände werden entfernt und mittels Sandwich-ELISA unter Verwendung von R&D Systems' Quantikine-Immuntestsets für menschlichen/s TNF-α und IL-1β auf zellassoziierten/s TNF-α und IL-1β analysiert.

[0093] Bei 1, 5 und 10 µg/ml im Test produzierte RC-553 keine Konzentrationen von TNF-α, die unter den Testbedingungen nachgewiesen werden hätten können. Dahingegen war die positive Kontrolle LPS ein wirksamer Stimulator von TNF-α-Sekretion aus den Zellen bei 1 ng/ml. MPL®-Immunstimulans induzierte TNF-α im Konzentrationsbereich von 100 bis 10.000 ng/ml wirksam.

[0094] In ähnlicher Weise produzierte RC-553 (bei 1, 5 und 10 µg/ml) keine nachweisbaren Konzentrationen von IL-1β. Um die Wirkungen von RC-553 zu vergleichen, wurde der durch MPL®-Immunstimulans induzierten Konzentration von IL-1β ein Wert von 1 zugeordnet, und die relative Induktion von Cytokinen betrug für RC-553 ≤ 0,05.

Diskussion der Beispiele 2–6

[0095] Die Daten aus diesen Studien zeigen, dass RC-553 in der Lage ist, die Immunität von Vakzinenantigenen zu steigern. RC-553 erhöhte Serumtiter gegen zwei unterschiedliche Vakzinenantigene, Influenza- und Hepatitis-Oberflächenantigene. Ähnlich wie MPL®-Immunstimulans vermittelte RC-553 eine Verschiebung des Antikörperprofils von einer Antwort, die vorwiegend vom IgG1-Isotyp war, zu einer Antwort mit hohen Konzentrationen von IgG2a-Antikörpern. Zusätzlich zur Steigerung der Antikörperreaktion ist RC-553 ein gutes Adjuvans für die Induktion von CTL-Aktivität.

[0096] Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Resultate in dieser Studie ist, dass RC-553 die Antwort zu beeinflussen scheint, ohne nachweisbare Konzentrationen der Entzündungscytokine TNF-α oder IL-1β zu induzieren. Diese Cytokine werden beide von Zellen des angeborenen Immunsystems als Reaktion auf Bakterienzellwandprodukte, einschließlich Lipid A, produziert. Da RC-553 mit Lipid A strukturelle Ähnlichkeit aufweist, kann angenommen werden, dass es auch TNF-α oder IL-1β stimuliert, und tatsächlich ist dies für einige AGP-Moleküle der Fall. Wie Entzündungscytokine stimulieren TNF-α und IL-1β die Freisetzung von Kaskaden

anderer Cytokinmediatoren, die für die Aktivierung von Phagozyten und die Mobilisierung spezifischer Immunität verantwortlich sind. IL-1 wurde anfänglich als endogenes Pyrogen bezeichnet, da es eine fiebrige Antwort induziert. Somit fällt der Mangel an nachweisbarem IL-1 nach der Verabreichung von RC-553 mit dem augenscheinlichen Mangel an Fieber im Kaninchen-Pyrogenitätstest zusammen.

[0097] Es bleibt möglich, dass RC-553 in diesen Studien tatsächlich die Sekretion von TNF-α und IL-1β in Konzentrationen fördert, die ausreichend hoch sind, um Aktivierung von spezifischer Immunität zu vermitteln, auch wenn sie zu gering sind, um im Exvivo-Cytokintest nachgewiesen zu werden. Eine andere Option wäre, dass diese Verbindungen andere Cytokinvermittler als TNF-α und IL-1β stimulieren, die zu einer spezifischen Immunantwort gegenüber gleichzeitig verabreichten Vakzinenantigenen führen. Es scheint wahrscheinlich zu sein, dass IFNγ gebildet wird. Von diesem Cytokin wird angenommen, dass es für die Induktion der Isotypverschiebung hin zu Antikörper der IgG2a-Unterklasse verantwortlich ist, wie auch, dass es ein Promotor von TH-1-vermittelten CTL-Antworten ist. Somit sind sowohl die erhöhten IgG2a-Titer als auch die aktiven CTL-Populationen ein Zeichen für die Produktion von IFNγ.

