



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 832**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03765055 .3**

86 Fecha de presentación : **18.07.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1521600**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.04.2005**

54 Título: **Conjugados de bisaciloxipropilcisteína y su uso.**

30 Prioridad: **19.07.2002 EP 02016066**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

73 Titular/es:
**Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH
Mascheroder Weg 1
38124 Braunschweig, DE**

72 Inventor/es: **Mühlradt, Peter y
Morr, Michael**

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 301 832 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugados de bisaciloxipropilcisteína y su uso.

La invención se refiere a nuevos conjugados de bisaciloxipropilcisteína y a su uso, también en forma de composiciones farmacéuticas.

Desde hace mucho tiempo se conoce que determinados lipopéptidos son activadores de macrófagos (Hoffmann, P., S. Heinle, U.F. Schade, H. Loppnow, A.J. Ulmer, H.-D. Flad, G. Jung, y W. Bessler, 1988, "Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic Bisacyloxypropylcysteine analogues", Immunobiol. 177: 158-170). Dentro de esta clase de activadores de macrófagos se conocen especialmente también péptidos o proteínas con acción fisiológica sustituidos con ácido graso (aciloxi-sustituidos) múltiples veces en un resto de propilcisteína.

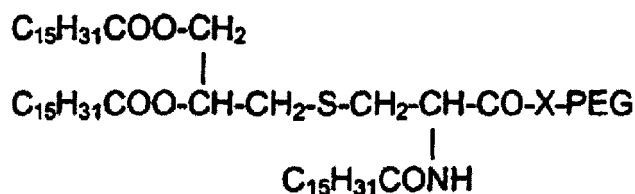
Sin embargo, los péptidos y entre ellos especialmente los lipopéptidos con cadenas de ácido graso más largas tienen frecuentemente la desventaja agravante de una solubilidad en agua demasiado reducida para aplicaciones farmacéuticas y similares en el cuerpo humano y animal, lo que limita considerablemente su eficacia y su campo de utilización.

Estos problemas pueden solucionarse mediante la conjugación de las proteínas y los péptidos con polímeros solubles en agua. A partir del documento EP 0 510 356 B1 se conocen por ejemplo conjugados de polietilenglicol-proteína, en los que una proteína está unida mediante un ligador a polietilenglicol y por ello se hace esencialmente soluble en agua. En el documento EP 0 510 356 B1 se mencionan numerosos documentos adicionales, en los que se describe la conjugación de péptidos o proteínas con polímeros solubles en agua, en este caso especialmente con polietilenglicol. La conjugación con PEG se denomina hoy en día también como "pegilación".

El documento KLEINE B. *et al*: "Lipopeptide-polyoxyethylene conjugates as mitogens and adjuvants" Immunobiology, 3ª Ed. 190, 1994, páginas 56-66 describe conjugados de lipopéptidos-polioxi-etileno como inmunoestimulante pero el grupo amino de la cisteína no está conjugado.

También se conocen ya activadores de macrófagos pegilados de la manera descrita anteriormente. Puede obtenerse comercialmente por ejemplo un PEG aciloxi-sustituido tres veces en un resto de propil-cisteína, tripalmitoil-S-gliceril-cisteína-polietilenglicol, que puede denominarse como PAM₃-Cys-PEG.

PAM₃-Cys-PEG tiene la estructura

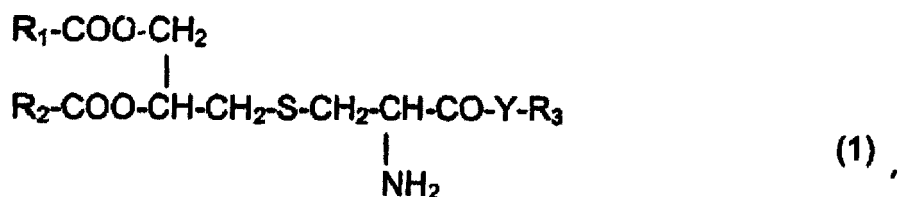


estando conjugada la propilcisteína sustituida con ácido graso en la posición X mediante un resto bivalente tal como -NH-, -OCO-, -S-, -O-, o similares con el polietilenglicol.

A pesar de la solubilidad en agua mejorada considerablemente de PAM₃-Cys-PEG en comparación con los correspondientes PAM₃-Cys-péptidos, en el caso del uso de esta sustancia como activador de macrófagos, frecuentemente es necesaria o al menos muy recomendable la adición de un solubilizante orgánico, dado que de lo contrario la activación de macrófagos sería reducida. Sin embargo, solubilizantes tales como octil-glucósido no están completamente libres de problemas desde el punto de vista farmacológico.

Por tanto existe además una necesidad considerable de nuevos activadores de macrófagos activos, que se disuelven bien en agua, especialmente no inmunógenos y que se toleran bien fisiológicamente. Por tanto, el objetivo de la invención consiste en proporcionar un nuevo activador de macrófagos de este tipo muy activo, que se disuelve en agua y se tolera bien.

El objetivo se soluciona mediante un conjugado de bisaciloxipropilcisteína según la fórmula (1),



pudiendo ser R_1 y R_2 iguales o diferentes y significando restos de ácido graso unidos mediante el grupo carboxilo,

siendo $Y = -NH-, -O-, -S-$ o $-OCO-$,

siendo R_3 es un resto de conjugado unido de manera covalente, iónica o asociativa, especialmente un polímero unido de manera covalente o iónica, tolerable fisiológicamente y soluble en agua, especialmente polietilenglicol (polioxietileno) unido de manera covalente,

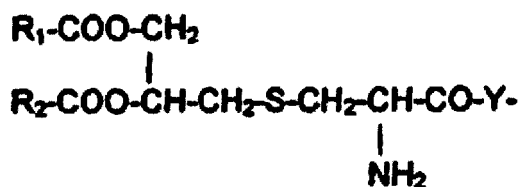
$-(CH_2-CH_2-O)_m-CH_2-CH_2-X$,

con $X = OR, NR_2, SR, COOR$ y

$R = H$, bencilo, alquilo C_{1-6} , pudiendo ser varios restos R iguales o diferentes,

un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, un dextrano, un azúcar, una polivinilpirrolidona, un alginato, una pectina o un colágeno,

y estando sustituido el resto polimérico R_3 una, dos o múltiples veces con



El conjugado según la invención puede encontrarse tanto como racemato como como sustancias ópticamente puras.

En el caso del conjugado de bisaciloxipropilcisteína según la invención se trata preferiblemente de un S-[2,3-bis(aciloxi)-(2S)-propil]-L-cisteinil-carboxipolietilenglicol (BAP-Cys-PEG), en el que el polietilenglicol está unido mediante el grupo carboxilo de la cisteína y el grupo amino de la cisteína permanece libre. En otra forma de realización se trata, en el caso del conjugado de bisaciloxipropilcisteína según la invención preferiblemente de un S-[2,3-bis(aciloxi)-(2R)-propil]-L-cisteinil-carboxi-polietilenglicol (BAP-Cys-PEG), en el que el polietilenglicol está unido mediante el grupo carboxilo de la cisteína y el grupo amino de la cisteína permanece libre. Manteniendo la función o en este caso la acción fisiológica pueden realizarse modificaciones y sustituciones en la molécula conocidas por el químico.