Beispiel 7 – Stimulation von induzierbarer Stickstoffoxidsynthase (iNOS) durch RC-553

[0098] Dieses Beispiel veranschaulicht die Wirkung verschiedener Glykolipide auf iNOS-Induktion in murinen J774-Makrophagen. Die murine Makrophagenzelllinie J774 kann durch IFN-γ in vitro geprimt werden und ist sehr reaktiv auf darauffolgende LPS-Stimulierung von iNOS-Hochregulierung, wie durch ein Standard-Gneiss-Reagens-ELISA-Testverfahren gemessen wird. Der Test verwendet J774-Zellen, die 1×10^6/ml mit 30 ml/Kolben, wobei IFN-γ mit 100 Einheiten/ml zugesetzt wird, 16–24 h lang überimpft werden. Zellen werden dann geerntet und gewaschen und mit 2×10^5/Well in einer 96-Well-Platte resuspendiert und anhaften gelassen. Glykolipidverbindungen werden als Testgruppe in die Wells reihenverdünnt, und die resultierenden Kulturen werden weitere 36–40 h inkubiert, bevor die Kulturüberstände zur Greiss-Reagens-Analyse der Nitritfreisetzung gewonnen werden (Green et al., Anal. Biochem. 126, 131–138 (1982)). Der Nitritgehalt ist beinahe proportional zur iNOS-Funktion.

[0099] Die Wirksamkeit wurde als jene Konzentration (ng/ml) von Glykolipid in Kultur, die in der Lage war, eine halbmaximale Induktion von Nitrit zu induzieren (ED_{50}), bestimmt. Je geringer die ED_{50}-Zahl, desto größer die Wirksamkeit für iNOS-Induktion. Der ED_{50}-Wert wurde gemäß den in Johnson et al., J. Med. Chem. 42, 4640–4649 (1999), beschriebenen Verfahren berechnet.

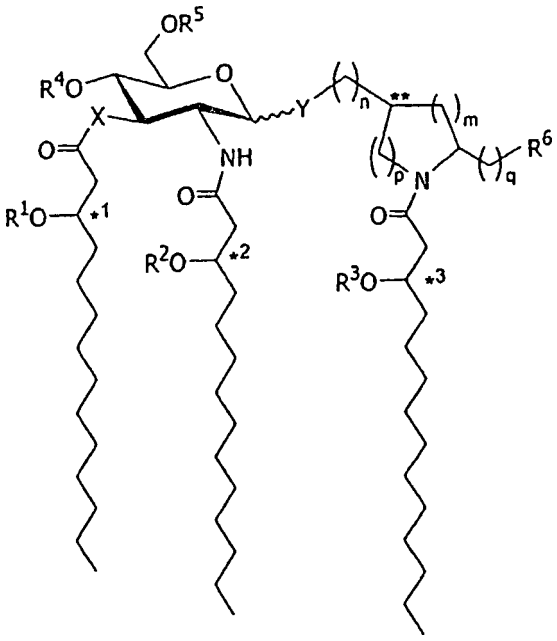
[0100] Für MPL®-Immunstimulans wurde ein ED_{50}-Wert von etwa 2 ng/ml gefunden, was zu einem hohen Grad an Nitritentwicklung führte, während RC-553 einen nominalen ED_{50}-Wert von etwa ≥ 3.000 (ng/ml) aufwies.

[0101] Die sehr geringe maximale iNOS-Aktivität, die bei RC-553 beobachtet wurde, lässt darauf schließen, dass es in diesem System bezüglich iNOS-Induktion im Wesentlichen inaktiv ist.

[0102] Es versteht sich, dass die hierin beschriebenen Beispiele und Ausführungsformen ausschließlich der Veranschaulichung dienen und dass Fachleuten verschiedene Modifizierungen oder Veränderungen in Hinblick auf diese Ausführungsformen nahe gelegt werden, die ebenfalls in den Bereich dieser Anmeldung fallen und im Schutzumfang der beiliegenden Ansprüche liegen.

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel:



und pharmazeutisch annehmbare Salze davon, worin X ein aus der aus -O- und -NH- bestehenden Gruppe ausgewähltes Element ist;
Y ein aus der aus -O- und -S- bestehenden Gruppe ausgewähltes Element ist;
R^1, R^2 und R^3 unabhängig voneinander aus der aus (C_2-C_{24})-Acyl bestehenden Gruppe ausgewählte Elemente sind;
R^4 ein aus der aus -H und $-PO_3R^7R^8$ bestehenden Gruppe ausgewähltes Element ist, worin R^7 und R^8 unabhängig voneinander aus der aus -H und (C_1-C_4)-Alkyl bestehenden Gruppe ausgewählte Elemente sind;
R^5 ein aus der aus -H, $-CH_3$ und $-PO_3R^9R^{10}$ bestehenden Gruppe ausgewähltes Element ist, worin R^9 und R^{10} unabhängig voneinander aus der aus -H und (C_1-C_4)-Alkyl bestehenden Gruppe ausgewählte Elemente sind;
R^6 aus H, OH, (C_1-C_4)-Alkoxy, $-PO_3R^{11}R^{12}$, $-OPO_3R^{11}R^{12}$, $-SO_3R^{11}$, $-OSO_3R^{11}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-SR^{11}$, -CN, $-NO_2$, -CHO, $-CO_2R^{11}$ und $-CONR^{11}R^{12}$ ausgewählt ist, worin R^{11} und R^{12} unabhängig voneinander aus H und (C_1-C_4)-Alkyl ausgewählt sind, mit der Maßgabe, dass, wenn R^4 $-PO_3R^7R^8$ ist, R^5 nicht $-PO_3R^9R^{10}$ ist;
worin "*1", "*2", "*3" und "**" Chiralitätszentren darstellen;
worin die Indices n, m, p und q unabhängig voneinander ganze Zahlen von 0 bis 6 sind, mit der Maßgabe, dass die Summe p + m = 0 bis 6 ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, worin X und Y -O- sind, R^4 $-PO_3R^7R^8$ ist, R^5 und R^6 H sind und die Indices n, m, p und q ganze Zahlen von 0 bis 3 sind.