Los restos $R_{1,2}$ del conjugado de bisaciloxipropilcisteína según la invención pueden ser iguales o diferentes. Actualmente se prefieren grupos alquínico, alquénico o alquilo C_{7-25} , preferiblemente C_{8-22} , encontrándose las posiciones insaturadas preferiblemente en configuración *cis*. Los restos alquínico, alquénico y alquilo pueden representar restos ramificados o no ramificados, cíclicos o cicloalquil-sustituídos. A partir de la química de los ácidos grasos se conocen suficientemente restos R_1, R_2 adecuados.

Con respecto al grupo Y depende exclusivamente de que se produzca una unión estable con el resto de conjugado R_3 , por eso la bisaciloxipropilcisteína permanece suficientemente unida a éste y por eso permanece soluble en agua.

El resto R_3 es preferiblemente un resto de polietilenglicol. Sin embargo, en general se trata de un resto de conjugado tolerable fisiológicamente unido de manera covalente, iónica o asociativa, que es adecuado para transformar la bisaciloxipropilcisteína en una forma activa soluble en agua. Actualmente se prefieren polímeros unidos de manera covalente. Alternativamente, el resto de conjugado puede ser también, sin embargo, un dextrano, un azúcar, una polivinilpirrolidona, un alginato, una pectina o un colágeno. Especialmente se utiliza dextrano como expansor sanguíneo y en cuanto a su tolerabilidad, es inofensivo.

Precisamente en el caso de restos de conjugado macropoliméricos pueden estar unidas también varias unidades BAP-Cys a un resto de conjugado R_3 .

El peso molecular del resto polimérico soluble en agua se selecciona preferiblemente de modo que asciende, por molécula de bisaciloxipropilcisteína, a de 100 a 30.000 Dalton. En el caso de polietilenglicol se prefiere una longitud de cadena m de desde 5 hasta 700, preferiblemente de 100 a 500, sin embargo no es obligatorio.

En una forma de realización preferida, el S-[2,3-bis(aciloxi)-(2S)-propil]-L-cisteinil-carboxi-polietilenglicol es un S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2S)-propil]-L-cisteinil-carboxi-polietilenglicol. En otra forma de realización preferida el S-[2,3-bis(aciloxi)-(2R)-propil]-L-cisteinil-carboxi-polietilenglicol es un S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2R)-propil]-L-cisteinil-carboxi-polietilenglicol.

El conjugado de bisaciloxipropilcisteína según esta invención presenta, en comparación con los activadores de macrófagos conocidos anteriormente, la ventaja de que relaciona una buena solubilidad en agua con una actividad de

macrófagos en comparación muy alta (véase a continuación). No es inmunógeno, de modo en el caso del uso en seres humanos o animales no tiene lugar el desarrollo de anticuerpos frente al preparado.

La invención comprende además composiciones farmacéuticas que contienen el conjugado de bisaciloxipropilcisteína según la invención. Las composiciones de este tipo incluyen, entre otras, disoluciones del conjugado de bisaciloxipropilcisteína según la invención. Dentro de estas composiciones pueden estar contenidos excipientes y aditivos farmacéuticos adicionales. Especialmente, el conjugado de bisaciloxipropilcisteína puede estar adsorbido o unido a un vehículo aceptable farmacéuticamente. El experto conoce vehículos adecuados y también están a disposición comercialmente.

La composición farmacéutica se encuentra preferiblemente en forma de una formulación adecuada para la inyección, para la inhalación o para la aplicación intranasal o tópica, estando incluidas formas de aplicación unidas a vehículo. Para la aplicación local se prevén, entre otras, pomadas, cremas, tinturas, disoluciones y similares, tales como el experto conoce para ese fin.

Los conjugados de bisaciloxipropilcisteína o las composiciones farmacéuticas correspondientes según la invención pueden utilizarse, entre otros, para la estimulación de macrófagos, para la estimulación de la síntesis de anticuerpos, para la defensa antiinfecciosa, para la inmunoestimulación, especialmente frente a tumores, para la prevención y el tratamiento de choque septicémico, para la cicatrización y como adyuvante para vacunas.

Como adyuvantes se denominan sustancias que en el caso de una inmunización se añaden al propio antígeno (es decir, la sustancia que provoca la reacción inmunitaria deseada), para reforzar la respuesta inmunitaria mediada por células y/o humoral.

El uso de adyuvantes óptimos desempeña un papel decisivo en las sustancias. Los antígenos administrados sin adyuvantes median sólo rara vez una respuesta inmunitaria suficiente. Además no depende sólo de la intensidad de la respuesta inmunitaria provocada, sino también de su calidad. La estimulación de un modelo de inmunización erróneo puede conducir a reacciones inmunopatológicas y a un empeoramiento de los síntomas de la infección. En este contexto el adyuvante puede ayudar a favorecer la reacción inmunitaria deseada.

Los adyuvantes pueden combinarse con los antígenos más diversos para dar vacunas. Como antígenos pueden seleccionarse especialmente antígenos diana para el tratamiento profiláctico de enfermedades infecciosas, tumores, enfermedades autoinmunitarias, alergias así como enfermedades inflamatorias crónicas o agudas. Por una vacunación se entiende también un tratamiento con antígenos para el control de la fertilidad en poblaciones humanas o animales.

Estos usos comprenden la activación de macrófagos/monocitos u otras células, que portan la combinación de receptores receptor tipo Toll 2 y 6, con todas las consecuencias indirectas mediante mediadores en el animal o el ser humano. Esto implica la aplicación como adyuvante (o sea, como adición a vacunas), para el tratamiento de tumores en el sentido más amplio, inclusive un cebado *in vitro* para dar células autólogas reimplantadas frente a los antígenos tumorales o mediante tratamiento directo, que puede tener lugar local o sistémicamente, para la generación de tolerancia cruzada frente a endotoxina y otros componentes microbianos correspondientes, lo que hace posible una protección frente a septicemia, así como para la aceleración de la cicatrización.

Figura 1: Dependencia de la concentración de la activación de macrófagos, medida por medio de la producción de monóxido de nitrógeno (determinada espectroscópicamente a DO 550 nm), con respecto a la concentración de activador de macrófagos en picomoles.

Figura 2: Aceleración de la cicatrización en ratones diabéticos mediante la aplicación de tres veces de BPP-Cys-PEG. Símbolo triangular: animales control tratados con vehículo; símbolos cuadrangulares: animales tratados con BPP-Cys-PEG.

Figura 3: Respuestas humorales estimuladas tras la vacunación con derivados de MALP-2 y BPP-Cys-PEG como adyuvantes de mucosa con una dosis de 0,05 μ g por animal por inmunización. Se inmunizaron los ratones por vía intranasal con β -galactosidasa (50 μ g/dosis) mezclada con los derivados anteriores en el día 0, 7 y 14. En el día 31 tras la primera inmunización se tomaron muestras de suero y se determinaron con ELISA las concentraciones de los anticuerpos específicos de β -galactosidasa. Los resultados se representan como títulos de punto final.

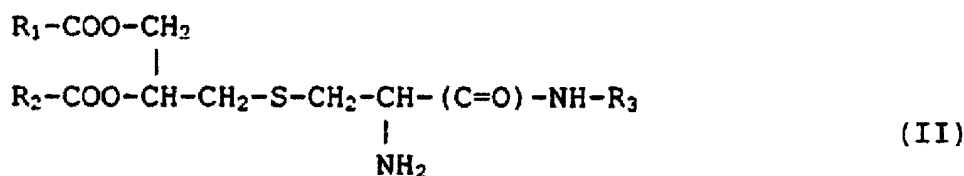
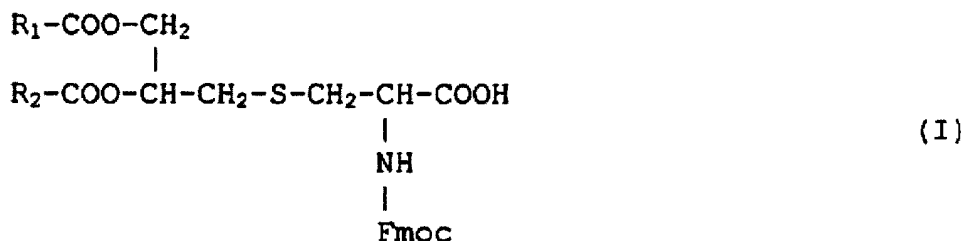
Figura 4: IgA específica de β -gal total en el lavado pulmonar de ratones inmunizados por vía intranasal. La desviación estándar (DE) está representada mediante líneas verticales.

Figura 5: IgA específica de β -gal total en el lavado vaginal de ratones inmunizados por vía intranasal. La desviación estándar está representada como líneas verticales.

Figura 6: Respuestas de proliferación de células T específicas de β -gal de micelas de ratones inmunizados. Las células volvieron a estimularse *in vitro* durante 4 días con diferentes concentraciones de β -gal soluble. Los resultados están representados como la relación entre los valores (media de determinación triple) de muestras estimuladas y no estimuladas (índice de estimulación).

Ejemplos1. *Síntesis de una bisaciloxipropilcisteína según la invención con R_1 , R_2 = palmitoílo, Y = NH y R_3 = PEG*

A. La síntesis de (I) tiene lugar según el método descrito (Metzger, J., Wiesmüller, K.-H., Schaud, R., Bessler, W.G., y Jung, G., 1991, "Synthesis and novel immunologically active tripalmitoyl-S-glycerylcysteinyl Bisacyloxypropylcysteines as useful intermediates for immunogen preparations". Int. J. Pept. Protein Res. 37: 46-57; Metzger, J.W., Wiesmüller, K.-H., y Jung, G., 1991, "Synthesis of N-Fmoc protected derivatives of S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine and their application in peptide synthesis", Int. J. Pept. Protein Res. 38:545-554).



especialmente con: $R_{1,2} = C_{15}H_{31}$ -(palmitoílo) y $R_3 = -(CH_2-CH_2-O)_x-CH_2-CH_2-NH_2$

B. A continuación se enlaza el grupo carboxilo por ejemplo con polímeros que contienen grupos NH_2 solubles en agua, por ejemplo diamino-PEG según métodos conocidos (síntesis de carbodiimidas).

Ejemplo

Se disuelven 34 mg (38 μ mol) de (I) en 1 ml de dimetilformamida seca/diclorometano 2:1 y se mezclan sucesivamente 6 μ l (38 μ mol) de diisopropilcarbodiimida y 6 mg (38 μ mol) de 1-hidroxibenzotriazol. A esta mezcla se le añaden 76 mg (38 μ mol) de diamino-PEG 2000. Tras 24 horas a temperatura ambiente se concentra hasta sequedad y se separa el grupo protector Fmoc con piperidina al 20% en dimetilformamida. Se purifica el compuesto (II) mediante cromatografía en gel de sílice. Se caracteriza mediante RMN y espectroscopia de masas. Se purifica adicionalmente mediante HPLC en columna C18 a 40°C, tampón 1: TFA al 0,1% en agua; tampón 2: TFA al 0,1% en 2-propanol. Se eluye la sustancia a aproximadamente el 80% V/V de tampón 2.

El análisis del contenido tiene lugar mediante la determinación de los ácidos grasos con patrón C14 añadido de manera interna, tras la hidrólisis y CGL según métodos convencionales o mediante la determinación de los grupos amino con fluorescamina.

C. Prueba biológica

En principio, puede medirse la activación de macrófagos y monocitos mediante un gran número de parámetros, tales como por ejemplo mediante la liberación de citocinas, quimiocinas o metabolitos del ácido araquidónico en cultivos de monocitos humanos o macrófagos peritoneales murinos. La prueba usada en el presente documento se basa en la estimulación simultánea de macrófagos peritoneales del ratón con interferón- γ y activador de macrófagos, por ejemplo BAP-Cys-PEG para la liberación de monóxido de nitrógeno. (Referencia: Mühlradt, P. F., y Frisch, M., 1994, "Purification and partial biochemical characterization of a Mycoplasma fermentans-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6", Infect. Immun. 62: 3801-3807).

Ensayo para determinar la liberación de monóxido de nitrógeno

En resumen, los macrófagos peritoneales de ratones C3H/HeJ sirvieron como fuente de macrófagos. Se cultivaron éstos en placas de microtitulación de 96 pocillos y se estimularon simultáneamente con rIFN- γ y con una dilución en serie de activador de macrófagos. Siempre que fuera necesario se disolvieron los activadores de macrófagos en la primera etapa de dilución en octil-glucósido 25 mM y luego se diluyeron adicionalmente con el medio. Tras un tiempo de incubación de 45 - 48 horas, se redujo el nitrato con nitrato reductasa y se determinó la sustancia de partida, monóxido de nitrógeno, con reactivo de Griess como la suma de nitrato y nitrito.

Se define 1 unidad (U)/ml como aquella dilución en la que tiene lugar una estimulación de la mitad de la máxima.

Los resultados de la prueba de activación de macrófagos están representados en la figura 1.

De la imagen ha de deducirse que bispalmitoiloxipropil-cisteína-PEG (BPP-Cys-PEG), (un activador de macrófagos según esta invención), tiene un potencial notablemente más alto para la activación de macrófagos que el PAM₃-Cys-PEG conocido (denominado en el presente documento como TPP-Cys-PEG). La figura muestra que se consigue la misma magnitud de activación de macrófagos mediante BPP-Cys-PEG ya con una concentración inferior en aproximadamente cuarenta veces que con TPP-Cys-PEG.

La imagen muestra además que esta acción de activación destacada e inesperada con BPP-Cys-PEG mediante la adición de un solubilizante (en el presente documento octil-glucósido) no se mejora de manera notable, mientras que para el desarrollo óptimo de la acción de PAM₃-Cys-PEG es necesaria una adición de este tipo.

Por tanto, el nuevo conjugado de bisaciloxipropilcisteína según esta invención no necesita ninguna solubilización adicional y dado el caso desventajosa fisiológicamente mediante un detergente o disolvente orgánico.

Una ventaja adicional del BAP-Cys-PEG con respecto al PAM₃-Cys-PEG es la mayor especificidad celular, que se atribuye a que esta sustancia requiere la cooperación de los receptores de tipo Toll 2 y 6, mientras que para una estimulación mediante PAM₃-Cys-PEG es suficiente la presencia simultánea de los receptores de tipo Toll 1 y 2 en las células que van a estimularse. La expresión del receptor de tipo Toll 6 está limitada a determinadas células, mientras que el receptor de tipo Toll 1 se expresa de manera ubicua a partir de casi todas las células del organismo.

2. Cicatrización en el caso de ratones diabéticos

De manera similar al caso de pacientes diabéticos, también en el caso de ratones diabéticos la cicatrización está perturbada y transcurre más lentamente que en el caso de ratones de tipo natural. Por eso, el ratón diabético es un modelo animal establecido en la cicatrización. Se rasuró en 20 ratones diabéticos (32 C57BKLS/Bom-db) en el lomo una superficie de aproximadamente 4 x 4 cm de tamaño y dos días más tarde se depiló ésta con Veet y se retiró la crema cuidadosamente. Tras dos días más, se desinfectaron los lomos depilados de los ratones con Braunol. Tras la inducción de la insensibilización con isoflurano/aire tuvo lugar una anestesia local adicional mediante inyección i.c. de xilocaína al 2% directamente en el sitio previsto para la escisión así como la eliminación de la grasa de la piel con tricloretileno. A continuación, se les escindió a los ratones respectivamente una herida de la piel circular con un diámetro de 1,3 cm con unas tijeras. Se taparon las heridas con un apósito transparente (Hydrofilm, F. Hartmann) y adhesivo para vendajes. Sobre este apósito se adhirió otro apósito, más grande con una abertura correspondiente a la herida, que hacía posible la observación de la herida. A través del apósito transparente tuvo lugar la aplicación de:

3 x 200 kUnidades de BPP-Cys-PEG por animal en metilcelulosa y suero de ratón al 5% (como vehículo) en los días 0, día 2 y día 5.

Los ratones control contenían sólo la mezcla de vehículo. Se observaron los ratones durante un periodo de tiempo de 29-30. Los apósitos se cambiaron normalmente en el intervalo de cinco días.

Mediante la aplicación de BPP-Cys-PEG (3 x 200 kU) se consiguió una aceleración significativa de la cicatrización (véase la imagen 2).

3. Uso de derivados de MALP-2 o BPP-Cys-PEG como adyuvante de la mucosa para una generación de una respuesta humoral eficaz a nivel tanto sistémico como de la mucosa

Realización del ensayo

Se usaron para los ensayos ratones BALB/c (H-2d) hembra de 6-8 semanas de edad (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Alemania). A grupos de 5 ratones respectivamente se les administraron, en el día 1, 14 y 21, 50 μ g de β -galactosidasa (β -gal) (Boehringer, Mannheim, Alemania) sola, o 0,5 μ g de R-MALP-2, S-MALP-2 o BPP-Cys-PEG sintéticos como adyuvante por vía nasal (25 μ l). Se tomaron muestras de suero en el día 31 y se almacenaron a -20°C hasta la determinación de los anticuerpos específicos de β -gal. Se recubrieron placas de prueba Nunc-Immuno MaxiSorp con 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 μ l de β -gal (Boehringer, Mannheim, Alemania) con 5 μ g/ml en 0,05 mol de tampón de carbonato (pH 8,2) por pocillo. Se agregaron diluciones de dos veces en serie de los

sueros o lavados en PBS con BSA al 1% BSA y Tween 20 al 0,05% (100 μ l/pocillo) y se incubaron las placas durante dos horas a 37°C. Tras lavar se agregó IgG de cabra anti-ratón específica de cadena γ biotinilada (Sigma Chemie, Deisenhofen, Alemania) y se incubaron las placas durante otra hora a 37°C. Tras lavar cuatro veces se añadieron 100 μ l de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pharmingen) a los pocillos y se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C. Tras lavar cuatro veces se desarrollaron las reacciones por medio de ABTS en 0,1 mol de tampón de citrato-fosfato (pH 4,35), que contenía H₂O₂ al 0,01%. Se representaron los títulos en el punto final como el Log₂ recíproco de la última dilución, que tras una incubación de 30 minutos dio como resultado una densidad óptima a 405 nm de 0,1 unidades por encima del valor de los controles negativos tras una incubación de 30 minutos.

Se obtuvieron lavados vaginales y pulmonares mediante el lavado de los órganos con PBS 1 mM, que contenía EDTA 50 mM, BSA al 0,1% y PMSF 10 mM. A continuación se centrifugaron los lavados para eliminar los residuos de tejido (10 min. a 3000 x g) y se conservaron los sobrenadantes a -20°C. Para determinar las concentraciones de IgA total de los lavados del pulmón y la vagina, se incubaron diluciones en serie de las muestras correspondientes en placas de microtitulación, habiéndose recubierto estas placas previamente con IgA de cabra anti-ratón (Sigma Chemie, Deisenhofen, Alemania) como anticuerpo de captura (100 μ l/pocillo). Se usaron diluciones en serie de IgA de ratón purificada (Sigma Chemie, Deisenhofen, Alemania) para la obtención de una curva patrón. Para analizar la capacidad de R-MALP-2, S-MALP-2 y BPP-Cys-PEG para la estimulación de respuestas inmunitarias humores eficaces, se determinaron los títulos séricos de anticuerpos específicos de β -gal en los ratones vacunados. Tal como se representa en la figura 3, la administración de β -gal en presencia de BPP-Cys-PEG conduce a una generación de títulos de IgG específicos de antígeno, que aumentan más rápidamente que los obtenidos con ayuda de R-MALP-2.

Para determinar la capacidad de los derivados indicados anteriormente para la estimulación de respuestas de la mucosa frente a antígenos, que se administraron juntos por vía intranasal (i.n.), se analizó la producción de IgA específica de β -gal en los lavados pulmonares y vaginales de los animales inmunizados. Mientras que tras la vacunación i.n. con β -gal pura o mezclas con el derivado de S-MALP-2 no tuvo lugar ninguna producción de IgA específica de β -gal en los lavados pulmonares, en el caso de los animales que se inmunizaron con β -gal y adicionalmente o bien R-MALP-2 o bien BPP-Cys-PEG, se comprobó un aumento significativo de los anticuerpos IgA específicos de antígeno (figura 4). La administración simultánea de R-MALP-2 y BPP-Cys-PEG con antígeno condujo a la estimulación de una producción de IgA eficaz también en las membranas mucosas que se encuentran alejadas, tal como se demostró mediante la presencia de concentraciones significativas de IgA específica de β -gal en los lavados vaginales (figura 5).

4. El uso de BPP-Cys-PEG como adyuvante de la mucosa conduce a una generación de una respuesta de proliferación mediada por células T eficaz

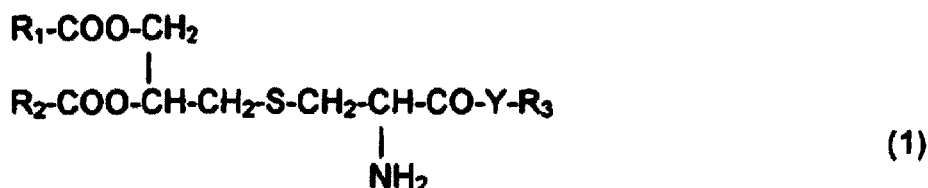
Realización del ensayo

Se extirparon los bazo y se tomaron conjuntamente para el análisis de las respuestas inmunitarias celulares. Se hacen proliferar las células en RPMI 1640, mezclado con suero del ternero al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 15 μ g/ml, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y L-glutamina 1 mM (GIBCO BRL, Karlsruhe, Alemania) y se conservaron a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Se ajustaron las suspensiones celulares hasta 5×10^6 células/ml en medio completo, se sembraron en una placa de microtitulación de fondo plano con 96 pocillos (Nunc) con 100 μ l por pocillo y se incubaron las placas durante 4 días en presencia de diferentes concentraciones de β -gal disuelto. Cada concentración se sometió a prueba tres veces. Durante el último cultivo de 8 horas se agregó a cada pocillo 1 μ Ci de [³H]timidina (Amersham International, Freiburg, Alemania). Entonces se recogieron estas células sobre filtro de papel (Filtermat A; Wallac, Freiburg, Alemania) con la ayuda de un colector de células (Inotech, Wohlen, Suiza) y se determinó la cantidad de [³H]timidina absorbida en el ADN de las células proliferativas por medio de un contador de centelleo (Wallac 1450, Micro-Trilux). Se representaron los resultados como la relación entre los valores (valor medio de determinación triple) de las muestras estimuladas y no estimuladas (índice de estimulación). Mientras que la administración i.n. de β -gal sola no generó ninguna inducción de la proliferación celular demostrable, la administración simultánea de R-MALP-2 o BPP-Cys-PEG con antígeno condujo a una respuesta de proliferación eficaz (figura 6). Se menciona que pudo observarse la respuesta de proliferación de células T más fuerte en las células de bazo de ratones inmunizados con BPP-Cys-PEG y β -gal. El uso de S-MALP-2 condujo a un índice de estimulación esencialmente más débil y sólo en el caso del uso de la dosis más alta de β -galactosidasa para la reestimulación.

Los resultados obtenidos muestran claramente que BPP-Cys-PEG como adyuvante de la mucosa es al menos tan eficaz o incluso más eficaz que R-MALP-2. Se consiguieron respuestas inmunitarias humores y celulares eficaces frente a antígenos administrados simultáneamente con BPP-Cys-PEG tanto a nivel sistémico como mucosal.

REIVINDICACIONES

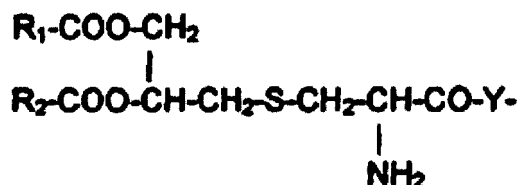
1. Conjugado de bisaciloxipropilcisteína según la fórmula 1,



pudiendo ser R₁ y R₂ iguales o diferentes y significando restos de ácido graso unidos mediante el grupo carboxilo, siendo Y = -NH-, -O-, -S- o -OCO-,

siendo R₃ un polímero unido de manera covalente, tolerable fisiológicamente y soluble en agua,

y estando sustituido el resto polimérico R₃ una, dos o múltiples veces con



2. Conjugado de bisacilpropilcisteína según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polímero se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol unido de manera covalente $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_m\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}$,

con X = OR, N(R)₂, SR, COOR y

R = H, bencilo, alquilo C₁₋₆, pudiendo ser varios restos R iguales o diferentes

un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, un dextrano, un azúcar, una polivinilpirrolidona, un alginato, una pectina o un colágeno.

3. Conjugado de bisacilpropilcisteína según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el polímero es un polietilenglicol unido de manera covalente

$-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_m\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}$,

con X = OR, N(R)₂, SR, COOR y

R = H, bencilo, alquilo C₁₋₆, pudiendo ser varios restos R iguales o diferentes.

4. Conjugado de bisaciloxipropilcisteína según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque los restos R_{1,2}, que pueden ser iguales o diferentes, son grupos alquinilo, alquenilo o alquilo C₇₋₂₅, preferiblemente C₈₋₂₂ y las posiciones insaturadas se encuentran preferiblemente en configuración *cis*, representando los restos alquinilo, alquenilo y alquilo restos ramificados o no ramificados, cíclicos o cicloalquil-sustituídos.

5. Conjugado de bisaciloxipropilcisteína según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el peso molecular del resto polimérico soluble en agua se selecciona de modo que asciende, por molécula de conjugado, a de 100 a 30.000 Dalton.

6. Conjugado de bisaciloxipropilcisteína según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el polietilenglicol del resto R₃ tiene una longitud de cadena m de desde 5 hasta 700, preferiblemente de 100 a 500.

7. Conjugado de bisaciloxipropilcisteína según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el compuesto es un S-[2,3-bis(aciloxi)-(2S)-propil]-L-cisteinil-carboxi-polietilenglicol, preferiblemente S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2S)-propil]-L-cisteinil-carboxi-polietilenglicol.

ES 2 301 832 T3

8. Conjugado de bisaciloxipropilcisteína según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el compuesto es un S-[2,3-bis(aciloxi)-(2R)-propil]-L-cisteinil-carboxi-poli(etilenglicol), preferiblemente S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2R)-propil]-L-cisteinil-carboxi-poli(etilenglicol).

5 9. Composición farmacéutica que contiene un conjugado de bisaciloxipropilcisteína según una de las reivindicaciones 1 a 8.

10 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, **caracterizada** porque contiene aditivos o excipientes farmacéuticos y preferiblemente un vehículo tolerable farmacéuticamente.

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 9 ó 10 en forma de una formulación adecuada para la inyección, para la inhalación o para la aplicación intranasal o tópica.

15 12. Uso de los conjugados de bisaciloxipropilcisteína según una de las reivindicaciones 1 a 8 o de la composición farmacéutica según la reivindicación 9, 10 u 11 para la producción de un medicamento para el tratamiento de tumores, para la prevención y el tratamiento de choque séptico, para la cicatrización y como adyuvante para vacunas.

20 13. Vacuna, **caracterizada** porque contiene un conjugado de bisaciloxipropilcisteína según una de las reivindicaciones 1 a 8 como adyuvante.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

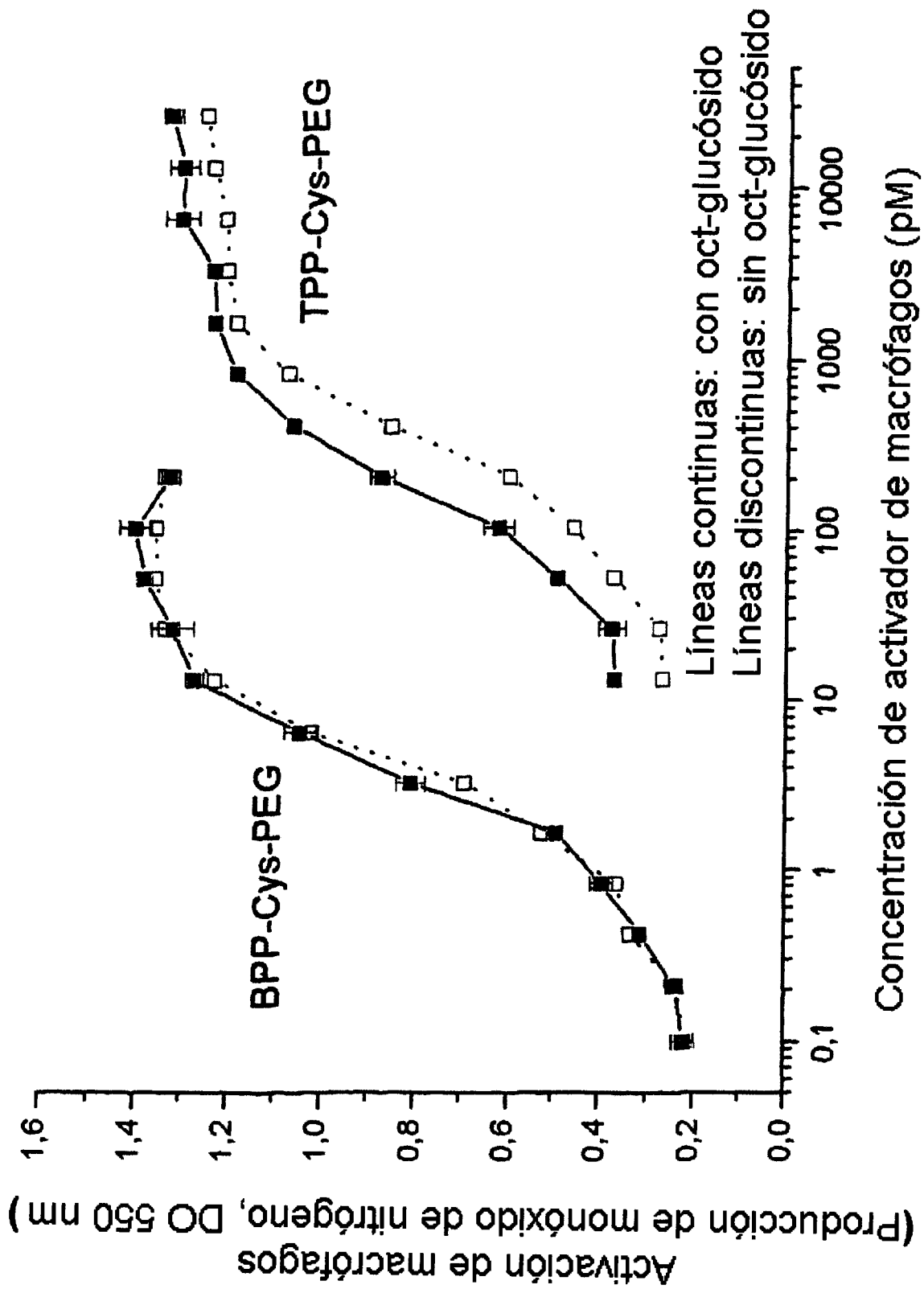


Fig. 1

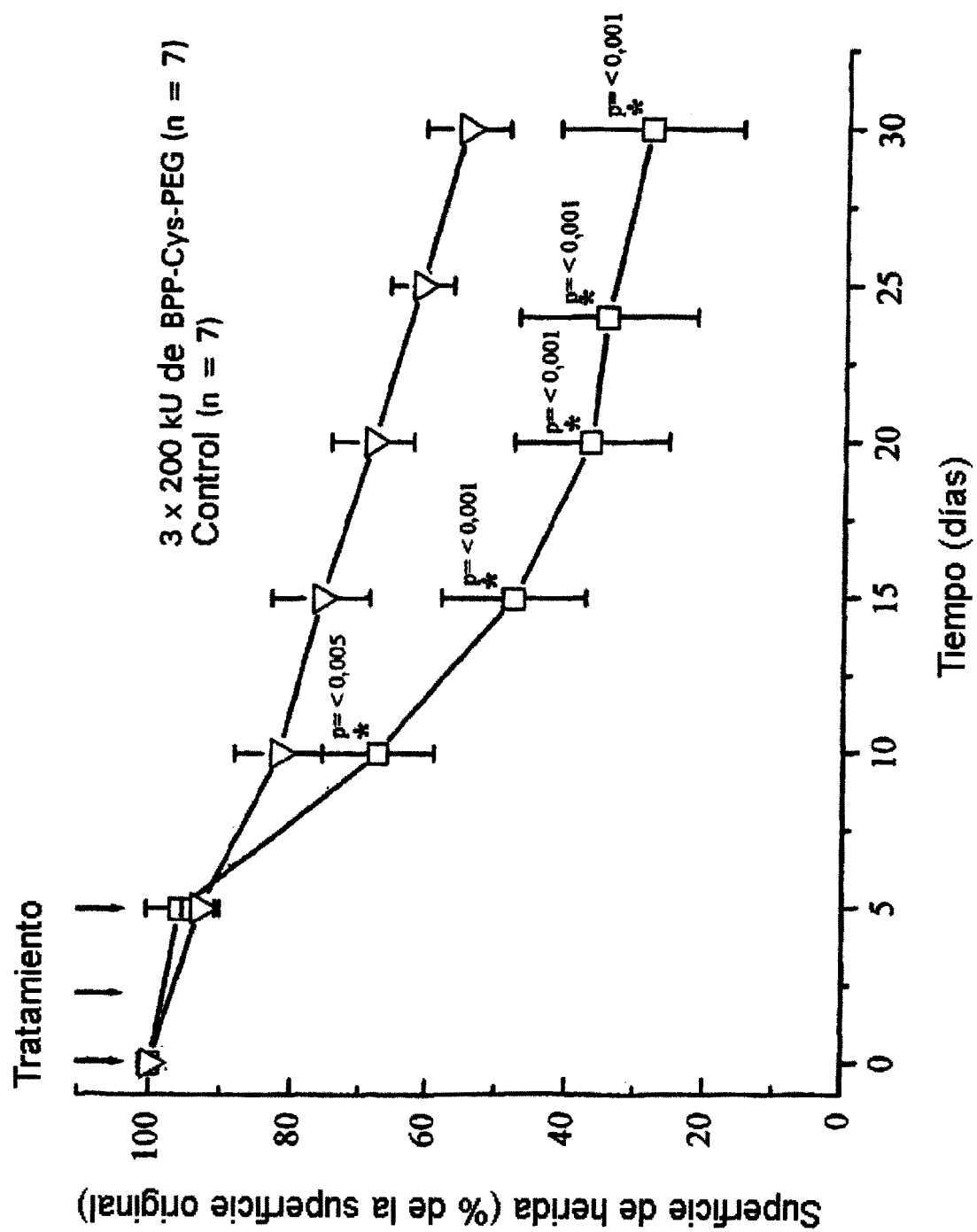


Fig. 2

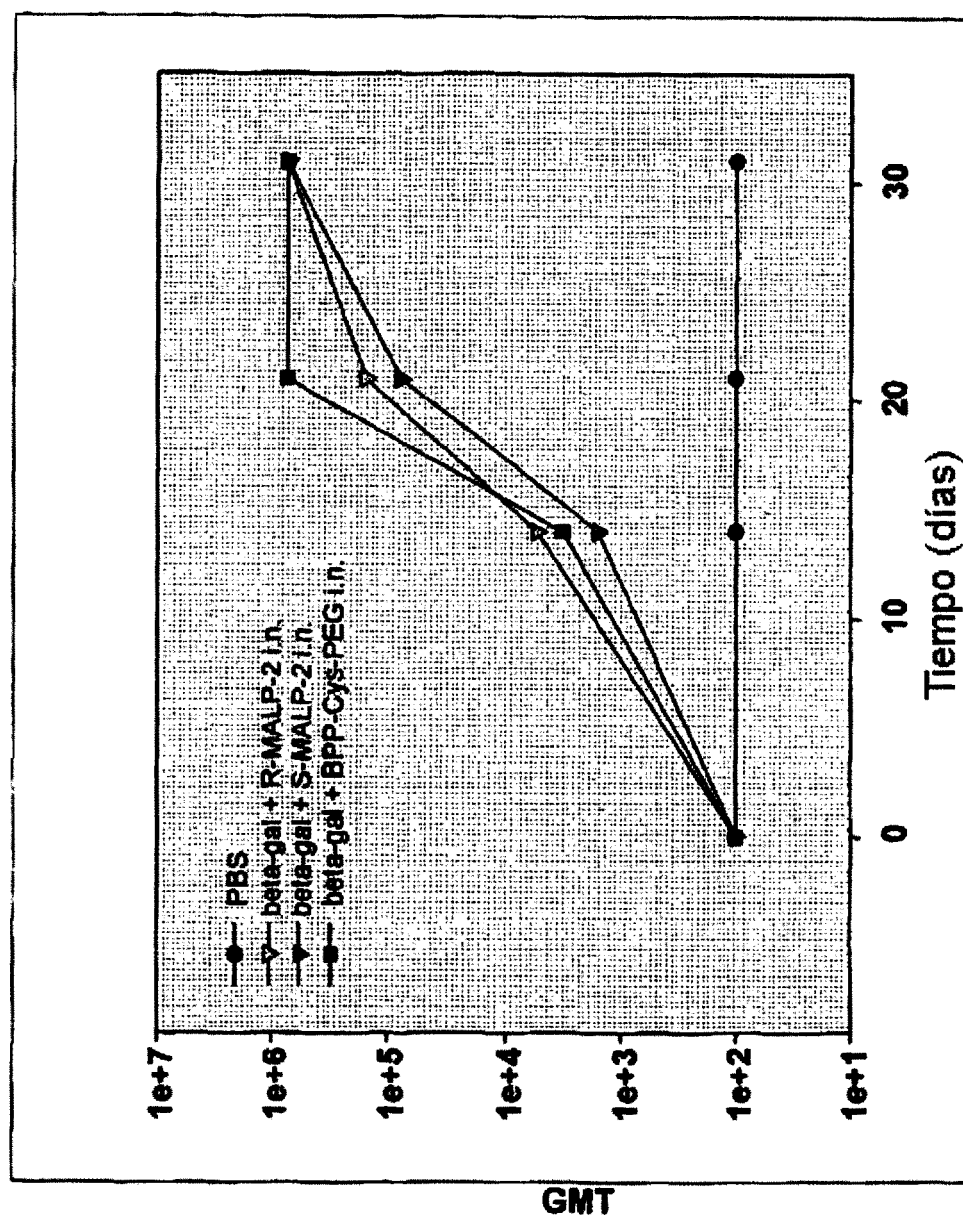
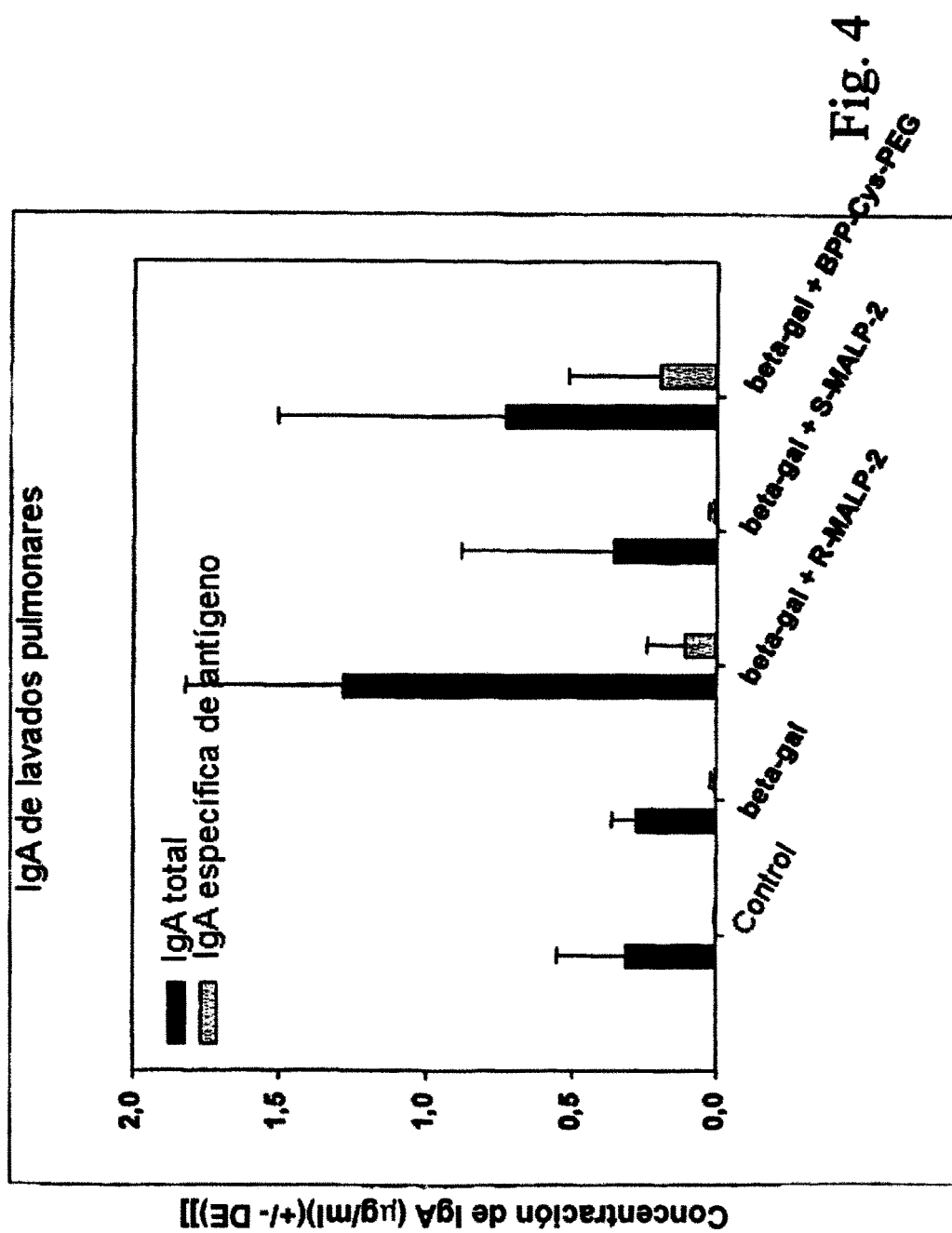


Fig. 3



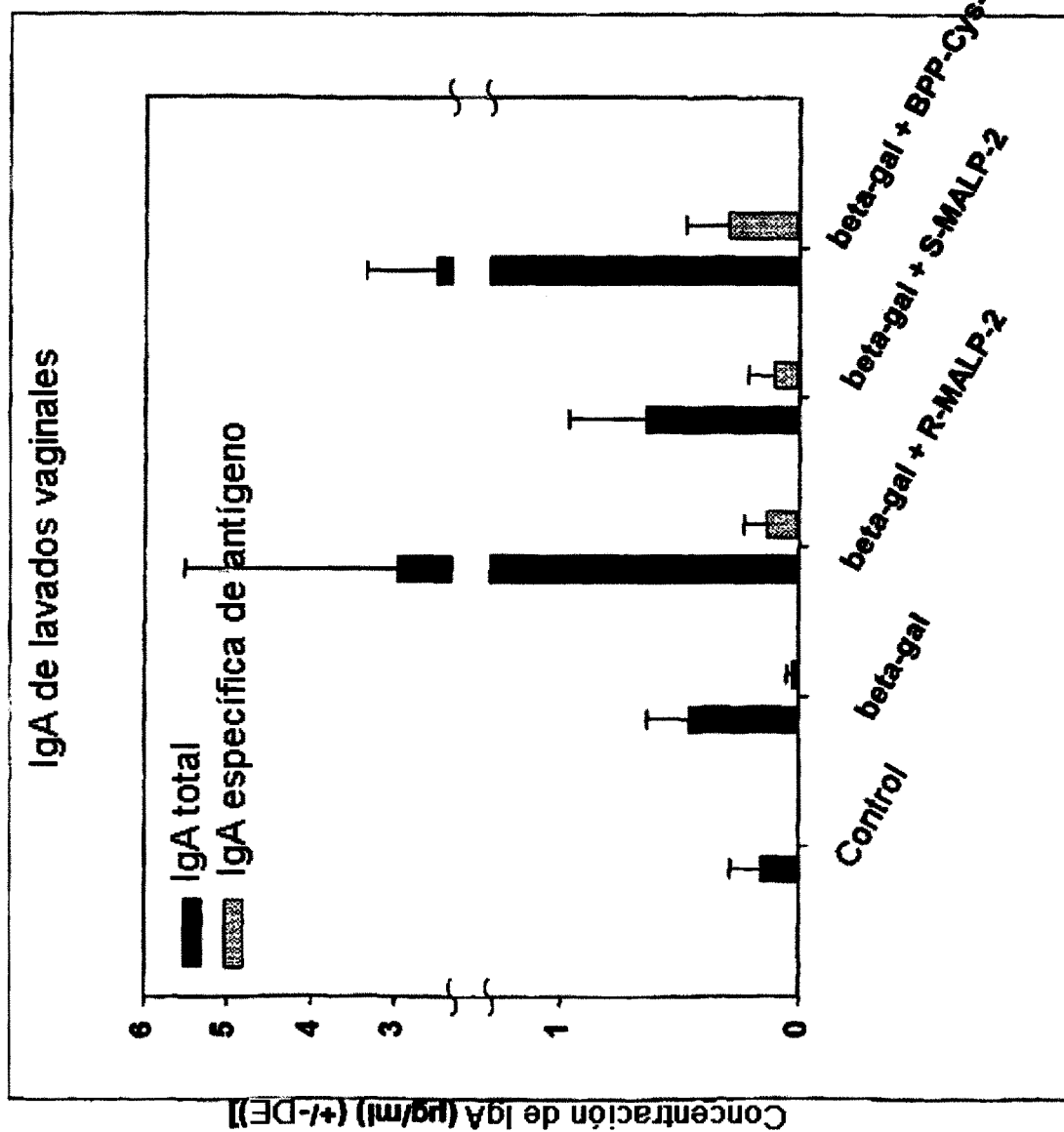


Fig. 5

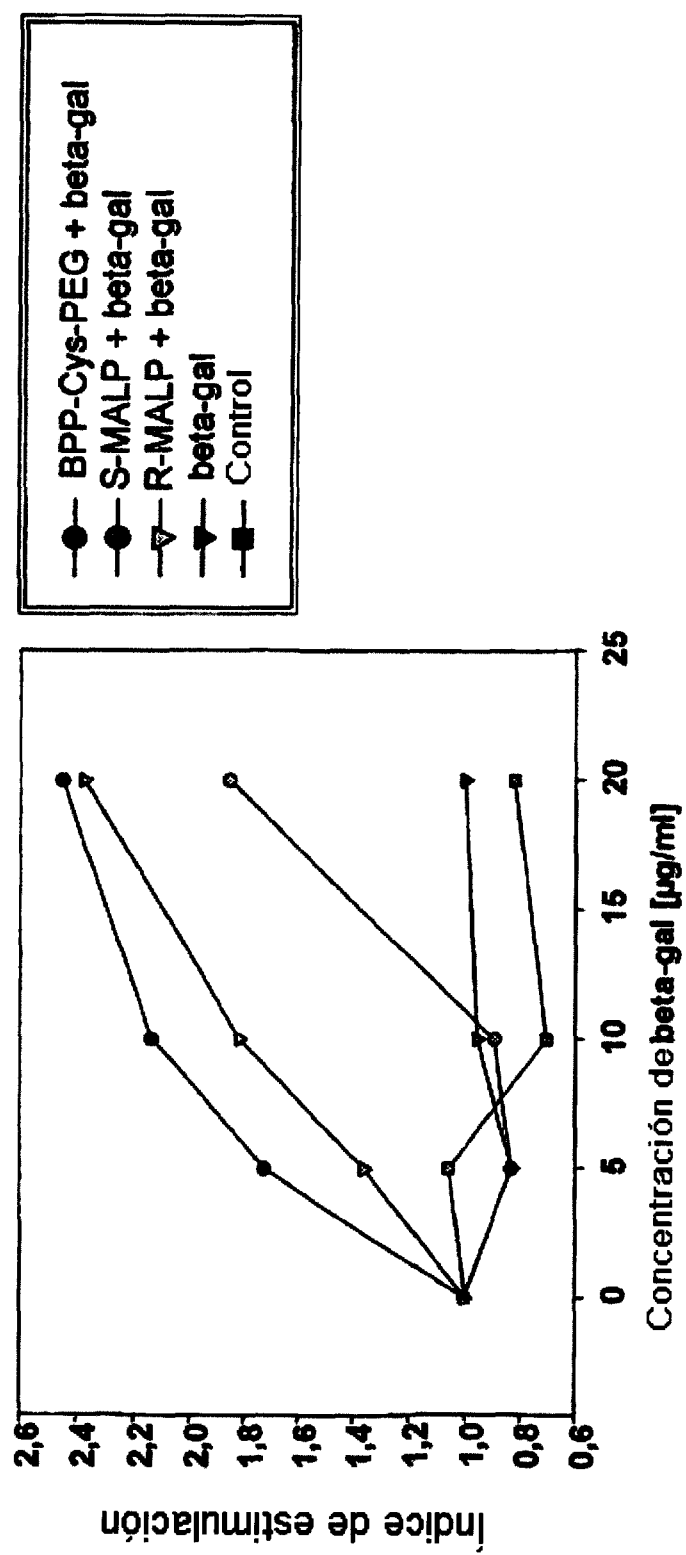


Fig. 6