3. Verbindung nach Anspruch 2, worin R^7 und R^8 -H sind.

4. Verbindung nach Anspruch 3, worin die Indices n, m, p und q 0 bis 2 sind.

5. Verbindung nach Anspruch 3, worin der Index n = 1 ist, der Index m = 2 ist und die Indices p und q = 0 sind.

6. Verbindung nach Anspruch 5, worin R_1, R_2 und R_3 Tetradecanoylreste sind.

7. Verbindung nach Anspruch 5, worin *1, *2 und *3 in R-Konfiguration vorliegen.

8. Verbindung nach Anspruch 5, worin Y in äquatorialer Stellung vorliegt.

9. Verbindung nach Anspruch 5, worin ** in S-Konfiguration vorliegt.

10. Verbindung nach Anspruch 5, worin *1, *2 und *3 in R-Konfiguration vorliegen, während Y in äquatorialer Stellung vorliegt, und worin ** in S-Konfiguration vorliegt.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend:
eine therapeutisch wirksame Menge einer Zusammensetzung, die einen pharmazeutisch annehmbaren Träger und eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 umfasst.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, worin die pharmazeutische Zusammensetzung weiters zumindest ein Antigen umfasst.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das Antigen aus der aus Herpes-simplex-Virus Typ 1, Herpes-simplex-Virus Typ 2, menschlichem Zytomegalie-Virus, HIV, Hepatitis A, B, C oder E, RS-Virus ("respiratory syncytial virus"), menschlichem Papillomavirus, Influenzavirus, Tuberkulose, Leishmaniasis, T. cruzi, Ehrlichia, Candida, Salmonella, Neisseria, Borrelia, Chlamydia, Bordetella, Plasmodium und Toxoplasma bestehenden Gruppe stammt.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das Antigen ein menschliches Tumorantigen ist.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 14, worin das Tumorantigen von Prostata-, Dickdarm-, Brust-, Eierstock-, Bauchspeicheldrüsen-, Hirn-, Kopf- und Hals-, Melanom-, Blut- oder Lymphkrebs stammt.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das Antigen ein Selbstantigen ist.

17. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin das Selbstantigen ein mit einer Autoimmunerkrankung assoziiertes Antigen ist.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 17, worin die Autoimmunerkrankung Typ-1-Diabetes, multiple Sklerose, Myasthenia gravis, rheumatoide Arthritis oder Psoriasis ist.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11 in einer wässrigen Formulierung.

20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin die wässrige Formulierung ein oder mehrere Tenside umfasst.

21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin die wässrige Formulierung ein oder mehr Phospholipidtenside umfasst.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 21, worin das Tensid aus der aus Diacylphosphatidylglycerinen, Diacylphosphatidylcholinen, Diacylphosphatidsäuren und Diacylphosphatidylethanolaminen bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

23. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 21, worin das Tensid aus der aus Dimyristoylphsophatidylglycerin (DPMG), Dipalmitoylphosphatidylglycerin (DPPG), Distearoylphosphatidylglycerin (DSPG), Dimyristoylphosphatidylcholin (DPMC), Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Distearoylphosphatidylcholin (DSPC), Dimyristoylphosphatidsäure (DPMA), Dipalmitoylphosphatidsäure (DPPA), Distearoylphosphatidsäure (DSPA), Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DPME), Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE) und Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE) bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

24. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11 in einer Emulsionsformulierung.

25. Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 24 zur Verwendung in einem Verfahren zur Induktion einer Immunantwort in einem Individuum.

26. Verbindung oder Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 25, worin die Zusammensetzung weiters zumindest ein Antigen umfasst.

27. Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 24 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Säugetiers, das an einer pathogenen Infektion, einem Krebs oder einer Autoimmunerkrankung leidet oder dafür anfällig ist.

28. Verbindung oder Zusammensetzung nach Anspruch 27, worin die Zusammensetzung weiters zumindest ein Antigen umfasst.

29. Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 24 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Krankheiten oder Leiden, die durch Stickstoffoxidproduktion gelindert werden kön-

nen.

30. Verbindung oder Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 29, worin die Verbindung zur Verabreichung an das Tier in einem Zeitraum von etwa 48 Stunden vor dem Einsetzen von Ischämie bis zum Einsetzen von Ischämie dient.

31. Verbindung oder Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 29, worin die Verbindung zur Verabreichung an das Tier von unmittelbar vor dem Einsetzen von Ischämie bis und während der Ischämie dient.

32. Verbindung oder Zusammensetzung nach Anspruch 29, worin die Verbindung zur Verabreichung an das Tier von unmittelbar vor dem Einsetzen von Ischämie bis und während Reperfusion dient.

33. Verbindung oder Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 29, worin X und Y -O- sind, R^4 $-PO_3R^7R^8$ ist, R^5 und R^6 H sind, worin R^7 und R^8 -H sind, worin der Index n = 1 ist, der Index m = 2 ist und die Indices p und q = 0 sind, worin R_1, R_2 und R_3 Tetradecanoylreste sind, worin $*^1$, $*^2$ und $*^3$ in R-Konfiguration vorliegen, worin Y in äquatorialer Stellung vorliegt und worin ** in S-Konfiguration vorliegt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen