

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 246**

51 Int. Cl.:

C07K 9/00 (2006.01)

A61K 38/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2016 PCT/IN2016/050436**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17098529**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2016 E 16872570 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2022 EP 3387005**

54 Título: **Nuevo compuesto derivado del péptido muramilo, síntesis y utilizaciones del mismo**

30 Prioridad:

10.12.2015 IN 6436CH2015

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

09.12.2022

73 Titular/es:

**BHARAT BIOTECH INTERNATIONAL LIMITED
(50.0%)**

**Genome Valley Turkapally Shameerpet
Hyderabad 500 078, IN y
COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL
RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ELLA, KRISHNA MURTHY;
BRUNDA, GANNERU;
KUMAR, HALMATHUR MAHABALARAO
SAMPATH y
SREEKANTH, MIRYALA**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 930 246 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).

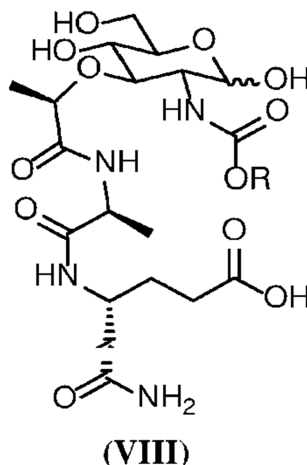
DESCRIPCIÓN

Nuevo compuesto derivado del péptido muramilo, síntesis y utilizaciones del mismo

5 REFERENCIA CRUZADA

SECTOR DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención se refiere a nuevos compuestos derivados del dipéptido muramilo (MDP, *muramyl dipeptide*) de fórmula estructural VIII.



15 en la que R es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo, butilo.

La presente invención se refiere también al proceso para la preparación de estos nuevos compuestos y nuevos intermedios para la preparación de estos nuevos compuestos. Los nuevos compuestos de la presente invención tienen un potencial elevado de propiedades inmunomoduladoras para su utilización como adyuvantes en formulaciones de vacunas. La presente invención también se refiere a la utilización de estos nuevos compuestos como adyuvantes con antígenos de vacunas y en la preparación de formulaciones de vacunas.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

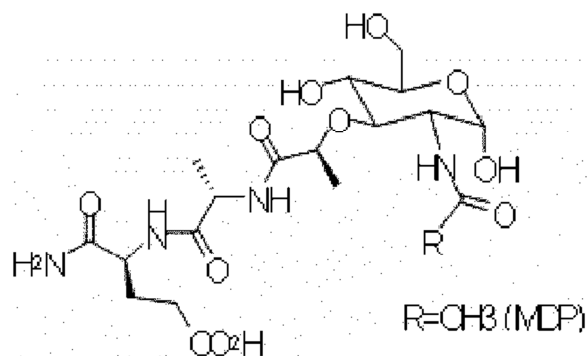
25 El dipéptido muramilo (MDP, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina) es un péptido inmunorreactivo sintético que consiste en ácido N-acetilmurámico unido a una cadena de aminoácidos corta de L-Ala-D-isoGln. Se identificó por primera vez en el peptidoglicano de la pared celular bacteriana como un componente activo en el adyuvante completo de Freund (FCA, *Freund's Complete Adjuvant*). En 1974, se descubrió que el MDP era la estructura mínima requerida para la eficacia de FCA, uno de los adyuvantes más potentes y ampliamente utilizados en modelos experimentales con animales. Los dipéptidos de muramilo son bien conocidos por sus propiedades inmunomoduladoras. Los dipéptidos de muramilo son los componentes biológicamente activos más pequeños de las paredes celulares bacterianas. Se ha demostrado que los derivados del dipéptido muramilo muestran propiedades inmunomoduladoras significativas, a través de uno de los PRR (receptores de reconocimiento de patrones, *Pattern Recognition Receptors*), receptor del dominio 2 de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2, *nucleotide-binding oligomerization domain 2*) (Girardin S. et al., 2003. *J Biol Chem.* 278 (11): 8869-72, F. Coulombe et al., 2012 *PLoS ONE*, 7 (5): artículo ID e36734). Los dipéptidos de muramilo activan los macrófagos y otras células del sistema inmunitario para eliminar las células cancerosas (I. Jakopin, 2013. *Current Medicinal Chemistry*, 20 (16): 2068-2079; Ogawa et. al., 2011. *CurrBioact Compd.* 7 (3): 180-197), sin embargo, también se describe que tienen naturaleza pirogénica. Con el fin de reducir su efecto pirogénico, hasta la fecha se han diseñado, sintetizado y probado una serie de derivados de MDP con el objetivo de aumentar funciones específicas, al mismo tiempo que suprime la pirogenicidad. Hay muchas invenciones o publicaciones divulgadas relacionadas con la síntesis del dipéptido muramilo y sus derivados (Namba et al., 1997. *Vaccine*, 15 (4): 405-13; Patente WO1996001645; Patente US4395399; Patente US7173107 B2).

45 El dipéptido N-glicolil muramilo, GMDP (N-glicolil glucosaminil-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina) es uno de los ejemplos de derivado del dipéptido muramilo, que se desarrolló originalmente en la década de 1970 en el Instituto Shemyakin de Química Bioorgánica, en Moscú. Se ha demostrado que el GMDP estimula las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. El GMDP también activa macrófagos y libera citocinas y factores estimulantes de colonias (CSF, *colony stimulating factors*), que a su vez estimulan la diferenciación de células hematopoyéticas para eliminar infecciones (Australasian Biotechnology, volumen 6, número 4, julio/agosto de 1996, págs. 223-229). Se ha demostrado que el GMDP tiene una mayor actividad inmunoadyuvante y menos efecto

pirogénico, en comparación con el MDP. Por lo tanto, diversos otros derivados de N-acilo de MDP son más inmunoterapéuticos que el MDP (Andronova T. M., et al., 1991. Review. Immunology 4, 1). Por lo tanto, esta molécula se utiliza ampliamente en enfoques inmunoterapéuticos, especialmente para tratar infecciones crónicas, enfermedades autoinmunes y cáncer (L. I. Rostovtseva et al., 1981. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 7 (12): 1843-1858).

El compuesto basado en MDP Likopid™ es el primer agente inmunoterapéutico del tipo muramilglucopéptido introducido en la práctica clínica. Likopid™ fue desarrollado y registrado por una empresa rusa, Peptek, como agente inmunoterapéutico con amplia aplicabilidad, por ejemplo, inmunoestimulación y prevención de infecciones que se complican en pacientes postraumáticos, postoperatorios, postquimioterapéuticos y postradioterapéuticos. Otras áreas son el tratamiento de enfermedades infecciosas, tales como la tuberculosis, el virus del papiloma cervical humano, las infecciones herpéticas oftálmicas, la psoriasis y el tratamiento de procesos ulcerosos e inflamatorios (Patente WO2007045192).

La estructura que se muestra a continuación de la fórmula general X representa la estructura química del compuesto MDP.



Fórmula X: representación estructural de MDP

Existen muchas invenciones relacionadas con los compuestos peptídicos de muramilo y sus derivados. Aunque se conoce su utilización como agentes terapéuticos, la utilización de derivados de MDP como adyuvantes en formulaciones de vacunas no se ha descrito ni se ha encontrado en absoluto hasta la fecha.

La Patente WO1996001645 A1 se refiere a la utilización de compuestos peptídicos de muramilo, particularmente N-acetil-D-glucosaminil-(β1-4)-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamina (MDP), para el tratamiento de afecciones dermatológicas inflamatorias, tales como psoriasis y en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario de la piel y las membranas mucosas.

La Patente US7173107B2 da a conocer glicopéptidos y la preparación de los mismos, que es la síntesis estereoespecífica de un glicopéptido utilizando un esquema de protección triplemente ortogonal, en particular, la síntesis del monopéptido N-acetilglucosaminil-β-[1,4]-N-acetylmuramilo y derivados del mismo. El glicopéptido es útil para la preparación de MDP y compuestos relacionados que tienen un núcleo de disacárido de ácido glucosaminil-β-[1,4]-N-acetylmurámico.

La Patente WO2007045192 se refiere a derivados del ácido glucosaminilmurámico (ácido 2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-N-acetylmurámico), su procedimiento de síntesis y su utilización para la síntesis de glucosaminilmuramilglucopéptidos, es decir, análogos disacáridos de muramilglucopéptidos. La Patente US4395399 da a conocer diferentes glicopéptidos y sus preparaciones.

Sin embargo, a pesar de las mejoras observadas en varios derivados de MDP recientemente desarrollados, todavía existe una necesidad continua de compuestos con efectos secundarios más reducidos y actividad adyuvante aumentada con el propósito de utilización terapéutica o profiláctica en formulaciones de vacunas. Por lo tanto, es fundamental centrarse en el equilibrio entre la eficacia y los efectos secundarios al diseñar o sintetizar nuevos compuestos. Existe la necesidad de desarrollar derivados de MDP mejorados y más efectivos, que reducirían los efectos secundarios asociados con los derivados de MDP conocidos.

OBJETIVOS DE LA INVENCIÓN

El objetivo principal de la presente invención es dar a conocer nuevos compuestos derivados del dipéptido muramilo.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un proceso para la preparación de nuevos compuestos derivados del dipéptido muramilo.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer nuevos compuestos intermedios para la síntesis de nuevos compuestos derivados del dipéptido muramilo.

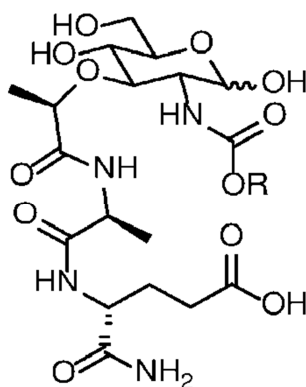
5 Un objetivo adicional de la presente invención es dar a conocer la utilización segura de nuevos compuestos derivados del dipéptido muramilo como adyuvantes para preparaciones farmacéuticas y formulaciones de vacunas.

Otro objetivo adicional es dar a conocer una formulación de vacuna que comprenda un nuevo compuesto derivado del dipéptido muramilo.

10 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

Por consiguiente, la presente invención da a conocer nuevos compuestos derivados de MDP de fórmula estructural VIII con pirogenicidad reducida, manteniendo al mismo tiempo una funcionalidad eficaz considerable como adyuvantes de vacunas.

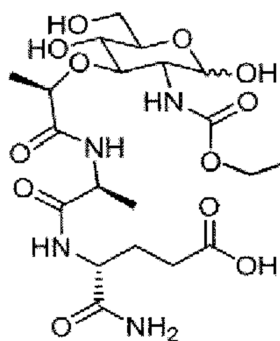
15 En un aspecto, la presente invención da a conocer nuevos compuestos derivados de dipéptido muramilo, tal como se muestra a continuación en la fórmula general VIII:



20 **Fórmula estructural general VIII**

en la que R es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo, butilo.

25 En una realización preferente, cuando R es etilo (C₂H₅), el compuesto de fórmula VIII es ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((alcoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico, tal como se muestra en la siguiente estructura:



30 Cuando R es etilo

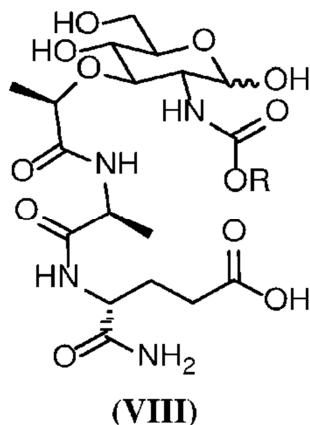
35 En otro aspecto, la presente invención da a conocer un proceso para la síntesis de los nuevos compuestos derivados del dipéptido muramilo de fórmula general VIII que comprende las etapas que se muestran en el esquema A y en el esquema B.

En otros aspectos de la presente invención, se evalúa la actividad del nuevo derivado de dipéptido de muramilo de la presente invención. La seguridad del nuevo derivado de dipéptido de muramilo de la presente invención se establece mediante ensayos de citotoxicidad y pirogenicidad.

40 En otro aspecto, la presente invención da a conocer la utilización de un nuevo derivado de muramildipéptido ácido

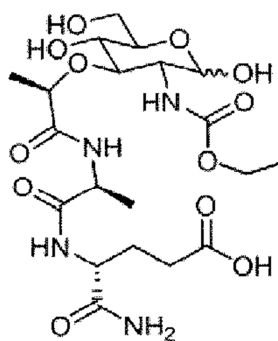
(4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico como adyuvante para ser utilizado en preparaciones farmacéuticas y formulaciones de vacunas.

- 5 Además, en realizaciones adicionales de la presente invención, se muestra que la inmunogenicidad in vivo del nuevo derivado de dipéptido muramilo de la presente invención produce un aumento, como mínimo, de 4 veces en los títulos de anticuerpos cuando se utiliza como adyuvante con varios antígenos de vacunas, por lo que es capaz de generar tanto la respuesta inmunitaria humoral como la mediada por células.
- 10 En una realización general, la presente invención da a conocer un compuesto derivado del dipéptido muramilo VIII



en el que R es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo, butilo.

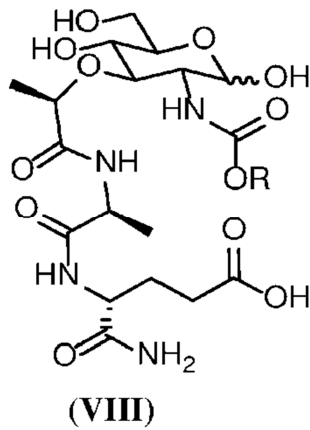
- 15 En una realización, el compuesto es ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico (MDP-ET), tal como se muestra en la estructura siguiente.



(MDP-ET)

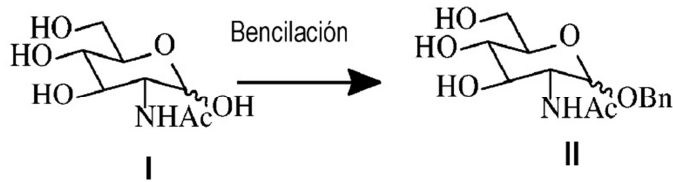
- 20 El compuesto MDP-ET se caracteriza por un IR (ν en cm^{-1}): 3273, 2936, 1653, 1552, 1417, 1253, 1026. El compuesto MDP-ET se caracteriza, además, por un RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6): δ 4,66 (d, $J = 6,421$, 1H), 4,25 (m, 1H), 3,96 (m, 3H), 3,37 (c, $J = 6,987$, 3H), 3,19-3,16 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,99 (m, 1H), 1,24 (m, 4H), 1,15 (d, $J = 6,409$, 3H), 1,08 (t, $J = 6,987$, 3H).
- 25

En otra realización, la presente invención da a conocer un proceso para la preparación de un compuesto derivado del dipéptido muramilo de fórmula VIII.



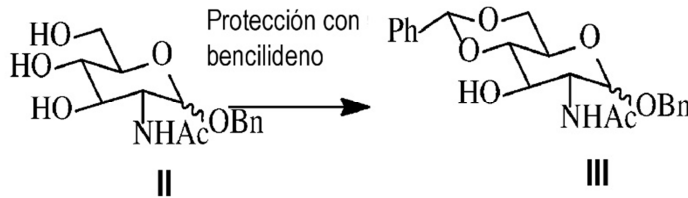
que comprende las etapas de:

- 5 a. bencilación anomérica de un compuesto de fórmula I para obtener un compuesto de fórmula II;

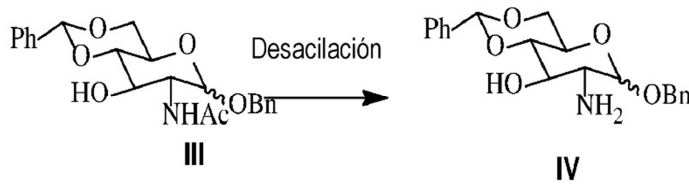


10

- b. protección con bencilideno del compuesto de fórmula II para obtener un compuesto de fórmula III;

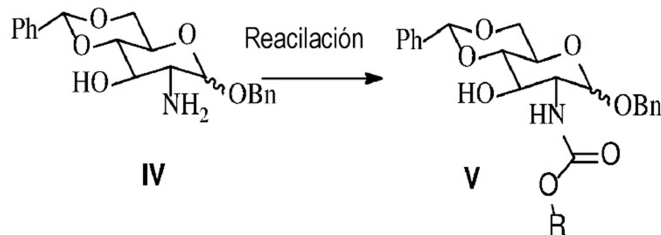


- c. desacilación del compuesto de fórmula III para obtener un compuesto de fórmula IV;



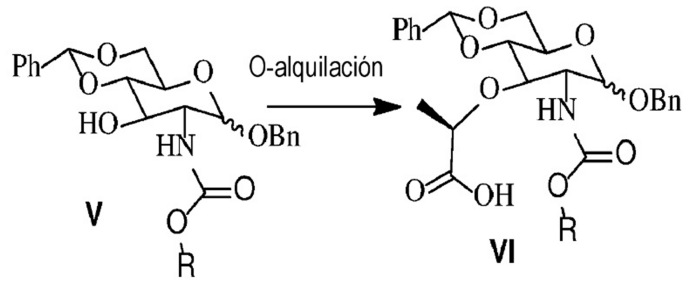
15

- d. reacilación del compuesto de fórmula IV con un agente acilante adecuado en presencia de un disolvente para obtener un compuesto de fórmula V;



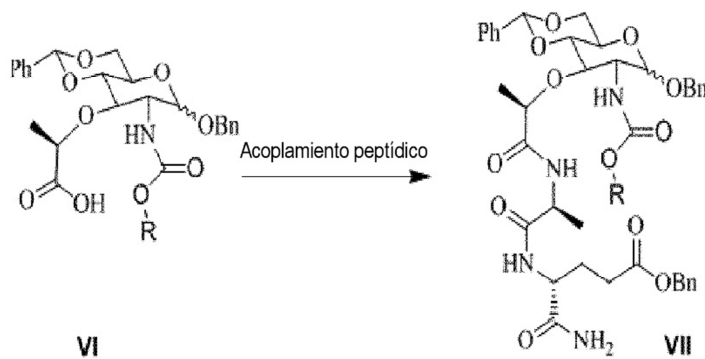
20

- e. O-alkilación del compuesto de fórmula V por tratamiento con ácido L-2-cloropropanoico en presencia de un disolvente para obtener un compuesto de fórmula VI;

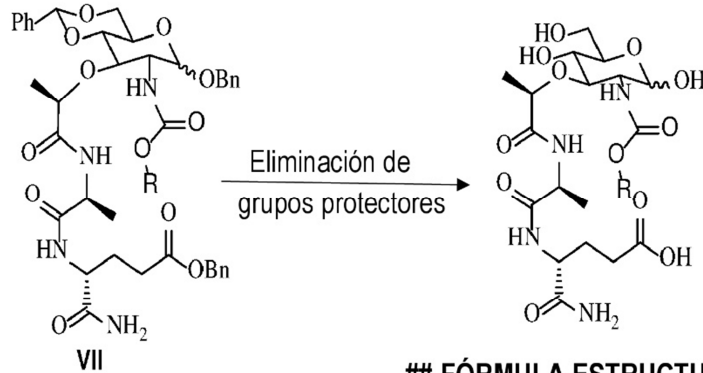


f. acoplamiento de un péptido tratando el compuesto de fórmula VI con trifluoroacetato de éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina en un disolvente para obtener un compuesto de fórmula VII;

5



g. desprotección del compuesto de fórmula VII para obtener el compuesto deseado representado por la fórmula VIII;



FÓRMULA ESTRUCTURAL VIII

10

en los que R en los compuestos anteriores es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo, butilo.

El agente acilante en la etapa (d) se puede seleccionar entre cloroformiato de alquilo y cloroformiato de alcoxilquilo.

15

En una realización, el agente acilante es, preferentemente, cloroformiato de etilo.

El disolvente en la etapa (d) se puede seleccionar entre piridina anhidra, diisopropilamina, trietilamina y N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) o una mezcla de los mismos. Y el disolvente en la etapa (e) es dioxano anhidro.

20

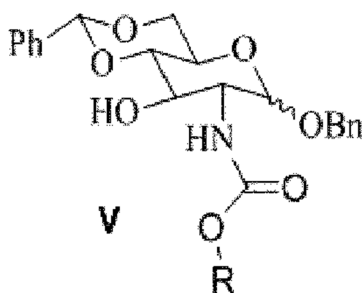
El disolvente en la etapa (f) se puede seleccionar entre ácido trifluoroacético (TFA) y tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos.

25

El acoplamiento en la etapa (f) se lleva a cabo en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) e hidroxibenzotriazol (HOBt).

La desprotección en la etapa (g) se realiza con ácido acético glacial.

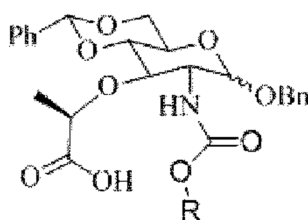
En una realización, la presente invención da a conocer un compuesto de fórmula V:



en el que R es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo, butilo.

5

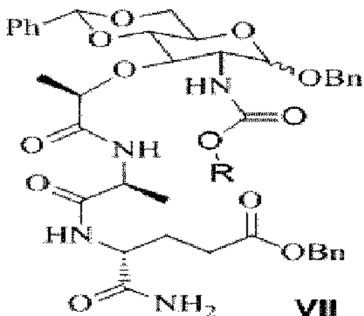
En otra realización, la presente invención da a conocer un compuesto de fórmula VI:



en el que R es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo, butilo.

10

En otra realización, la presente invención da a conocer un compuesto de Fórmula VII:



en el que R es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo, butilo.

15

En otra realización, la presente invención da a conocer un compuesto de ((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-7-il)carbamato de etilo caracterizado por un RMN de ¹H (CDCl₃): 7,2-7,5 (m, 10H), 5,6 (s, 1H), 5,4 (s, 1H), 4,7 (d, 1H), 4,6 (d, 1H), 4,4 (d, 1H), 4,2 (d, 1H), 3,7-3,9 (m, 4H), 1,4 (t, 3H), ESI MS: 430 (M⁺).

20

En otra realización, la presente invención da a conocer un compuesto de ácido (2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico caracterizado por un RMN de ¹H (CDCl₃): 7,2-7,6 (m, 10H), 5,6 (s, 1H), 5,1 (s, 1H), 4,9-3,94 (m, 7H), 3,8-3,4 (m, 4H), 1,4 (d, 2H), 1,3 (t, 3H); ESI MS: 502 (M⁺).

25

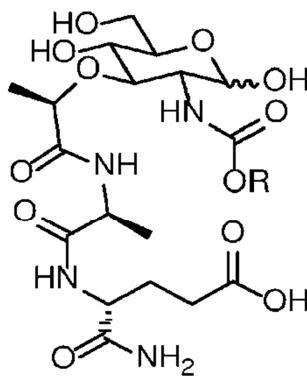
En otra realización, la presente invención da a conocer un compuesto de (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo caracterizado por RMN de ¹H (CDCl₃): 7,5 (m, 2H), 7,2-7,4 (m, 11H), 6,9 (d, 2H) 5,5 (s, 1H), 5,2 (d, 1H), 4,9 (d, 1H), 4,7 (d, 1H), 4,5 (d, 1H), 4,4 (t, 1H), 4,2 (m, 2H), 4,0 (m, 2H), 3,75 (m, 3H), 3,5 (m, H), 2,5 (s, 1H), 1,5-1,7 (m, 7H) 1,4 (t, 3H), 1,2 (t, 3H) ESI MS: 792 (M⁺+1).

30

En otra realización, la presente invención da a conocer un proceso para la preparación de ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico (MDP-ET)) que comprende las etapas de:

35

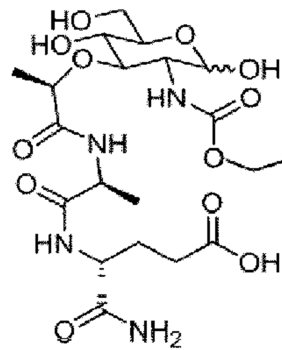
- (a) bencilación anomérica de N-acetil D-glucosamina (I) para obtener 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de bencilo (II);
- (b) protección con bencilideno de 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de bencilo (II) para obtener 2-acetamido-4,6-O-benciliden-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo (III);
- 5 (c) desacilación de 2-acetamido-4,6-O-benciliden-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo (III) para obtener 2-amino-4,6-O-benciliden-2-desoxi- α -D-manopiranosido de bencilo (IV);
- (d) reacilación con un agente acilante orgánico, cloroformiato de etilo, en presencia de piridina anhidra como disolvente de 2-amino-4,6-O-benciliden-2-desoxi- α -D-manopiranosido de bencilo (IV) para obtener
- 10 ((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-7-il)carbamato de etilo (V);
- (e) O-alkilación de ((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-7-il)carbamato de etilo (V) en presencia de dioxano anhidro como disolvente para obtener el ácido (2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico (VI);
- 15 (f) acoplamiento peptídico de ácido (2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico (VI) con trifluoroacetato de éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina para obtener (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo (VII);
- 20 (g) desprotección de (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo (VII) en presencia de ácido acético glacial para obtener el ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico.
- 25 En otra realización, la presente invención da a conocer la utilización del compuesto VIII o MDP-ET como adyuvante en la formulación de vacunas con un antígeno, en el que el antígeno se puede seleccionar entre un antígeno vacunal atenuado vivo, un antígeno vacunal inactivado, un antígeno vacunal subunitario, un antígeno vacunal conjugado y un antígeno vacunal recombinante o cualquier combinación de los mismos.
- 30 En otra realización, la presente invención da a conocer una formulación de vacuna que comprende un compuesto de fórmula VIII como adyuvante.



- 35 en el que R es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo, butilo.

En otra realización, la presente invención da a conocer una formulación de vacuna que comprende el compuesto ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico (MDP-ET), tal como se muestra en la estructura siguiente, como adyuvante

40



En el que la formulación de vacuna se puede seleccionar entre una vacuna bacteriana, una vacuna viral o cualquier patógeno infeccioso potencial contra mamíferos.

5

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1: la figura representa la curva de respuesta a la dosis de MDP-ET. El eje X representa la concentración en escala logarítmica y el eje Y representa el % de respuesta. Los valores del eje Y se normalizaron tomando el valor más pequeño o la absorbancia baja como el 0 % y el valor más grande o la absorbancia elevada como el 100 %. Este gráfico indica una EC_{50} de 0,22 $\mu\text{g/ml}$, la concentración a la que el adyuvante muestra la mitad de la respuesta máxima. Cada punto del conjunto de datos se representa como promedio \pm D.E., que se obtuvo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

10

Figura 2: la figura representa la toxicidad celular de MDP-ET. El eje X representa la concentración en escala logarítmica y el eje Y representa el % de toxicidad. Este gráfico indica una IC_{50} de 410 $\mu\text{g/ml}$. Se descubrió que la concentración requerida para causar la muerte celular era de 410 $\mu\text{g/ml}$. Cada punto del conjunto de datos se representa como promedio \pm D.E., que se obtuvo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

15

Figura 3: efecto del análogo de MDP-ET sobre la proliferación de esplenocitos.

20

Figura 4: respuestas de hipersensibilidad de tipo retardada en ratones a los que se les administró MDP-ET+OVA, MDP+OVA y OVA y PBS solos.

Figura 5a: esta figura muestra un título de punto final específico de hepatitis B en presencia y ausencia de MDP-ET. Los números entre paréntesis indican la concentración de MDP-ET administrada para vacunación junto con HBsAg. El eje Y representa la dilución de sueros analizada en ELISA.

25

Figura 5b: esta figura representa la polarización T_H1 y T_H2 obtenida en presencia y ausencia de MDP-ET. Los números entre paréntesis indican la concentración de MDP-ET administrada para vacunación junto con HBsAg.

30

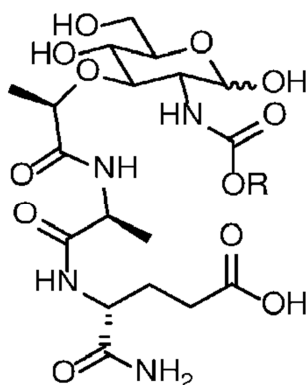
Figura 5c: esta figura muestra el título de punto final de anticuerpos de rPvRII en presencia y ausencia de MDP-ET. Los números entre paréntesis indican la concentración de MDP-ET administrada para vacunación junto con rPvRII. El eje Y representa la dilución de sueros analizada en ELISA.

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer nuevos compuestos derivados del dipéptido muramilo (MDP) de fórmula general VIII, el proceso de síntesis, nuevos compuestos intermedios utilizados en la síntesis y utilizaciones de los mismos como adyuvantes en preparaciones inmunogénicas.

40

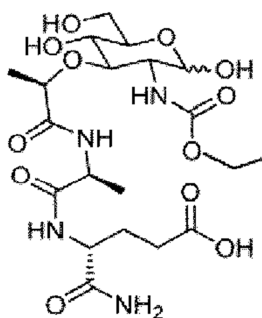


Fórmula estructural general VIII

5 R es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo, butilo. En una realización, el alquilo es etilo (R = etilo). El grupo arilo de ejemplo se puede seleccionar, sin limitación, entre fenilo, naftilo, tienilo, indolilo, etc. El grupo arilo puede ser un arilo sustituido.

10 R en la fórmula VIII es alquilo, en el que alquilo es tal como se ha definido anteriormente. Cuando R es alquilo (R = alquilo), el nuevo compuesto derivado del dipéptido muramilo de fórmula VIII de la presente invención es ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((alcoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico.

15 En una realización, R en la fórmula VIII es etilo (R = etilo). Cuando R es etilo, el nuevo compuesto derivado del dipéptido de muramilo de la presente invención es ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico, tal como se muestra a continuación en la fórmula estructural VIII (cuando R es etilo):



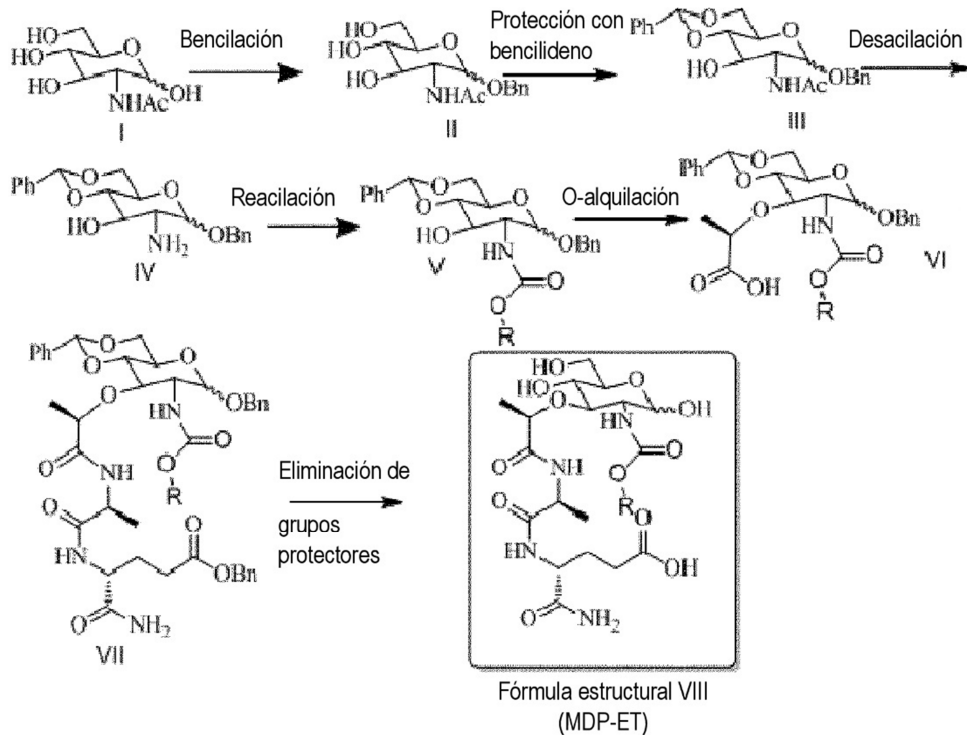
(MDP-ET)

20 [Fórmula VIII, cuando R = Etilo]

25 Los nuevos compuestos derivados del dipéptido de muramilo de fórmula general VIII (cuando R es tal como se define anteriormente), que incluyen el derivado de alcoxicarbonilo (cuando R es alquilo) y el ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico de fórmula VIII (cuando R es etilo), se sintetizan secuencialmente mediante las etapas de reacción que se muestran a continuación y que se mencionan por separado en el esquema A y el esquema B.

30 Los nuevos compuestos derivados de MDP que tienen la fórmula estructural general VIII, incluida la fórmula VIII cuando R es alquilo (derivado de alcoxicarbonilo) o R es etilo (MDP-ET), tal como se han mostrado anteriormente, se sintetizan según el proceso representado en el esquema B. Además, el compuesto de partida, éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina, que se utilizó en la síntesis de los nuevos compuestos derivados de MDP que tienen la fórmula estructural general VIII, incluida la fórmula VIII cuando R es alquilo o etilo (MDP-ET), tal como se muestra a continuación en el esquema B, se sintetizó, según el esquema A (síntesis del dipéptido de partida) que se muestra a continuación. A partir del mismo, se obtienen nuevos compuestos derivados de MDP de fórmula VIII que incluyen MDP-ET, según reacciones por etapas, tal como se menciona en el esquema B.

El **ESQUEMA-B** para la síntesis del derivado del péptido muramilo de fórmula estructural-VIII se representa a continuación:



5

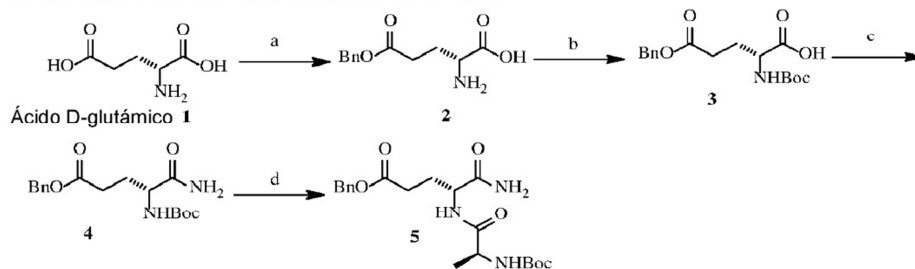
En el que R = alquilo (tanto lineal como ramificado), arilo, arilo sustituido y alcoxilquilo.
Cuando R = etilo, la fórmula VIII es MDP-ET.

ESQUEMA-B

10

El **ESQUEMA-A** para la síntesis del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina del nuevo compuesto de dipéptido muramilo se representa a continuación:

ESQUEMA PARA LA SÍNTESIS DEL DIPÉPTIDO



15

Reactivos y condiciones: a) BnOH, BF₃·Et₂O, t.a., 15 horas, 94 %; b) NaHCO₃, (Boc)₂O, THF, H₂O, t.a., 12 horas, 96 %; c) ClCOOEt, Et₃N, NH₄OH, THF 0 °C a -15 °C, 1,5 horas, 9 %; d) i. TFA:CH₂Cl₂, seguido de ii. Boc-Ala, EDCl, DIPEA, THF, 0 °C a t.a., 6 horas, 87 %

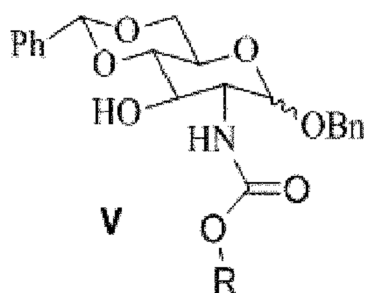
20

ESQUEMA A

En otro aspecto, la presente invención da a conocer nuevos compuestos intermedios de fórmula general V, VI y VII, tal como se han mostrado anteriormente en el esquema B, que se utilizan en la síntesis de nuevos compuestos derivados de MDP de fórmula general VIII anterior.

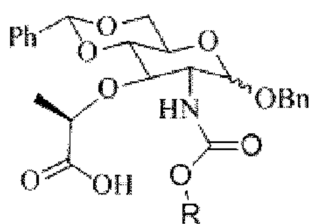
25

En una realización, la presente invención da a conocer un compuesto intermedio con fórmula estructural V, tal como se representa a continuación:



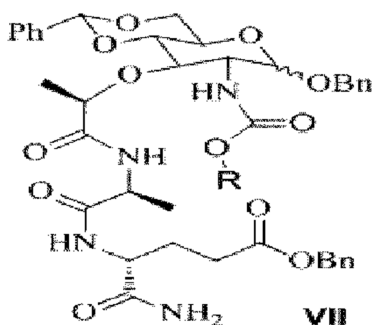
En una realización, la presente invención da a conocer un compuesto intermedio con fórmula estructural VI, tal como se representa a continuación:

5



En una realización, la presente invención da a conocer un compuesto intermedio con fórmula estructural VII, tal como se representa a continuación:

10



R en cualquiera de la fórmula V, fórmula VI y fórmula VII generales se selecciona entre cualquier grupo alquilo (tanto lineal como ramificado), arilo, arilo sustituido y alcoxilalquilo, tal como se ha definido anteriormente.

15

En una realización, R en los compuestos intermedios anteriores de fórmula V, fórmula VI y fórmula VII generales es alquilo.

En una realización, el compuesto intermedio de:

20

- La fórmula V es ((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-7-il)carbamato de etilo;

- La fórmula VI es ácido (2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico; y

25

- La fórmula VII es (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un proceso para la síntesis de un nuevo compuesto derivado de MDP de fórmula VIII que implica las etapas de reacción que se describen en el esquema A anterior (síntesis del éster bencilico de L-alanil-D-isoglutamina) y el esquema B (síntesis del nuevo derivado de MDP de fórmula VIII).

30

El compuesto **2** se sintetiza proporcionando una mezcla de ácido D-glutámico [compuesto **1**] y sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) suspendido en alcohol bencilico y trifluoruro de boro (BF₃). A esta mezcla se le añade éter dietílico y la suspensión se agita a temperatura ambiente (t.a.), seguido de dilución con THF absoluto y filtración con ayuda

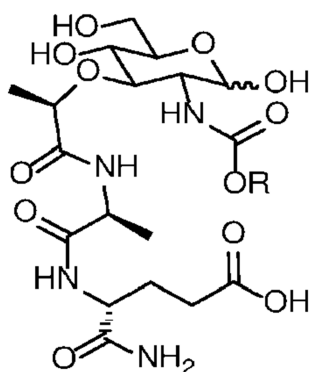
de carbón vegetal. El tratamiento posterior con trietilamina, concentración, precipitación, seguido de lavado proporciona el ácido (*R*)-2-amino-5-(benciloxi)-5-oxopentanoico [compuesto 2].

El compuesto 3 se prepara proporcionando una solución del compuesto 2, añadiendo dicarbonato de di-*tert*-butilo (Boc_2O) en dioxano y agua a baja temperatura, tal como 0 °C y agitando durante toda la noche. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se diluye con agua, se basicifica con carbonato de sodio (Na_2CO_3) y se lava con acetato de etilo (EtOAc), se ajusta a pH 2-3 con una solución acuosa de HCl y se extrae con EtOAc, seguido de procesamiento adicional para obtener el ácido (*R*)-5-(benciloxi)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-5-oxopentanoico [compuesto 3].

El compuesto 4 se sintetiza proporcionando el compuesto 3 en tetrahidrofurano (THF), añadiendo cloroforniato de etilo y trietilamina a baja temperatura, tal como 0 °C. La mezcla de reacción se agita a baja temperatura y, a continuación, se enfría hasta baja temperatura (tal como -15 °C), seguido de la adición de una solución metanólica de amoníaco y se enfría posteriormente hasta temperatura negativa y se le añade acetato de etilo. Después de lavar la fase orgánica con agua, seguido de lavado con solución acuosa saturada de cloruro sódico, secado, eliminación del disolvente al vacío y purificación, se obtiene el (*R*)-5-amino-4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoato de bencilo [compuesto 4].

Se disuelve el éster bencílico de *t*-butoxicarbonil-D-isoglutamina [compuesto 4] en ácido trifluoroacético frío y la solución resultante se agita a temperatura ambiente y, a continuación, se elimina el ácido trifluoroacético y el residuo se tritura con éter dietílico (Et_2O) para obtener trifluoroacetato de éster bencílico de D-isoglutamina oleoso. Por separado, a *t*-butoxicarbonil-L-alanina en THF anhidro, se añaden 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) e hidroxibenzotriazol (HOBt) y se agita a temperatura ambiente. A esta solución, se añade trifluoroacetato de éster bencílico de D-isoglutamina (disuelto en THF), seguido de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA). Después de agitar y concentrar, el residuo se extrae con EtOAc, se lava y se seca para obtener un residuo. Después un lavado posterior y recristalización, se proporciona (*R*)-5-amino-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo [compuesto 5].

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un proceso para la preparación de un compuesto derivado de dipéptido de muramilo de fórmula VIII.



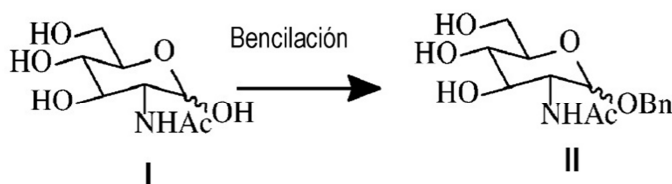
Fórmula VIII

en la que R es tal como se define en los párrafos anteriores.

El proceso comprende las siguientes etapas (a) a (g):

Etapa-a: Bencilación anomérica de N-acetil D-glucosamina (I):

La etapa (a) implica la bencilación anomérica de un compuesto de fórmula I para obtener un compuesto de fórmula II, tal como se presenta esquemáticamente a continuación:



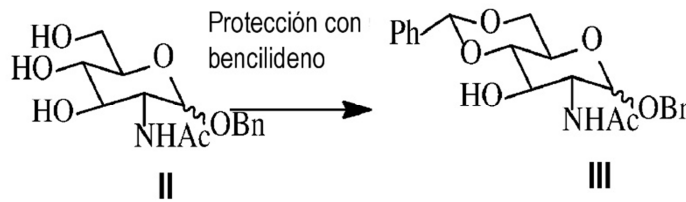
La bencilación anomérica tiene lugar tratando el compuesto de fórmula I con alcohol bencílico con agitación. La

reacción se puede llevar a cabo en presencia de una resina de intercambio iónico, tal como Amberlite u otra resina. La reacción se puede realizar a una temperatura de, aproximadamente, 70 a 90 °C. Preferentemente, en una realización, la agitación se realiza a 80 °C y la evaporación se realiza a 90 °C.

5 El residuo después de la filtración de la mezcla se recoge en disolventes alcohólicos calientes y se filtra. Preferentemente, el disolvente alcohólico utilizado es isopropanol. La cristalización posterior proporciona un sólido cristalino blanco. El sólido obtenido se puede lavar con un disolvente alcohólico, tal como isopropanol y, a continuación, con éter.

10 **Etapa-b: Protección con bencilideno**

La etapa (b) implica la protección con bencilideno del compuesto de fórmula II para obtener un compuesto de fórmula III, tal como se presenta esquemáticamente a continuación;



15 Esta protección con bencilideno se realiza tratando el compuesto de fórmula estructural II con benzaldehído anhidro. La reacción se puede realizar en presencia de cloruro metálico. En una realización, el cloruro metálico utilizado es cloruro de zinc.

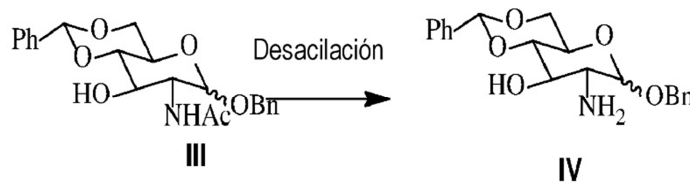
20 La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 18 a 22 horas, preferentemente, durante 20 horas y, a continuación, se agita a 35 a 45 °C, preferentemente, a 40 °C durante 3 a 5 horas para disolver una pequeña cantidad de sólido restante, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 16 a 20 horas, preferentemente, 18 horas.

25 Después de agitar adecuadamente, la solución de reacción se diluye con disolventes, se agita y se almacena. En una realización, la solución de reacción se diluye con éter de petróleo, etanol absoluto y agua (H₂O), seguido de agitación adicional a temperatura ambiente durante 1-2 días y se almacena a 0 °C durante 8 a 12 días.

30 El precipitado formado se lava y se resuspende en disolvente. En una realización, el disolvente de lavado es EtOH absoluto y se resuspende en éter dietílico. Después de secar se obtiene 2-acetamido-4-6-O-benciliden-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo [compuesto III]. El secado se puede realizar al vacío a temperatura ambiente sobre pentóxido de fósforo (P₂O₅).

35 **Etapa-c: Desacilación**

La etapa (c) implica la desacilación del compuesto de fórmula III para obtener un compuesto de fórmula IV, tal como se presenta esquemáticamente a continuación;



40 La desacilación de la fórmula III se lleva a cabo tratando con alcohol, tal como etanol absoluto, en presencia de una base, seguido de reflujo. La base puede ser hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de litio (LiOH), hidróxido de calcio (CaOH), etc. En una realización, la base utilizada es hidróxido de potasio (KOH).

45 El reflujo se realiza bajo nitrógeno (N₂) durante 8-12 horas, preferentemente, 10 horas y, a continuación, se vierte en agua caliente.

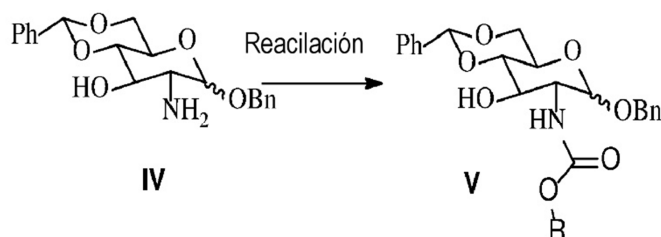
50 La suspensión se agita a baja temperatura (tal como -5 °C) durante toda la noche durante 14 a 18 horas, preferentemente, 16 horas.

El producto obtenido se filtra y se recrystaliza. La recrystalización se puede realizar en un disolvente, tal como agua, alcohol, tal como etanol, tetrahidrofurano (THF), éter diisopropílico o una mezcla de los mismos. En una realización,

el producto se recristaliza en EtOH-agua, seguido de la recristalización en tetrahidrofurano y éter diisopropílico (THF e i-Pr₂O).

Etapa-d: Acilación

La etapa (d) implica volver a acilar el compuesto de fórmula IV con un agente acilante adecuado en presencia de un disolvente básico, para obtener un compuesto de fórmula V, tal como se presenta esquemáticamente a continuación;



El agente acilante adecuado es un agente acilante orgánico seleccionado entre cloroformiato de alquilo, cloroformiato de alcoxilalquilo, en el que el grupo alquilo comprende estructuras tanto lineales como ramificadas, cloroformiato de arilo y un grupo arilo sustituido. En una realización preferente, el agente acilante orgánico utilizado en la etapa (d) es cloroformiato de etilo. El agente acilante se añade lentamente.

El disolvente básico en la etapa de acilación (d) se puede seleccionar entre piridina anhidra, diisopropiletilamina, trietilamina y N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) o una mezcla de los mismos. En una realización preferente, el disolvente utilizado en la etapa (d) es piridina anhidra.

En una realización, la etapa (d) se realiza en presencia de otro disolvente orgánico adecuado. En una realización, otro disolvente orgánico utilizado en la etapa (d) es diclorometano.

El agente acilante se añade a la mezcla de reacción lentamente a baja temperatura. En una realización preferente, la mezcla de reacción se enfría hasta 0 °C y, a continuación, se añade cloroformiato de etilo, seguido de agitación y se deja reposar durante toda la noche a temperatura ambiente.

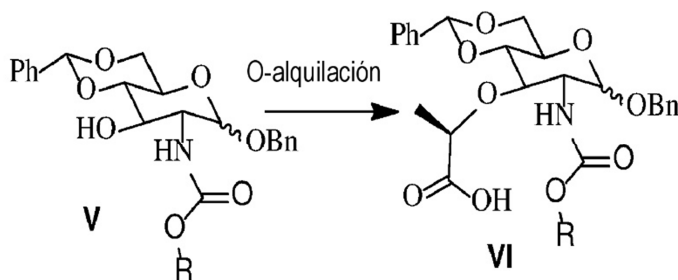
De este modo, en una realización preferente, el compuesto de fórmula IV se trata con cloroformiato de etilo en presencia de piridina anhidra como disolvente en presencia de diclorometano destilado.

A continuación, la mezcla de reacción se diluye con un disolvente, se lava, se filtra y se seca.

En una realización, la mezcla de reacción se diluye con diclorometano y se lava sucesivamente con agua, bicarbonato de sodio acuoso saturado y agua, se seca con sulfato de magnesio (MgSO₄) y, a continuación, se filtra y el filtrado se evapora a sequedad para dar el compuesto de fórmula V. Se puede realizar purificación cromatográfica, tal como cromatografía ultrarrápida en gel de sílice.

Etapa-e: O-alkilación

La etapa (e) implica la O-alkilación del compuesto de fórmula V mediante el tratamiento con ácido L-2-cloropropanoico en presencia de un disolvente para obtener un compuesto de fórmula VI;



El disolvente en la etapa de O-alkilación (e) es dioxano anhidro. También se puede utilizar cualquier otro disolvente inerte similar de alto punto de ebullición.

La reacción se puede realizar en presencia de un hidruro metálico, tal como hidruro sódico, hidruro potásico, hidruro

cálcico, etc. En una realización preferente, el hidruro metálico utilizado en la etapa (e) es hidruro sódico.

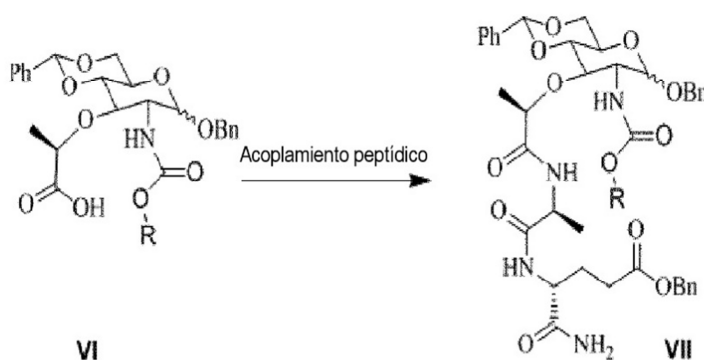
Inicialmente, el hidruro metálico se añade a una temperatura de 90 a 100 °C. Preferentemente, se añade un hidruro metálico, tal como hidruro sódico, a 95 °C.

Después de algún tiempo, tal como de 1 a 2 horas, la temperatura se baja hasta, aproximadamente, 50 a 75 °C con agitación durante toda la noche y, a continuación, se enfría con agua. En una realización, la temperatura se reduce hasta 65 °C. Después del procesamiento posterior, extracción y secado, se obtiene el compuesto deseado de fórmula VI.

La mezcla acuosa del compuesto se puede extraer con disolventes, tales como éter dietílico, cloroformo o una combinación de los mismos.

Etapa-f: Acoplamiento peptídico

La etapa (f) implica el acoplamiento del péptido tratando el compuesto de fórmula VI con trifluoroacetato de éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina, para obtener un compuesto de fórmula VII, tal como se presenta esquemáticamente a continuación;



El compuesto peptídico 5 obtenido mediante el proceso mostrado en el esquema A se acopla con el compuesto de fórmula VI. El compuesto 5 (éster bencílico de t-butoxicarbonil-L-alanil-D-isoglutamina) se disuelve en un disolvente y la solución resultante se agita a temperatura ambiente durante unos minutos. A continuación, se elimina el disolvente y el residuo se tritura con Et₂O para obtener trifluoroacetato de éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina.

El acoplamiento tiene lugar en condiciones estándar de acoplamiento de carbodiimida, tales como en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) e hidroxibenzotriazol (HOBt).

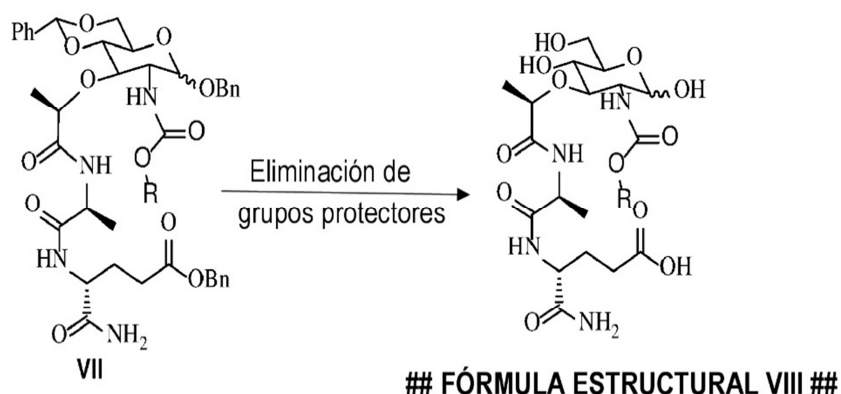
El disolvente en la etapa (f) se puede seleccionar entre ácido trifluoroacético (TFA) y tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos. En una realización, el disolvente utilizado en la etapa (f) es ácido trifluoroacético frío (TFA). En otra realización, el disolvente utilizado en la etapa (f) es THF. En otra realización, el disolvente en la etapa (f) implica tanto TFA como THF.

La etapa (f) se puede realizar en presencia de una base. En una realización, la base es N,N-diisopropiletilamina (DIPEA).

La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 a 18 horas, preferentemente, 15 horas. Después de concentrar, el residuo se puede extraer con un disolvente orgánico, tal como cloroformo, y la fase orgánica se lava, seca y evapora. El residuo obtenido se puede purificar en columna de gel de sílice mediante elución con el disolvente, tal como cloroformo, alcoholes, tales como metanol, etanol, etc. o mezclas de los mismos. En una realización, se utiliza para la elución una mezcla de cloroformo-metanol.

Etapa-g: Desprotección

La etapa (g) implica la desprotección del compuesto de fórmula VII para obtener el compuesto deseado representado por la fórmula VIII, tal como se presenta esquemáticamente a continuación;



5 La desprotección se lleva a cabo tratando el compuesto de fórmula VII con un ácido para eliminar los grupos protectores para obtener el compuesto deseado representado por la fórmula estructural VIII, en la que R en los compuestos anteriores es alquilo (tanto lineal como ramificado), arilo, arilo sustituido, alcoxiarilo. Cuando R en los compuestos anteriores es etilo, el compuesto de fórmula VIII es MDP-ET. En una realización, el ácido utilizado en la etapa (g) para la desprotección es ácido acético glacial.

10 La desprotección se puede realizar en presencia de un catalizador. En una realización, el catalizador utilizado en la etapa (g) es negro de paladio.

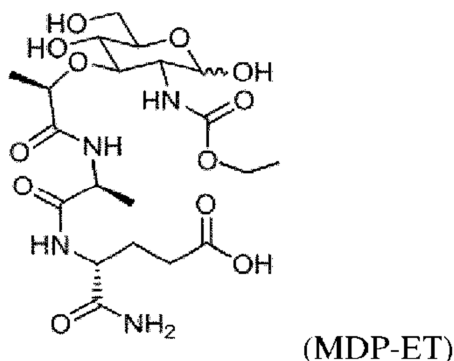
Una solución del compuesto de fórmula VII se disuelve en ácido, se le añade un catalizador y el compuesto se hidrogenoliza durante 3 a 5 días de la forma habitual.

15 El catalizador se separa por filtración y, después de la adición de agua, el filtrado se evapora a presión reducida. El residuo se puede purificar en columna. En una realización, el residuo se disuelve en un pequeño volumen de ácido acético y, a continuación, se aplica a una columna de Sephadex LH-20. Las fracciones purificadas se pueden liofilizar. Se puede seleccionar cualquier otra columna adecuada.

20 En la realización del proceso anterior, R en el compuesto derivado del dipéptido muramilo de fórmula VIII representa cualquier grupo alquilo (tanto lineal como ramificado), arilo, arilo sustituido y alcoxiarilo o tal como se define anteriormente en los párrafos anteriores.

25 En una realización preferente, R en el compuesto derivado de dipéptido de muramilo de fórmula VIII representa alquilo. En otra realización preferente, R es alquilo que es etilo.

30 En una realización preferente, el proceso descrito anteriormente da a conocer el compuesto derivado de dipéptido de muramilo de fórmula VIII que es ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico (MDP-ET), cuando R en la fórmula VIII es etilo (C₂H₅), estructuralmente tal como se presenta a continuación.



35 En otro aspecto, la presente invención da a conocer un proceso para la preparación del ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-(((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico (MDP-ET) que comprende las etapas de:

- 40 (a) bencilación anomérica de N-acetil-D-glucosamina (I) para obtener 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de bencilo (II);
 (b) protección con bencilideno de 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de bencilo (II) para obtener 2-

acetamido-4,6-O-benciliden-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo (III);

(c) desacilación de 2-acetamido-4,6-O-benciliden-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo (III) para obtener 2-amino-4,6-O-benciliden-2-desoxi- α -D-manopiranosido de bencilo (IV);

(d) reaclación con un agente acilante orgánico, cloroformiato de etilo, en presencia de piridina anhidra como disolvente, de 2-amino-4,6-O-benciliden-2-desoxi- α -D-manopiranosido de bencilo (IV) para obtener

((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-7-il)carbamato etilo (V);

(e) O-alkilación de ((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-7-il)carbamato de etilo (V) en presencia de dioxano anhidro como disolvente para obtener el ácido (2*R*)-2-((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico (VI);

(f) acoplamiento peptídico del ácido (2*R*)-2-((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico (VI) con trifluoroacetato de éster bencilico de L-alanil-D-isoglutamina para obtener (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo (VII);

(g) desprotección de (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo (VII) en presencia de ácido acético glacial para obtener el ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico (fórmula VIII (MDP-ET)), cuando R es etilo.

El proceso anterior se explica adicionalmente por medio de ejemplos que se proporcionan a continuación.

Los nuevos compuestos derivados de MDP de fórmula general VIII, que incluyen MDP-ET, poseen un elevado potencial de propiedades inmunomoduladoras.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer la utilización de nuevos compuestos derivados de MDP de fórmula general VIII, que incluyen MDP-ET, como adyuvante en las preparaciones inmunogénicas y formulaciones de vacunas.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una formulación de vacuna que comprende nuevos compuestos derivados de MDP de fórmula general VIII como adyuvante.

En aspectos adicionales de la presente invención, se evalúa la actividad del nuevo derivado de dipéptido muramilo de la presente invención. La seguridad del nuevo derivado de dipéptido muramilo de la presente invención se establece mediante ensayos de citotoxicidad y pirogenicidad.

Además, en realizaciones adicionales de la presente invención, se muestra que la inmunogenicidad in vivo del nuevo derivado de dipéptido muramilo, según la presente invención, produce un aumento, como mínimo, de 4 veces en los títulos de anticuerpos cuando se utiliza como adyuvante con diversos antígenos de vacunas, por lo que es capaz de generar tanto la respuesta inmunitaria humoral como la mediada por células.

La formulación de vacuna comprende un antígeno que se puede seleccionar entre un antígeno vacunal vivo atenuado, un antígeno vacunal inactivado, un antígeno vacunal subunitario, un antígeno vacunal conjugado y un antígeno vacunal recombinante o cualquier combinación de los mismos.

Opcionalmente, la formulación puede comprender o no comprender uno o más de los excipientes, diluyentes y otros aditivos farmacéuticamente aceptables que puedan ser necesarios para formular la formulación de vacuna.

Sin limitación, la formulación de vacuna anterior puede ser una vacuna bacteriana, una vacuna viral o cualquier patógeno infeccioso potencial contra los mamíferos.

EJEMPLOS:

Los nuevos derivados de MDP, su síntesis y los nuevos intermedios utilizados para la síntesis y evaluación de estos nuevos derivados de MDP como adyuvantes, se explican y demuestran adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, que no constituyen limitación.

Las etapas de reacción mostradas en el **esquema A** anterior se describen con más detalle en los ejemplos experimentales siguientes.

Ejemplo 1.1: ESQUEMA-A: Procedimiento experimental para la síntesis de éster bencilico de L-alanil-D-isoglutamina:

El nuevo derivado de MDP, tal como se describe y se da a conocer en la presente invención, contiene una entidad dipeptídica de L-alanil-D-isoglutamina. El éster bencilico de L-alanil-D-isoglutamina requerido para la preparación

final del nuevo compuesto de dipéptido de muramilo, según la presente invención, se sintetizó mediante el procedimiento que se muestra en el esquema A de reacción anterior y tal como se describe a continuación.

Ejemplo-1.1.1: (Etapa-a): Preparación del ácido (R)-2-amino-5-(benciloxi)-5-oxopentanoico [compuesto 2]

Una mezcla de ácido D-glutámico [compuesto 1] (4,0 g, 27,2 mmol) y sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4 en una cantidad de 4,0 g) se suspendió en alcohol bencílico (50 ml, 484 mmol) y trifluoruro de boro (BF_3). A esta mezcla se le añadió éter dietílico (Et_2O , 7,4 ml, equivalente a 54,4 mmol) por medio de una jeringa. La suspensión se agitó a temperatura ambiente (t.a.) durante 15 horas. La mezcla se diluyó con THF absoluto (150 ml) y se filtró con ayuda de carbón vegetal. El filtrado transparente se trató con trietilamina (Et_3N en una cantidad de 8,2 ml, 59,2 mmol) y se concentró al vacío hasta que se formó un residuo viscoso. Este residuo viscoso se trituró con acetato de etilo (EtOAc en una cantidad de 200 ml) y el sólido precipitado se aisló por succión y se lavó con disolvente adicional para obtener el compuesto 2 como un sólido blanco (6,04 g, 94 %, con respecto al material de partida).

Ejemplo-1.1.2 (Etapa-b): Preparación del ácido (R)-5-(benciloxi)-2-(terc-butoxicarbonilamino)-5-oxopentanoico [compuesto 3]

A una solución del compuesto 2 (6,0 g, 25,3 mmol) se le añadió dicarbonato de di-terc-butilo (Boc_2O en una cantidad de 6,62 g, 30,36 mmol) en dioxano y agua (1:1, 40 ml) a 0 °C y la mezcla se agitó durante toda la noche (16 horas). El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se diluyó con agua (30 ml), se basificó con carbonato de sodio (Na_2CO_3) y se lavó con acetato de etilo (EtOAc) (3 x 100 ml). La capa acuosa se ajustó a pH 2-3 con una solución acuosa de HCl 5 M y se extrajo con EtOAc (4 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución acuosa saturada de cloruro sódico, se secaron sobre Na_2SO_4 y el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el ácido (R)-5-(benciloxi)-2-(terc-butoxicarbonil)-5-oxopentanoico [compuesto 3] (8,19 g, 96 %) como un aceite incoloro viscoso con las siguientes características de RMN.

RMN ^1H (CDCl_3): 7,38-7,31 (m, 5H), 5,13 (s, 1H), 2,61-2,41 (m, 2H), 2,23-1,99 (m, 2H), 1,43 (s, 9H). ESI MS:

Ejemplo-1.1.3 (Etapa-c): Preparación de (R)-5-amino-4-((terc-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoato de bencilo [compuesto 4]

Se preparó una solución del compuesto 3 ácido anterior (7,0 g, 20,8 mmol) en tetrahidrofurano (THF en una cantidad de 15 ml) y se le añadió cloroformiato de etilo (2,7 ml, 28,36 mmol) y trietilamina (4,21 ml, 30,25 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 0,5 horas, a continuación, se enfrió hasta -15 °C, seguido de la adición de una solución metanólica de amoníaco (25 ml, 4,0 M). A continuación, la mezcla de reacción se agitó a -15 °C durante otras 1,5 horas y se diluyó con acetato de etilo (200 ml). La fase orgánica se lavó en primer lugar con agua tres veces (100 ml x 3) y, a continuación, se lavó con solución acuosa saturada de cloruro sódico (100 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto 4 deseado (6,63 g, rendimiento del 95 %) como un sólido blanco y con las siguientes características de RMN.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,35-7,30 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 3,70 (s, 2H), 2,58-2,42 (m, 2H), 2,31-2,19 (m, 2H) 1,43 (s, 9H); ESI MS: 337(M^+).

Ejemplo-1.1.4 (Etapa-d): (R)-5-amino-4-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo [compuesto 5]

Se disolvió éster bencílico de *t*-butoxicarbonil-D-isoglutamina [compuesto 4] (6,5 g, 19,3 mmol) en ácido trifluoroacético frío (20 ml) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se eliminó el ácido trifluoroacético y el residuo se trituró con éter dietílico (Et_2O) para obtener trifluoroacetato de éster bencílico de D-isoglutamina oleoso. El trifluoroacetato de éster bencílico de D-isoglutamina oleoso se secó sobre gránulos de hidróxido de sodio (NaOH) y se disolvió en THF.

Por separado, se mantuvo *t*-butoxicarbonil-L-alanina (4,012 g, 21,23 mmol) en THF anhidro. Se añadieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI en una cantidad de 4,46 g, 23,36 mmol) e hidroxibenzotriazol (HOBt en una cantidad de 3,57 g, 23,36 mmol) a *t*-butoxicarbonil-L-alanina (4,012 g, 21,23 mmol) en THF anhidro y se agitó a temperatura ambiente (t.a.) durante 30 minutos. A esta solución, se añadió trifluoroacetato de éster bencílico de D-isoglutamina (disuelto en THF), seguido de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA en una cantidad de 7,06 ml, 40,53 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas, a continuación, la solución se concentró y el residuo se extrajo con EtOAc (500 ml). La fase de EtOAc se lavó sucesivamente con bicarbonato de sodio al 5 % (NaHCO_3), ácido cítrico al 10 % y agua (200 ml x 3), a continuación, se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó para obtener un residuo. El residuo se trituró con éter de petróleo para formar cristales que se recrystalizaron en EtOAc-éter de petróleo para producir el compuesto 5 (6,37 g, 81 %) como un sólido blanco con las siguientes características de RMN.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,39-7,29 (m, 5H), 5,82 (s, 1H), 5,13-5,10 (m, 1H), 4,07 (m, 1H), 2,60-2,42 (m, 2H),

2,27-1,97 (m, 2H), 1,32 (d, 3H); Masa para $C_{15}H_{21}N_3O_4$: m/z calculado 307, encontrado 308 $[M + H]^+$.

Ejemplo 1.2: ESQUEMA-B:

5 Ejemplo-1.2.1: Preparación de 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de bencilo [compuesto II]

Bencilación anomérica de N-acetil D-Glucosamina (I):

10 Se agitó una mezcla de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosido [compuesto I], resina de intercambio iónico Amberlite IR 120 $[H]^+$ (15,0 g) en alcohol bencílico (125 ml) a 80 °C durante 3,5 horas. La mezcla de reacción se filtró. El filtrado se evaporó a presión reducida a 90 °C. El residuo se recogió en isopropanol caliente (60 ml) y se filtró. El filtrado se dejó cristalizar, el sólido cristalino blanco se separó por filtración, se lavó dos veces con isopropanol frío (20 ml) y dos veces con éter (200 ml) para dar 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo [compuesto II] (5,62 g, rendimiento del 27 %).

15 Ejemplo-1.2.2: Preparación de 2-acetamido-4,6-O-benciliden-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo [compuesto III]

Protección con bencilideno:

20 Se añadió 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo [compuesto II] (4,98 g, 16,01 mol) a una mezcla bien agitada de cloruro de zinc (5,0 g, 36,82 mmol) en benzaldehído anhidro (16,5 ml). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas, a continuación, se agitó a 40 °C durante 4 horas para disolver una pequeña cantidad del sólido restante y, a continuación, se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución de reacción bien agitada se diluyó en este momento con éter de petróleo (30 ml), etanol absoluto (EtOH en una cantidad de 10 ml) y 15 ml de agua (H_2O). La mezcla de reacción se agitó durante 2 días a temperatura ambiente, a continuación, se almacenó a 0 °C durante 11 días. El precipitado de color blanco floculado formado de este modo se recogió en un embudo de frita de vidrio gruesa, se drenó a fondo y, a continuación, se lavó por resuspensión en EtOH absoluto (aproximadamente 50 ml). El sólido blanco finamente dividido se drenó completamente, se volvió a suspender en éter dietílico (aproximadamente 50 ml), se volvió a drenar completamente y, a continuación, se secó al vacío a temperatura ambiente sobre pentóxido de fósforo (P_2O_5) para obtener 2-acetamido-4,6-O-benciliden-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo [compuesto III] (4,17 g, rendimiento del 65,4 %) con las siguientes características de RMN.

35 RMN de 1H ($CDCl_3$): 7,37-7,82 (m, 10H), 5,5 (s, 1H), 4,2-4,9 (m, 4H), 3,3-3,8 (m, 4H), 2,5 (s, 3H), ESI MS: 400 ($M^+ + 1$)

Ejemplo-1.2.3: Preparación de 2-amino-4,6-O-benciliden-2-desoxi- α -D-manopiranosido de bencilo [compuesto IV]:

40 Desacilación:

45 Una mezcla del compuesto III (2,8 g, 6,7 mmol), 12 g de hidróxido de potasio (KOH) y EtOH al 95 % (40 ml) se calentó a reflujo bajo nitrógeno (N_2) durante 10 horas y, a continuación, se vertió en agua caliente (150 ml). Los grumos resultantes del producto bruto se desmenuzaron. La suspensión se agitó a -5 °C durante toda la noche durante 16 horas. El producto se filtró y se recrystalizó en EtOH-agua con decoloración con carbón vegetal, seguido de recrystalización en tetrahidrofurano y éter diisopropílico (THF e $i-Pr_2O$) para obtener 2-amino-4,6-O-benciliden-2-desoxi- α -D-manopiranosido de bencilo [compuesto IV] (2,3 g, rendimiento del 95 %); p.f.: 129-131 °C; $[\alpha]_{25}^D + 57,58$ (c 2,2, DMF); IR (n en cm^{-1}): 3.450, 3.400, 750, 700; que tiene las siguientes características de RMN:

50 RMN de 1H ($CDCl_3$): 7,37-7,82 (m, 10H), 5,5 (s, 1H), 4,9-3,3 (m, 8H), ESI MS: 358 ($M^+ + 1$).

55 Procedimiento para la síntesis de ácido (4R)-5-amino-4-((2S)-2-((2R)-2-(((3R,4R,5S,6R)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico [compuesto VIII, cuando R = Etilo]:

Este producto se sintetizó tal como se describe a continuación.

60 Ejemplo-1.2.4: Preparación de ((4aR,6S,7R,8R,8aS)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-7-il)carbamato de etilo [compuesto V, cuando R = Etilo]

Acilación:

65 El compuesto IV se somete a reacilación con un agente acilante orgánico adecuado para obtener un compuesto con la fórmula estructural V, en la que dicho agente acilante orgánico se selecciona entre cloroformiato de alquilo, cloroformiato de alcoxilalquilo, en el que el grupo alquilo comprende estructuras tanto lineales como ramificadas,

cloroformiato de arilo y un grupo arilo sustituido.

A una solución del compuesto IV (1,07 g, 3,0 mmol) y piridina anhidra como disolvente (15 ml) en diclorometano destilado (30 ml), enfriada a 0 °C, se añadió lentamente cloroformiato de etilo (0,648 g, 6,0 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche (durante 16 horas) a temperatura ambiente. Se puede utilizar cualquier otro disolvente básico, tal como diisopropiletilamina, trietilamina, N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) en diclorometano en lugar de piridina anhidra. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se lavó sucesivamente con agua, bicarbonato de sodio acuoso saturado y agua, se secó con sulfato de magnesio (MgSO₄) y, a continuación, se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad para dar un sólido que se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice, utilizando diclorometano-metanol como eluyente, para dar ((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-7-il)carbamato de etilo [compuesto V] (1,09 g, rendimiento del 85 %) con las características de RMN indicadas:

RMN de ¹H (CDCl₃): 7,2-7,5 (m, 10H), 5,6 (s, 1H), 5,4 (s, 1H), 4,7 (d, 1H), 4,6 (d, 1H), 4,4 (d, 1H), 4,2 (d, 1H), 3,7-3,9 (m, 4H), 1,4 (t, 3H), ESI MS: 430 (M⁺)

Ejemplo-1.2.5: Preparación de ácido (2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico [compuesto VI, cuando R = Etilo]

20 O-alkilación:

A una solución agitada del compuesto V (0,978 g, 2,28 mmol) en dioxano anhidro (30 ml) como diluyente, se añadió hidruro de sodio a 95 °C (2,5 g) (suspensión en aceite al 60 %). En lugar de dioxano anhidro, se puede utilizar también cualquier otro disolvente inerte similar de alto punto de ebullición. Después de 1 hora, se bajó la temperatura (en otros disolventes se sube) hasta 65 °C y, a continuación, se añadió una solución de ácido L-2-cloropropiónico (1,6 g) en un pequeño volumen de dioxano. Después de 1 hora, se añadió 1 g adicional de hidruro de sodio y la reacción continuó a 65 °C con agitación y durante toda la noche (16 horas). A continuación, se añadió cuidadosamente agua (150 ml) para enfriar la mezcla de reacción. Se descartó una capa inferior de color oscuro que se reveló y la capa superior se filtró, se concentró parcialmente y se diluyó con agua (100 ml). La mezcla acuosa se extrajo con éter dietílico y la capa acuosa se acidificó a pH ~3 a 0 °C y se extrajo con cloroformo (100 ml 3 veces). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron para dar el producto deseado ácido (2*R*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico [compuesto VI] como un sólido blanco (0,926 g, rendimiento del 81 %) con las siguientes características de RMN: RMN de ¹H (CDCl₃): 7,2-7,6 (m, 10H), 5,6 (s, 1H), 5,1 (s, 1H), 4,9-3,94 (m, 7H), 3,8-3,4 (m, 4H), 1,4 (d, 2H), 1,3 (t, 3H); ESI MS: 502 (M⁺).

Ejemplo-1.2.6: Preparación de (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo [compuesto VII, cuando R = Etilo]

40 Acoplamiento peptídico:

El compuesto 5 (éster bencilico de t-butoxicarbonil-L-alanil-D-isoglutamina, 0,762 g, 1,87 mmol) que se obtuvo a partir del esquema A, tal como se describe en el ejemplo 1.1.4, se disolvió en ácido trifluoroacético frío (10 ml) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se eliminó el ácido trifluoroacético y el residuo se trituró con Et₂O para obtener trifluoroacetato de éster bencilico de L-alanil-D-isoglutamina. Este trifluoroacetato de éster bencilico de L-alanil-D-isoglutamina se secó sobre gránulos de NaOH.

Se añadieron (1-etil-3-(-3-dimetilaminopropil)carbodiimida) EDCI (0,487 g, 2,55 mmol) e (hidroxibenzotriazol) HOBt (0,390 g, 2,55 mmol) al compuesto VI (0,852 g, 1,7 mmol) en THF anhidro. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió trifluoroacetato de éster bencilico de L-alanil-D-isoglutamina (disuelto en THF), seguido de (N,N-diisopropiletilamina) DIPEA (0,64 ml, 6,05 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas, a continuación, la solución se concentró y el residuo se extrajo con cloroformo (CHCl₃ en una cantidad de 50 ml). La fase de CHCl₃ se lavó sucesivamente con NaHCO₃ al 5 %, ácido cítrico al 10 % y agua (20 ml tres veces), a continuación, se secó sobre Na₂SO₄ (sulfato de sodio) y se evaporó. El residuo obtenido se purificó en columna de gel de sílice por elución con la mezcla cloroformo-metanol para dar (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-(((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo [compuesto VII] (1,01 g, rendimiento del 75 %) con las siguientes características de RMN:

RMN de ¹H (CDCl₃): 7,5 (m, 2H), 7,2-7,4 (m, 11H), 6,9 (d, 2H) 5,5 (s, 1H), 5,2 (d, 1H), 4,9 (d, 1H), 4,7 (d, 1H), 4,5 (d, 1H), 4,4 (t, 1H), 4,2 (m, 2H), 4,0 (m, 2H), 3,75 (m, 3H), 3,5 (m, H), 2,5 (s, 1H), 1,5-1,7 (m, 7H), 1,4 (t, 3H), 1,2 (t, 3H). ESI MS: 792 (M⁺ +1).

Ejemplo-1.2.7: Preparación del ácido (4R)-5-amino-4-((2S)-2-((2R)-2-(((3R,4R,5S,6R)-3-(etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico (fórmula VIII, cuando R = Etilo):

5 Una solución del compuesto VII (0,900 g, 1,13 mmol) obtenida anteriormente se disolvió en ácido acético glacial (50 ml) y se le añadió negro de paladio (90 mg) y el compuesto se hidrogenolizó durante 3 a 5 días de la forma habitual, siendo controlado el progreso de la hidrogenólisis mediante cromatografía de capa fina. El catalizador se separó por filtración y, después de la adición de agua (30 ml), el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en un pequeño volumen de ácido acético 0,1 M y, a continuación, se aplicó a una columna (2,5 x 85 cm) de Sephadex
10 LH-20 que se reveló con el mismo disolvente. Las fracciones purificadas correspondientes al pico principal se agrupan y liofilizan. El material liofilizado se volvió a cromatografiar en las mismas condiciones para producir el compuesto VIII (MDP-ET) como cristales finos de color blanco (0,326 g, 55 %), con las siguientes propiedades:

15 Punto de fusión (p.f.): 145-147 °C; $[\alpha]_D^{25} +53,6^\circ$ (c 0,2, agua);

IR (n en cm^{-1}): 3273, 2936, 1653, 1552, 1417, 1253, 1026;

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,66 (d, $J = 6,421$, 1H), 4,25 (m, 1H), 3,96 (m, 3H), 3,37 (c, $J = 6,987$, 3H), 3,19-3,16 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,99 (m, 1H), 1,24 (m, 4H), 1,15 (d, $J = 6,409$, 3H), 1,08 (t, $J = 6,987$, 3H);

20 Masa para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{12}$: m/z calculado 522, encontrado 540 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$.

Cálculo analítico para: $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{12}$: C, 45,97; H, 6,56; N, 10,72; O, 36,74. Encontrado: C, 45,83; H, 6,72; N, 10,98; O, 36,81.

25 **Ejemplo-2: Evaluación de la actividad y seguridad de MDP-ET (*in vitro*)**

Las moléculas de dipéptido muramilo tienen la capacidad de unirse a los receptores NOD2 que están presentes en la superficie de las células inmunitarias para estimular la respuesta inmunitaria. El receptor NOD2 (dominio de oligomerización de nucleótidos) es un receptor de reconocimiento de patrones intracelulares (PRR) que reconoce los derivados del dipéptido muramilo y estimula la cascada de vías de señalización para inducir la respuesta inmunitaria. Para demostrar si el MDP-ET sintetizado en la presente invención estimula los receptores NOD2, se adquirieron líneas celulares informadoras de NOD2 humanas HEK-Blue de Invivogen, California, EE.UU. Estas células se prepararon mediante transfección conjunta del gen de NOD2 humano y el gen informador de SEAP (fosfatasa alcalina embrionaria secretada, *secreted embryonic alkaline phosphatase*) con codones optimizados en células HEK 293. Tras la estimulación de las células con el derivado de dipéptido muramilo, se activa NF κ B, que a su vez secreta SEAP y se midió en el sobrenadante celular. Los detalles experimentales de este ensayo *in vitro* se indican como ejemplo 2.1.

40 **Ejemplo 2.1: Ensayo de informador específico de NOD2:**

Se sembraron células informadoras de NOD2 humanas HEK-Blue (5×10^4 /pocillo) en placas y se cultivaron durante toda la noche en una incubadora con CO_2 humidificada a 37 °C. Al día siguiente, las células se trataron con diversas concentraciones de MDP-ET (de 0,001 mg/ml a 1 mg/ml) y se cultivaron durante 24-72 horas. El sobrenadante se recogió y se trató con el reactivo de detección Quanti blue a 37 °C durante 15-30 minutos. La absorbancia se leyó a 630 nm. La curva de respuesta a la dosis generada al representar la concentración de adyuvante en el eje X y el % de respuesta en el eje Y se muestra en la figura 1. Para generar la curva de respuesta a la dosis, la absorbancia más elevada mostrada en la concentración probada se tomó como una respuesta del 100 % y la absorbancia mínima se tomó como el 0 % de respuesta. La respuesta a la concentración efectiva al 50 % (EC_{50}) se determinó a partir de la curva de respuesta a la dosis. En la presente invención, el MDP-ET muestra una respuesta máxima del 100 % con una absorbancia elevada a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (alcanzó una meseta a esta concentración en la curva sigmoide), mientras que muestra una respuesta del 0 % con una absorbancia baja a una concentración de 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Estos resultados indicaron una EC_{50} de 0,22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (concentración a la que el MDP-ET mostró la mitad de la respuesta máxima). En conclusión, los resultados obtenidos indicaron que el nuevo MDP-ET sintetizado en la presente invención es capaz de estimular los receptores NOD2, lo que a su vez determina adicionalmente la eficacia para estimular o potenciar la respuesta inmunitaria y actuar como adyuvante.

Para demostrar si este MDP-ET en particular provoca citotoxicidad celular, se realizó un ensayo citotóxico in-vitro en células J774.2A utilizando MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. Los detalles de un ensayo son tal como se explican en el ejemplo 2.2.

Ejemplo 2.2: Ensayo de citotoxicidad:

65 Se sembraron células J774.2A (2×10^4 /pocillo) en placas y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, las células se trataron con diversas concentraciones de MDP-ET (diluciones de 10 veces con una concentración que variaba de 0,005 mg/ml a 0,5 mg/ml y 2 mg/ml) y se cultivaron durante 24 horas. Se descartó el sobrenadante y las

células se trataron con 100 µl de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (5 mg/ml) y se incubaron durante 3-4 horas hasta que se formaron cristales de formozán. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y los cristales se disolvieron con DMSO durante 5-10 minutos. La absorbancia se leyó a 540 nm. La figura 2 representa el efecto de toxicidad celular de MDP-ET. El eje X representa la concentración en escala logarítmica y el eje Y representa el % de toxicidad. Este gráfico indicó una IC₅₀ de 410 µg/ml, la concentración a la que el MDP-ET provoca un 50 % de muerte celular o efecto de toxicidad.

En general, la pirogenicidad de cualquier molécula se puede medir por la sobreproducción de citocinas proinflamatorias IL-1β, IL-6 y TNFα, seguido de una activación de los monocitos *in vitro*, lo que a su vez podría ser indicativo de una mayor reactividad *in vivo*. Por lo tanto, en la presente invención, se probó la pirogenicidad *in vitro* del MDP-ET. Los detalles experimentales se han mencionado, a continuación, como un ejemplo 2.3. Para determinar si el MDP-ET sintetizada en la presente invención es pirogénica o no, se realizó una prueba de pirógenos *in vitro* utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*).

50 Ejemplo 2.3: Prueba de pirógenos *in vitro*:

Se revivieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) congeladas y se sembraron (0,5 × 10⁶ células/ml, 100 µl) en una placa de cultivo celular de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se complementaron con medio RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, Nueva York) que contenía suero bovino fetal (10 %), glutamina (2 mM) y penicilina-estreptomina. Las células se estimularon posteriormente con LPS (10 ng/ml) o endotoxina (1 UE/ml, 0,5 UE/ml, 0,25 UE/ml, 0,125 UE/ml) o MDP-ET (10 o 100 µg/ml). Las células estimuladas con LPS o endotoxina se incubaron durante 4 horas, mientras que las células estimuladas con derivados de MDP de la presente invención se mantuvieron en incubación en una cámara de CO₂ humidificada a 37 °C durante 24 horas. Después de la estimulación, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se midieron las citocinas (tales como IL-1β, IL-6 o TNF-α) mediante ELISA. Se midieron por triplicado las concentraciones de cada citocina producida por las PBMC en presencia de endotoxina estándar de referencia a 0,5 UE/ml. Se calcularon los niveles umbral para cada citocina utilizando los niveles de citocina producidos por la endotoxina estándar de referencia a 0,5 EU/ml (Marina et al., Vaccine 30 (2012) 4859-4865).

55 Ejemplo 2.3.1: Determinación de IL-1beta mediante ELISA:

Para determinar la interleucina 1β, se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), según el manual de instrucciones (ebioscience, n.º de catálogo 88-7010). De manera resumida, el anticuerpo de captura (n.º de catálogo 14-7018-67, eBioscience) se diluyó en primer lugar 1:250 utilizando tampón de recubrimiento y se añadieron 100 µl a cada pocillo en una microplaca de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante toda la noche a 2-8 °C. A continuación, las placas recubiertas se lavaron con tampón de lavado (PBST). Después del lavado, estas placas se bloquearon utilizando diluyente de ensayo 1X durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavado con PBST. Se realizaron una serie de diluciones dobles a partir del patrón superior que variaba entre 4 y 500 pg/ml para construir la curva patrón. De manera similar, se prepararon diluciones de 4 veces (1:4, 1:16 y 1:64) del sobrenadante celular obtenido de la estimulación de PBMC con MDP-ET. Se añadieron alícuotas (100 µl) de patrones diluidos o sobrenadantes celulares al pocillo por duplicado y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la placa, se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo de detección (n.º de catálogo 33-7016-67) diluido en diluyente de ensayo 1X y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 100 µl/pocillo de avidina-HRP* diluida en diluyente de ensayo 1X y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, después de los lavados, se añadieron 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2N a cada pocillo y la placa se leyó a 450 nm.

60 Ejemplo 2.3.2: Determinación de IL-6 mediante ELISA:

Para determinar la interleucina 6 (IL-6), se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), según el manual de instrucciones (ebioscience, n.º de catálogo 88-7066). De manera resumida, el anticuerpo de captura (n.º de catálogo 14-7069-67, eBioscience) se diluyó en primer lugar 1:250 con tampón de recubrimiento y se añadieron 100 µl a cada pocillo en una microplaca de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante toda la noche a 2-8 °C. A continuación, las placas recubiertas se lavaron cuatro veces (350 µl/pocillo) con tampón de lavado 1X preparado previamente mediante la dilución de un concentrado 20X con agua desionizada. Después del lavado, las placas se invirtieron y se secaron sobre papel absorbente para eliminar cualquier tampón residual. Estas placas se bloquearon utilizando diluyente de ensayo (250 µl/pocillo) durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de cuatro lavados (350 µl/pocillo) con tampón de lavado 1X. Se realizaron una serie de diluciones dobles a partir del patrón superior que variaba de 0 a 200 pg/ml, para construir la curva patrón. De manera similar, se prepararon diluciones de 4 veces (1:4, 1:16 y 1:64) del sobrenadante celular obtenido de la estimulación de PBMC con MDP-ET. Se añadieron alícuotas (100 µl) de patrones diluidos o sobrenadantes celulares al pocillo por duplicado y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la placa, se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo de detección (n.º de catálogo 33-7068-67, eBioscience) diluido en diluyente de ensayo 1X y se incubaron

a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 100 μ l/pocillo de avidina-HRP* diluida en diluyente de ensayo 1X y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, después de los lavados, se añadieron 100 μ l de solución de sustrato a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l de solución de parada a cada pocillo y la placa se leyó a 450 nm.

Ejemplo 2.3.3: Determinación de TNF-alfa mediante ELISA:

Para determinar el factor de necrosis tisular alfa (TNF- α), se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), según el manual de instrucciones (ebioscience, n.º de catálogo 88-7346). De manera resumida, el anticuerpo de captura (n.º de catálogo 14-7348-67, eBioscience) se diluyó en primer lugar 1:250 con tampón de recubrimiento y se añadieron 100 μ l a cada pocillo en una microplaca de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante toda la noche a 2-8 °C. A continuación, las placas recubiertas se lavaron cuatro veces (350 μ l/pocillo) con tampón de lavado 1X preparado previamente mediante la dilución de un concentrado 20X con agua desionizada. Después del lavado, las placas se invirtieron y se secaron sobre papel absorbente para eliminar cualquier tampón residual. Estas placas se bloquearon utilizando diluyente de ensayo (250 μ l/pocillo) durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de cuatro lavados (350 μ l/pocillo) con tampón de lavado 1X. Se realizaron una serie de diluciones dobles del patrón superior que variaba de 4 a 500 pg/ml, para construir la curva patrón. De manera similar, se prepararon diluciones de 4 veces (1:4, 1:16 y 1:64) del sobrenadante celular obtenido de la estimulación de PBMC con MDP-ET. Se añadieron alícuotas (100 μ l) de patrones diluidos o sobrenadantes celulares al pocillo por duplicado y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la placa, se añadieron 100 μ l/pocillo de anticuerpo de detección (n.º de catálogo 33-7349-67, eBioscience) diluido en diluyente de ensayo 1X y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 100 μ l/pocillo de avidina-HRP* diluida en diluyente de ensayo 1X y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, después de los lavados, se añadieron 100 μ l de solución de sustrato a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l de solución de parada a cada pocillo y la placa se leyó a 450 nm.

Se descubrió que los niveles umbral para cada citocina fueron los siguientes: 370 pg/ml para IL-1 β , 3.110 pg/ml para IL-6 y 753 pg/ml para TNF- α . El MDP-ET probado a 100 μ g/ml ha mostrado niveles más elevados de IL-6 (por encima del valor umbral), mientras que los niveles de IL-1 β y TNF- α se encontraban dentro del valor umbral (no se muestran los datos).

Se ha descubierto que el compuesto de la presente invención, es decir, MDP-ET, en particular, tiene una actividad inmunomoduladora pronunciada cuando se utiliza en combinación con uno o más antígenos. Esta actividad se demostró utilizando diversos procedimientos de prueba que se explican con más detalle a continuación.

Ejemplo-3: Evaluación *in vivo* de la inmunogenicidad de MDP-ET:

Para demostrar la capacidad de MDP-ET como adyuvante y mostrar una respuesta mediada por células y humoral mejorada, se probó inicialmente el MDP-ET con dos antígenos seleccionados (HbsAg, antígeno de superficie de hepatitis B recombinante, y PvRII, región II del dominio de unión duffy de plasmodium vivax). Sin embargo, la elección de antígenos vacunales con el nuevo compuesto MDP-ET de la presente invención como adyuvante de vacunas no se limita únicamente a los antígenos vacunales ejemplificados en el presente documento. Dado que la vacuna contra la hepatitis B es una vacuna de gran éxito en el mercado con un alumbre como adyuvante, en la presente investigación, el MDP-ET se probó con HBsAg por dos razones (i) para observar el efecto de ahorro de dosis, mediante la utilización de MDP-ET en lugar de alumbre, y (ii) todos los procedimientos para HBsAg están bien establecidos y es fácil detectar nuevos adyuvantes y, además, será obvio distinguir cualquier toxicidad observada, ya sea causada por la presencia del adyuvante o, de forma alternativa, con el antígeno de la vacuna, dado que HBsAg ya está establecido y se ha demostrado que es seguro.

Los antígenos vacunales para la combinación con el adyuvante de vacuna, según la presente invención, se pueden formular con otros antígenos vacunales adecuados, entre los que se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, otros antígenos, a saber, ovoalbúmina, subunidades de antígenos palúdicos que comprenden todas las etapas del ciclo de vida, por ejemplo, cualquier forma de proteína de circunsporozoito (CSP), rPvRII, rMsPs, antígenos bloqueantes de la transmisión rPfs25, rPfs25, 27, rPfF2, GLURP, antígenos en estadio hepático, antígeno de la rabia inactivado, antígeno del virus chikungunya, etc. Los antígenos vacunales, según la presente invención, para la formulación con el nuevo adyuvante MDP-ET de la presente invención, se pueden seleccionar entre antígeno del virus del papiloma humano recombinante (incluidos todos y cada uno de los diferentes serotipos de infección por VPH), antígeno del virus de la encefalitis japonesa, antígeno de la rabia inactivado, antígeno de la hepatitis A, antígeno de la hepatitis B, antígeno de la hepatitis E (incluidas las partículas de tipo subunidad vírica), antígeno del virus del ébola, cualquier arbovirus, incluidos, pero sin limitarse a los mismos, el virus del zika, el antígeno de la vacuna contra el dengue, difteria-tétanos-tosferina (tosferina de células enteras o tosferina acelular, tal como DTaP, Tdap), Haemophilus influenzae tipo b (Hib), incluidas todas y cada una de las formas conocidas de antígenos vacunales que causan infecciones meningocócicas, a saber, Nisseria meningitidis A, Nisseria meningitidis C, Nisseria meningitidis Y,

Nisseria meningitidis W135, Nisseria meningitidis X y Nisseria meningitidis B. Los antígenos vacunales, según la presente invención, para la formulación con este nuevo adyuvante MDP-ET, también pueden incluir antígenos de Streptococcus pneumoniae, por ejemplo, los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de Streptococcal pneumoniae. Se incluyen también en el ámbito de la presente invención antígenos vacunales, tales como polisacárido de Salmonella typhi Vi (simple o conjugado), Salmonella enteritidis, salmonella no tifoidea, Salmonella paratyphi, antígeno del virus del herpes simple, antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana, antígeno del citomegalovirus, antígeno del virus H1N1 o las vacunas contra la tuberculosis. Entre cualquier posible antígeno vacunal vivo atenuado para la formulación con el nuevo adyuvante de vacuna MDP-ET de la presente invención se incluye MMR (sarampión, paperas, rubéola, *measles, mumps, rubella*), varicela, poliomielitis oral (Sabin), gripe (virus de la gripe estacional H1N1), rotavirus y fiebre amarilla, vacuna contra la fiebre del Nilo oriental. Antígenos vacunales, tales como el virus chikungunya, el virus chandipura u otras formas de antígenos vacunales inactivados, tales como polio-Salk inactivado, virus vivo atenuado de la poliomielitis sabin tipos I, II y III, Hepatitis A, que son partículas del patógeno inactivadas térmicamente o inactivadas químicamente, también están dentro del alcance de la presente invención para la formulación con el nuevo adyuvante de la presente invención. Los antígenos de la presente invención, tal como se mencionan anteriormente en el presente documento, pueden estar presentes solos o en combinaciones de los mismos.

Ejemplo-3.1: Evaluación de un efecto adyuvante con antígeno de ovoalbúmina (OVA):

20 Ejemplo 3.1.1: Efecto del análogo de MDP-ET sobre la proliferación de esplenocitos

Se aislaron los bazo de ratones inmunizados y se procesaron en suspensión de células individuales. Se sembraron placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos con 1×10^5 células/pocillo con medio RPMI1640. Las células se trataron con OVA. Con A (2 µg/ml) y LPS (10 µg/ml) o medio con un volumen final de 200 µl. Las placas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ en una incubadora. Después de 48 horas de incubación, se añadieron a cada pocillo 20 µl de solución de bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT), se incubaron durante las siguientes 4 horas. El MTT no transformado se eliminó de cada pocillo aspirando el sobrenadante (180 µl) y se reemplazó con DMSO. La absorbancia se leyó a 570 nm después de 15 minutos.

Las sustancias inmunoestimulantes actúan a través de linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas específicas (dependientes de antígeno) y también a través de mecanismos de acción no específicos (independientes de antígeno) que involucran a granulocitos, macrófagos y células NK. Al ser un órgano linfoide secundario, el bazo contiene una población heterogénea de linfocitos para examinar la actividad inmunoestimulante. Sin embargo, las proliferaciones de células inmunitarias, tales como las células T y B, son el punto de referencia para la potenciación inmunitaria. Los ratones se inmunizaron con o sin OVA o en combinación con MDP y MDP-ET. El tipo de respuesta inmunitaria en todos los grupos tratados se midió con ensayos de proliferación de esplenocitos con LPS y Con-A representados en la figura 3. Este estudio reveló que el MDP-ET que inducía LPS medió en la proliferación de esplenocitos. Esto es esencial para la expansión de las células B.

40 Ejemplo 3.1.2. Efecto de los análogos de MDP-ET sobre la IgG específica de OVA

Se inmunizaron ratones BALB/c macho por vía subcutánea con 100 µg de OVA sola o con 100 µg de OVA disueltos en solución salina que contenía análogos (7,5, 15 o 30 µg) los días 1 y 15. Los sueros se recogieron 2 semanas después de la última inmunización. Se midieron los anticuerpos IgG específicos de OVA en los sueros mediante un ELISA indirecto. Los valores se presentan como el título en log₂ en la tabla 1, tal como se muestra a continuación.

Tabla 1: Títulos de IgG de MDP-ET+OVA, MPD+OVA y OVA sola

Grupos	Concentración por ratón	Título en log ₍₂₎ de anticuerpos IgG
OVA	100 µg	12,64
MDP + OVA	15 µg	14,39
MDP-ET + OVA	7,5 µg	14,89
	15 µg	16,64
	30 µg	17,64

El sistema inmunológico produce las cantidades requeridas de anticuerpos específicos para patógenos/antígenos. Estos anticuerpos producidos neutralizan los patógenos/antígenos. Los adyuvantes vacunales reales son aquellas moléculas que pueden aumentar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los datos anteriores muestran los niveles de IgG en sueros recogidos de ratones después de la inmunización. Las respuestas más elevadas de IgG en suero se registraron para ratones inmunizados con OVA que contenía MDP-ET a 15 µg y 30 µg en comparación con el grupo MDP + OVA, y MDP-ET mostró un título de anticuerpos casi igual a una concentración de 7,5 µg.

Ejemplo-3.1.3: Efecto de los análogos sobre IgG1 e IgG2a total:

Se inmunizaron ratones BALB/c macho por vía subcutánea con 100 µg de OVA sola o con 100 µg de OVA disueltos en solución salina que contenía los análogos de MDP o MDP-ET (7,5, 15 o 30 µg) los días 1 y 15. Los sueros se recogieron 2 semanas después de la última inmunización. Se midieron los anticuerpos IgG1 e IgG2a totales en los sueros mediante ELISA sándwich. Los valores se presentan como el título en log₂ en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Títulos de IgG1 e IgG2a de MDP-ET+OVA, MDP+OVA y OVA sola

Grupos	Concentración por ratón	Título en log ⁽²⁾ del total de anticuerpos IgG1	Título en log ⁽²⁾ del total de anticuerpos IgG2a
OVA	100 µg	14,39	11,89
MDP + OVA	15 µg	18,39	15,64
MDP-ET + OVA	7,5 µg	17,64	17,64
	15 µg	17,64	17,64
	30 µg	18,64	18,64

La medición de los subtipos de IgG totales, tales como IgG1 e IgG2a, es útil para evaluar el tipo de inmunidad producida. En ratones, IgG1 se integra con la respuesta de tipo Th2, mientras que la respuesta de tipo Th1 se integra con la producción de anticuerpos IgG2a, IgG2b e IgG3. La subclase de anticuerpos es indispensable para la fijación del complemento y brinda protección. IgG2a e IgG2b pueden fijar el complemento más fuertemente que IgG1. Los adyuvantes vacunales que muestran una amplia distribución de subclases son beneficiosos contra los patógenos. Los datos anteriores muestran que el grupo MDP-ET + OVA está produciendo una mayor respuesta de IgG2a, es decir, de tipo Th1, que el grupo MDP + OVA en todas las concentraciones. Sin embargo, no indujo una respuesta de IgG1 más significativa, es decir, de tipo Th2, que el grupo MDP + OVA.

El índice Th1:Th2 generado mediante el cálculo del título de anticuerpos de las subclases de IgG específicas de OVA en presencia de MDP y MDP-ET resultó ser de 0,85 y 1, respectivamente. Estos resultados indicaron que la presencia de MDP-ET podría ayudar al sistema inmunitario a la polarización Th1, Th2 hacia la respuesta Th1, ya que el índice Th1:Th2 fue 1.

Ejemplo 3.1.4: Efecto de los análogos sobre el nivel de citocinas en esplenocitos de ratones inmunizados con OVA

Se inmunizaron ratones BALB/c macho por vía subcutánea con 100 µg de OVA disueltos en solución salina que contenía MDP (15 µg) y los análogos de MDP-ET (7,5, 15 o 30 µg) los días 1 y 15. Los esplenocitos se prepararon 2 semanas después de la última inmunización y se cultivaron sin y con OVA (20 µg) durante 48 horas. Se midieron mediante ELISA sándwich las citocinas Th1 (IL-2, IL-12, IFN-γ y TNF-α) y Th2 (IL 4) en el sobrenadante del cultivo. Los valores se presentan como promedio ± D.E. (n = 3).

Tabla 3: Niveles de citocinas en ratones inmunizados con MDP+OVA, MDP-ET+OVA.

Grupo		IL2 (pg/ml)	IL4 (pg/ml)	IL12 (pg/ml)	IFN (pg/ml)	TNF (pg/ml)
MDP + OVA	Tratado	8,86	7,13	260	60,83	154,23
	Tratado de nuevo con OVA	9,9	10,05	290	141,66	197,15
MDP-ET (7,5 µg) + OVA	Tratado	5,61	5,537	125,35	53,6	279,875
	Tratado de nuevo con OVA	7,12	8,28	439,3	76,8	512,12
MDP-ET (15 µg) + OVA	Tratado	5,78	6,01	268	49,8	804,92
	Tratado de nuevo con OVA	6,93	13,28	505,8	50,76	887,27
MDP-ET (30 µg) + OVA	Tratado	5,08	6,4	45,53	57,5	969,9
	Tratado de nuevo con OVA	7,49	14,76	49,96	59,6	1055,75

Las citocinas secretadas por las células cultivadas *ex vivo* proporcionarían un apoyo para la determinación de las subclases de anticuerpos. Las células cultivadas *ex vivo* con o sin reestimulación en presencia de antígeno proporcionarán la idea básica sobre la memoria inmunológica. Los adyuvantes vacunales que tienen la capacidad de inducir inmunidad adaptativa con memoria inmunológica se pueden identificar con cultivos celulares *ex vivo*. Los cultivos reestimulados memorizarán el encuentro con el antígeno y producirán cantidades significativas de citocinas tanto Th1 como Th2. La producción de señales proinflamatorias, tales como TNF-α, es esencial para combatir

patógenos potentes. Este ensayo se llevó a cabo el día 28 del programa de inmunización, se recogieron bazos de ratones sacrificados. En cada grupo, las células se incubaron con o sin antígeno y se midió la secreción de citocinas en los sobrenadantes después de 48 horas. Los resultados revelaron que los ratones tratados con MDP-ET + OVA a 30 µg han mostrado mayores respuestas de IL-4 y TNF-α que con MDP + OVA y las respuestas de IL-2, IL-12 e IFN-γ en los ratones tratados con MDP-ET + OVA son iguales que con MDP + OVA. Una mayor secreción de IL-4 activará las respuestas de las células B y significó el título de anticuerpos más elevado en los experimentos anteriores. Grandes cantidades de TNF-α en MDP-ET + OVA indican una respuesta inmunitaria retardada.

Ejemplo 3.1.5: Efecto de los análogos sobre la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH, *delayed type hypersensitivity*)

Se inmunizaron por vía subcutánea grupos de tres ratones BALB/c macho con 100 µg de OVA/ratón con o sin 30 µg de MDP y análogos de MDP-ET. Después de 7 días, se les inyectó a todos los ratones por vía subcutánea 50 µg de OVA en ambas almohadillas plantares. Las respuestas de DTH se representaron como el aumento en porcentaje de la inflamación de la almohadilla plantar en el lugar de la inyección representado en la figura 4.

Las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardada están mediadas por células T. Las células presentadoras de antígeno activan las citocinas y quimiocinas secretadas de las células T que estimulaban las células endoteliales vasculares para mejorar la permeabilidad e inducir la infiltración de fagocitos y la acumulación de fluidos corporales en el sitio de la reacción de DTH. Los adyuvantes vacunales que mejoran los efectos del antígeno inducirán una mayor reacción inmunitaria de DTH. En el presente estudio, se llevaron a cabo modelos DTH en almohadillas plantares. Por lo general, la inflamación de las almohadillas alcanza su punto máximo a las 24-48 horas después de la exposición al antígeno y comienza el proceso descendente. En los grupos de MDP-ET + OVA se observó un pico a las 24 horas y se observó una disminución transitoria de la inflamación de las almohadillas plantares, mientras que MDP + OVA mostró muy poca inflamación, menor que MDP-ET + OVA hasta los 7 días. La respuesta inmunitaria DTH de MDP-ET + OVA respalda la gran cantidad de liberación de TNF-α para cultivos de esplenocitos en el experimento anterior.

Ejemplo-3.2: Evaluación de un efecto adyuvante con antígeno de Hepatitis B:

Ejemplo-3.2.1: Inmunización:

Se vacunaron ratones BALB/c hembra (6-8 semanas de edad, $n = 6/\text{grupo}$) por vía intramuscular (i.m., en dos cuádriceps) el día 0 y el día 28 con control de vehículo o antígeno de Hepatitis B (20 µg/ratón/dosis/100 µl, 50 µl por cuádriceps) con y sin MDP-ET (10 µg o 50 µg/ratón/dosis/100 µl) diluido en solución salina tamponada con fosfato. Antes de la inmunización, el antígeno de superficie de la hepatitis B se mezcló con MDP-ET, mediante agitación suave (proporción 1:1), en condiciones estériles. Se hizo sangrar a los ratones y se sacrificaron el día 42. Se recogió sangre y se aisló el suero para evaluar y analizar el título de anticuerpos IgG totales específicos de antígeno (tal como en el ejemplo 3.1.2) y las subclases de anticuerpos (isotipos, a saber IgG₁ o IgG_{2a} o IgG₃, tal como en el ejemplo 3.1.3).

Ejemplo-3.2.2: Determinación del título de punto final de IgG total específica de antígeno mediante ELISA-ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas:

Se utilizaron diluciones en serie de muestras de suero individuales (4 diluciones que variaban entre 1:50 y 819.200) para determinar el título de punto final del título de anticuerpos IgG totales específicos de antígeno mediante ELISA. Los detalles del protocolo de ensayo son tal como se describe a continuación.

Para el análisis del título de anticuerpos específicos del antígeno, se suspendió el antígeno de superficie de la hepatitis B en tampón de bicarbonato carbonato 50 mM, pH 9,6 y se recubrió a una concentración (1 µg/ml, 100 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos y se mantuvo a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron con tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato-PBST, pH 7,4 con Tween al 0,05 %) y se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS con BSA al 1 %) a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Las placas de ELISA se lavaron de nuevo con tampón de lavado (PBS, TweenTM 20 al 0,1 %) y se añadieron sueros diluidos en serie (en PBS, BSA al 0,1 %, TweenTM 20 al 0,05 %, azida sódica al 0,02 %) de ratones hiperinmunizados y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, los pocillos se lavaron de nuevo y se añadieron anticuerpos de cabra contra IgG de ratón conjugados con HRP a una dilución de 1:5.000 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los pocillos se lavaron y revelaron con OPD (O-fenilendiamina) como sustrato durante 15 minutos. La reacción se detuvo utilizando H₂SO₄ 2N. La absorbancia se leyó a 490 nm. El umbral (promedio + 3D.E.) se estableció tomando la absorbancia del grupo de control negativo (PBS), seguido del índice reactivo (proporción de absorbancia a una dilución y umbral particulares), para determinar el título de punto final. Según este cálculo, la dilución más elevada en la que el valor del índice reactivo es < 1 se consideró como la dilución del título de anticuerpos de punto final. El título de punto final de anticuerpos específicos de antígeno en presencia y ausencia de MDP-ET se representó como en la figura 5a. El título de anticuerpos IgG específicos de HBsAg en presencia de MDP-ET a 10 y 50 µg/ratón mostró un aumento de 4 veces (dilución 51200) y 8 veces

(dilución 204.800) respectivamente, en comparación con el título de anticuerpos (dilución 12800) contra HBsAg solo.

De manera similar, se probó también MDP-ET con antígeno palúdico (rPvRII, región II del dominio de unión duffy de *Plasmodium vivax*, (Referencia: Chitnis, C.E. y Miller, L.H. (1994) Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J. Exp. Med* 180, 497-506) a 10 µg/ratón. El título de punto final de anticuerpos específicos de antígeno en presencia y ausencia de MDP-ET se representó como en la figura 5b. El título de anticuerpo IgG específico de rPvRII en presencia de MDP-ET a 10 µg/ratón mostró un aumento de 4 veces (dilución 51200), en comparación con el título de anticuerpos (dilución 12800) contra rPvRII solo. No se probaron los isotipos de anticuerpos específicos de rPvRII.

Se sabe que las subclases de IgG producidas después de la inmunización contra un antígeno determinado determinan principalmente la función del anticuerpo o miden indirectamente la contribución relativa de la inducción de citocinas de tipo T_H1 frente a T_H2 . Más específicamente, la producción de anticuerpos IgG₁ induce citocinas de tipo T_H2 , mientras que la producción de anticuerpos IgG_{2a} e IgG₃ induce citocinas de tipo T_H1 . Por lo tanto, en la presente invención, se planeó determinar la polarización T_H1 , T_H2 , después de la vacunación en ratones con HBsAg en presencia de MDP-ET, mediante el análisis de subclases de IgG. En este contexto, en la presente invención, se determinaron los niveles de isotipos de IgG (IgG₁, IgG_{2a} e IgG₃) generados contra HBsAg en presencia o ausencia de MDP-ET (a 10 y 50 µg/ratón) y, a continuación, se calculó el índice $T_H1:T_H2$ calculado como $([IgG_{2a} + IgG_3]/2)/(IgG_1)$. Los detalles del protocolo de ensayo es tal como se describe a continuación en el ejemplo 3.1.3. Según dicho cálculo, un valor de índice < 1 representa una polarización T_H2 ; un valor de índice > 1 representa una polarización T_H1 .

Ejemplo-3.2.3: Determinación del índice Th1:Th2:

El análisis de las subclases de anticuerpos IgG específicos de antígeno (isotipos, a saber IgG₁ o IgG_{2a} o IgG₃) se realizó, tal como se menciona en el ejemplo 3.1.2, excepto en una etapa, en la que se utilizó HRP de cabra contra IgG₁ o IgG_{2a} o IgG₃ de ratón a una dilución de 1:5.000 (en lugar de IgG contra ratón de cabra). El índice $T_H1:T_H2$ obtenido a 10 y 50 µg/ratón de MDP-ET es tal como se muestra en la figura 5c. Los resultados indicaron que HBsAg en presencia de MDP-ET induce también citocinas de tipo T_H1 con valor de índice $T_H1:T_H2 < 1$ (10), mientras que HBsAg solo induce citocinas de tipo T_H2 con un índice $T_H1:T_H2$ inferior a 1 (0,5).

Los ratones vacunados con antígeno de superficie de hepatitis B recombinante en presencia de MDP-ET no sólo aumentaron (4-8 veces, aumento dependiente de la dosis) la respuesta humoral (T_H2), sino que también indujeron citocinas de tipo T_H1 . Por lo tanto, se concluye que el compuesto de la presente invención posee una actividad farmacológica excelente, en particular una actividad adyuvante. Por lo tanto, MDP-ET es útil como adyuvante en formulaciones de vacunas. Aunque MDP-ET se probó con HBsAg en la presente investigación, las formulaciones de vacunas con adyuvante que comprenden el presente compuesto MDP-ET también se extienden a otros antígenos vacunales, además de los mencionados anteriormente en los párrafos anteriores.

Ejemplo-4: Evaluación de la citotoxicidad *in vivo* de MDP-ET

Se ha descubierto que el compuesto MDP-ET de la presente invención se caracteriza por muchos menos efectos secundarios y, por lo tanto, se tolera hasta 100 µg/rata. Esta propiedad beneficiosa particular se evidenció mediante la prueba de dosis máxima tolerada realizada utilizando ratas como modelo animal.

Prueba de dosis máxima tolerada: Se les administró a ratas Wistar (n = 6, 3 M y 3 H) por vía intramuscular (i.m.) MDP-ET que contenía una dosis fija de adyuvante de 10, 50 y 100 µg/animal/200 µl de forma ascendente. Los animales se observaron diariamente durante un período de 14 días para detectar signos clínicos y mortalidad. El peso corporal se midió diariamente. Los alimentos y el agua consumidos por los animales también se supervisaron diariamente para detectar cualquier anomalía y también se calculó la ingesta de alimentos y agua por animal. La temperatura corporal se midió cada 4 horas hasta las 24 horas, a continuación, una vez al día hasta los 7 días y, a continuación, se siguió en días alternos hasta el día 14. Las ratas se sacrificaron el día 14 y se recogieron los órganos/tejidos, tales como el sitio de inyección, bazo, timo, cerebro, pulmones, corazón, hígado y riñón y se realizó un examen macroscópico. No se encontraron lesiones o anomalías significativas en los órganos mencionados anteriormente. En esto, se descubrió que no hubo mortalidad y no se observaron signos clínicos significativos incluso a la dosis elevada probada (100 µg/animal). Sin embargo, el aumento de peso es menor en los animales que recibieron dosis elevadas, en comparación con el aumento de peso de los animales no tratados, mientras que el aumento de peso en los animales que recibieron 10 µg y 50 µg es similar al de los animales no tratados. No hay aumento de temperatura en ninguno de los animales hasta los 14 días.

Lo anterior indica que las ratas son tolerantes incluso a dosis elevadas (100 µg/animal). Se recogió sangre entre 24 y 36 horas y se analizaron los niveles de CRP, después de la inyección. Se encontraron niveles de CRP más elevados (600-1.000 µg/ml, intervalo normal 200-550 µg/ml en ratas) a dosis más elevadas (100 µg/animal).

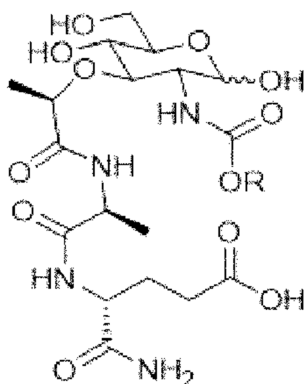
Los resultados mencionados anteriormente indicaron que las ratas eran tolerantes incluso a la concentración

5 elevada probada (100 µg/animal). Sin embargo, debido a los niveles moderados o elevados de IL-6 que se encontraron en la prueba *de pirogenicidad in vitro*, se puede concluir que MDP-ET puede ser pirogénico a la concentración elevada probada (100 µg/animal), lo que a su vez se correlacionó con niveles elevados de CRP encontrados inmediatamente después de administrar la dosis. Sin embargo, se descubrió que los niveles de CRP eran normales después de 14 días.

10 Los ratones vacunados con antígeno de superficie de hepatitis B en presencia de MDP-ET no sólo aumentaron (4-8 veces, aumento dependiente de la dosis) la respuesta humoral (T_H2), sino que también indujeron citocinas de tipo T_H1. Por lo tanto, se concluye que el análogo "MDP-ET", según la presente invención, posee una excelente actividad farmacológica, en particular actividad adyuvante para su utilización como adyuvante en formulaciones de vacunas.

REIVINDICACIONES

1. Nuevo compuesto derivado del dipéptido de muramilo VIII



5

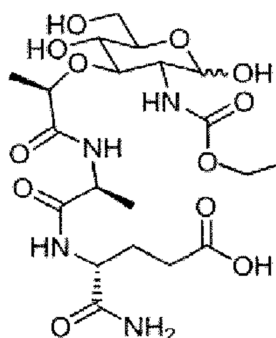
(R = alquilo C₁-C₆)

(VIII)

en el que R es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo o butilo.

10

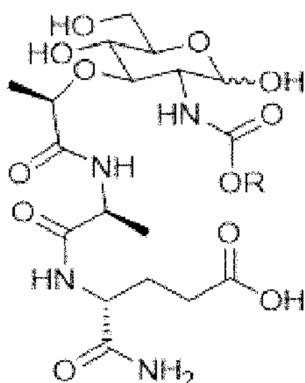
2. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que el compuesto es ácido (4R)-5-amino-4-((2S)-2-((2R)-2-(((3R,4R,5S,6R)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico (MDP-ET), tal como se muestra en la siguiente estructura.



15

(MDP-ET)

3. Proceso para la preparación de un compuesto derivado del dipéptido de muramilo de fórmula VIII.



20

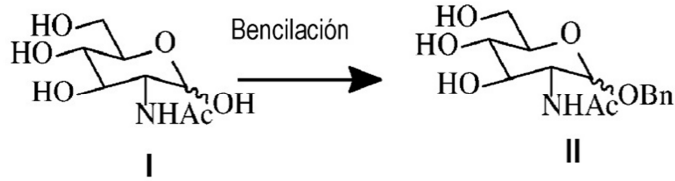
(R = alquilo C₁-C₆)

(VIII)

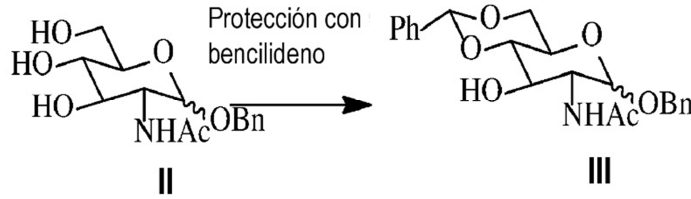
que comprende las etapas de:

25

a. bencilación anomérica de un compuesto de fórmula I para obtener un compuesto de fórmula II;

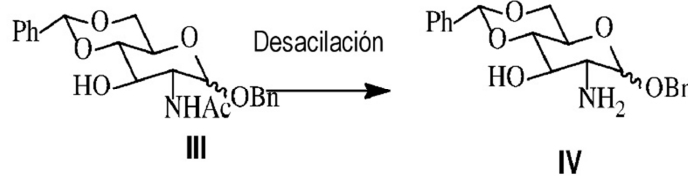


b. protección con bencilideno del compuesto de fórmula II para obtener un compuesto de fórmula III;



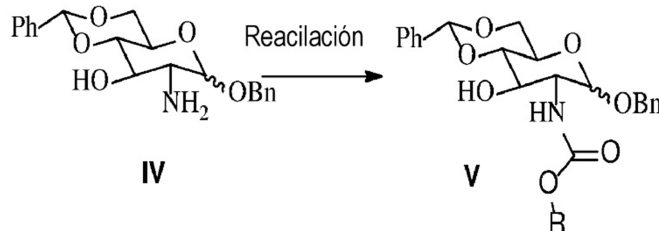
5

c. desacetilación del compuesto de fórmula III para obtener un compuesto de fórmula IV;



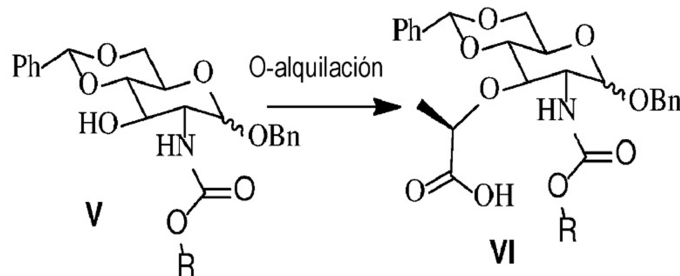
10

d. reacilación del compuesto de fórmula IV con un agente acilante adecuado en presencia de un disolvente para obtener un compuesto de fórmula V;



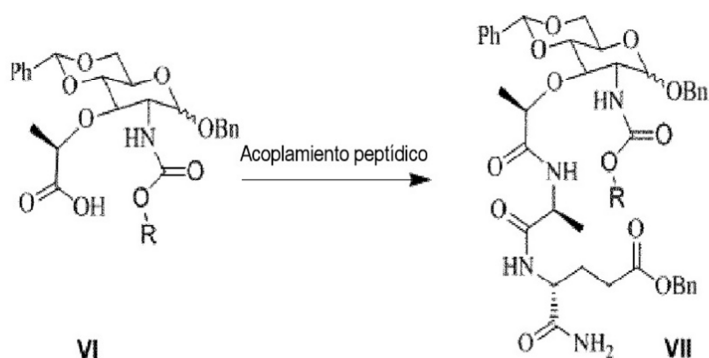
15

e. O-alkilación del compuesto de fórmula V por tratamiento con ácido L-2-cloropropanoico en presencia de un disolvente para obtener un compuesto de fórmula VI;



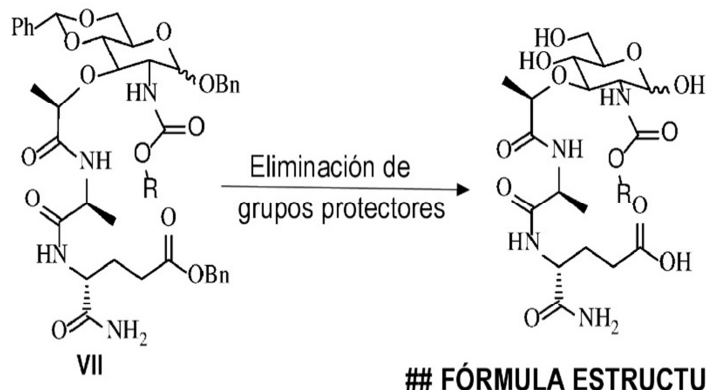
20

f. acoplamiento de un péptido tratando el compuesto de fórmula VI con trifluoroacetato de éster bencilico de L-alanil-D-isoglutamina en un disolvente para obtener un compuesto de fórmula VII;



g. desprotección del compuesto de fórmula VII para obtener el compuesto deseado representado por la fórmula VIII;

5



en el que R en los compuestos anteriores es alquilo lineal seleccionado entre metilo, etilo, propilo o butilo.

10 4. Proceso, según la reivindicación 3, en el que el agente acilante en la etapa (d) se puede seleccionar entre cloroformiato de alquilo y cloroformiato de alcoxilquilo.

5. Proceso, según la reivindicación 4, en el que el agente acilante es cloroformiato de etilo.

15 6. Proceso, según la reivindicación 3, en el que el disolvente en la etapa (d) se puede seleccionar entre piridina anhidra, diisopropiletilamina, trietilamina y N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) o una mezcla de las mismas.

7. Proceso, según la reivindicación 3, en el que el disolvente en la etapa (e) es dioxano anhidro.

20 8. Proceso, según la reivindicación 3, en el que el disolvente en la etapa (f) se puede seleccionar entre ácido trifluoroacético (TFA) y tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos.

9. Proceso, según la reivindicación 3, en el que el acoplamiento en la etapa (f) se lleva a cabo en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) e hidroxibenzotriazol (HOBt).

25 10. Proceso, según la reivindicación 3, en el que la desprotección en la etapa (g) se lleva a cabo con ácido acético glacial.

30 11. Proceso para la preparación de ácido (4R)-5-amino-4-((2S)-2-((2R)-2-(((3R, 4R, 5R, 6R)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico (MDP-ET) que comprende las etapas de:

(a) bencilación anomérica de N-acetil D-glucosamina (I) para obtener 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de bencilo (II);

35 (b) protección con bencilideno de 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de bencilo (II) para obtener 2-acetamido-4,6-O-benciliden-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo (III);

(c) desacilación de 2-acetamido-4,6-O-benciliden-2-desoxi-D-glucopiranosido de bencilo (III) para obtener 2-amino-4,6-O-benciliden-2-desoxi- α -D-manopiranosido de bencilo (IV);

(d) reacilación con un agente acilante orgánico, cloroformiato de etilo, en presencia de piridina anhidra como

disolvente de 2-amino-4,6-O-benciliden-2-desoxi- α -D-manopiranosido de bencilo (IV) para obtener ((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-7-il)carbamato de etilo (V);

(e) O-alkilación de ((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-8-hidroxi-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-7-il)carbamato de etilo (V) en presencia de dioxano anhidro como disolvente para obtener el ácido (2*R*)-2-((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico (VI);

(f) acoplamiento peptídico del ácido (2*R*)-2-((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanoico (VI) con trifluoroacetato de éster bencilico de L-alanil-D-isoglutamina para obtener (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo (VII);

(g) desprotección de (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-((4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(benciloxi)-7-((etoxicarbonil)amino)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-8-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoato de bencilo (VII) en presencia de ácido acético glacial para obtener el ácido (4*R*)-5-amino-4-((2*S*)-2-((2*R*)-2-((3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3-((etoxicarbonil)amino)-2,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-4-il)oxi)propanamido)propanamido)-5-oxopentanoico.

12. Compuesto, según la reivindicación 2, en el que dicho compuesto MDP-ET se utiliza como adyuvante en formulaciones de vacunas.

13. Compuesto, según la reivindicación 12, en el que dicho compuesto MDP-ET se utiliza como adyuvante en formulaciones de vacunas con un antígeno, en el que el antígeno se puede seleccionar entre un antígeno vacunal vivo atenuado, un antígeno vacunal inactivado, un antígeno vacunal subunitario, un antígeno vacunal conjugado y un antígeno vacunal recombinante o cualquier combinación de los mismos.

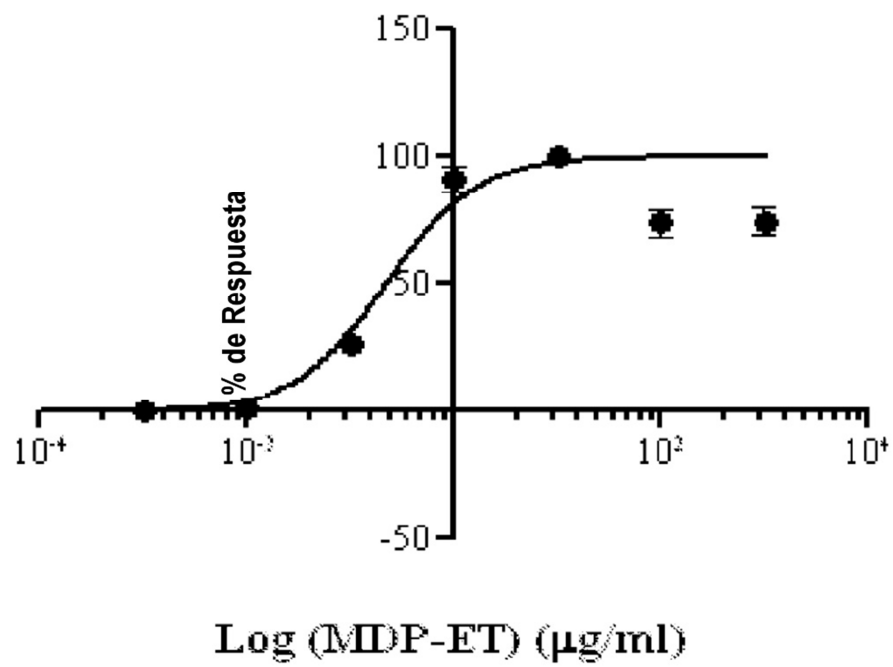


Figura 1

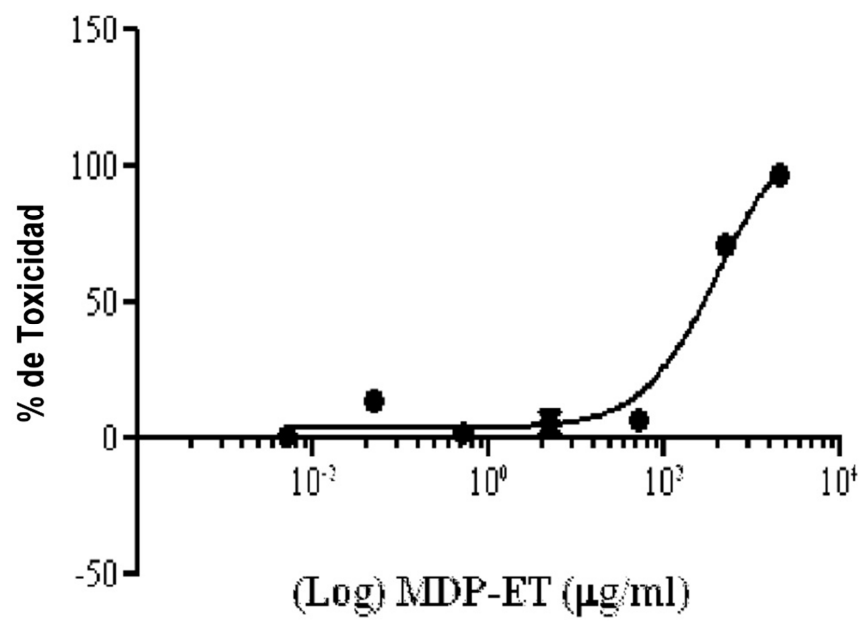


Figura 2

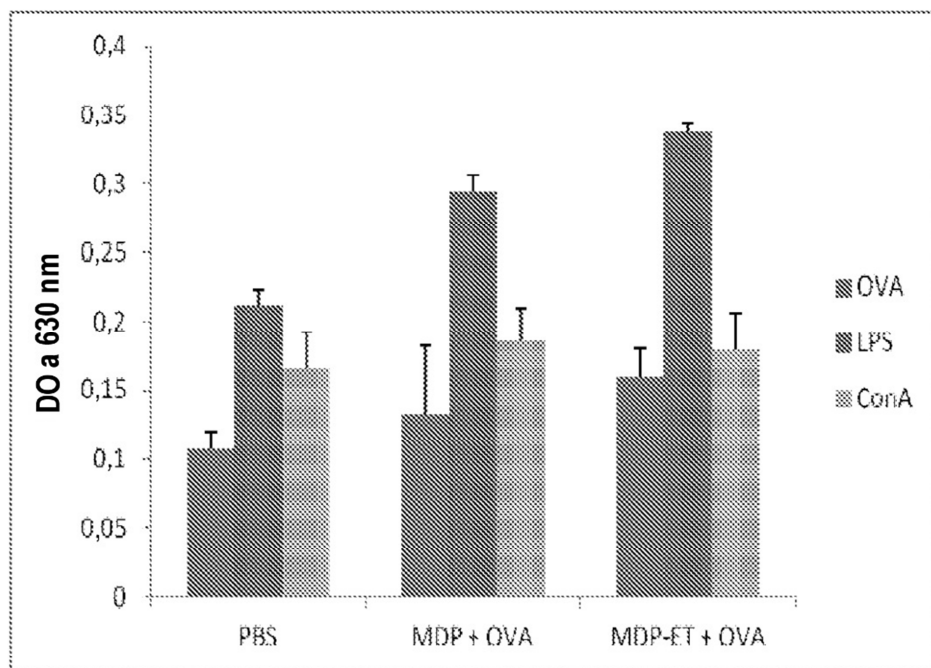


Figura 3

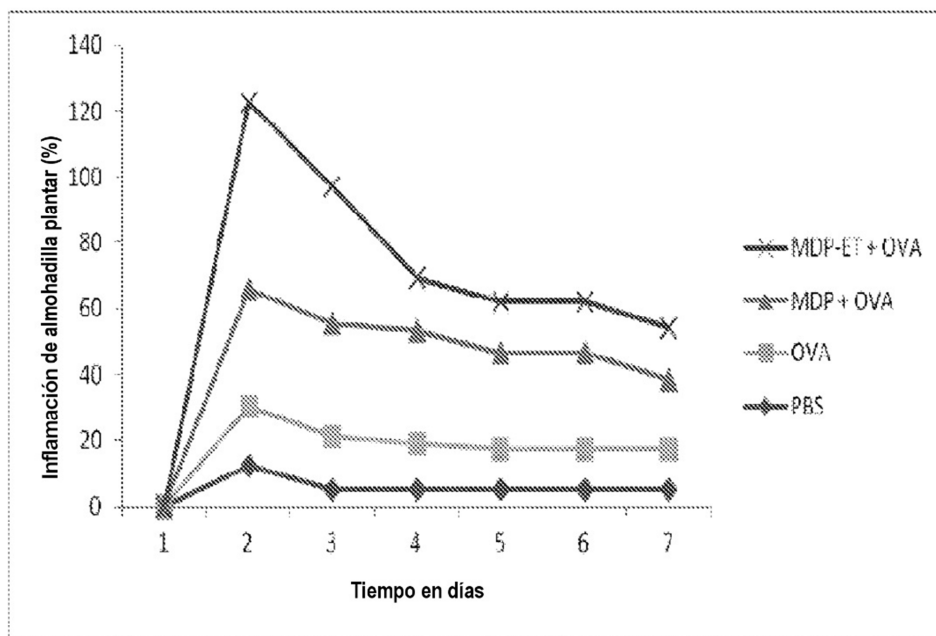
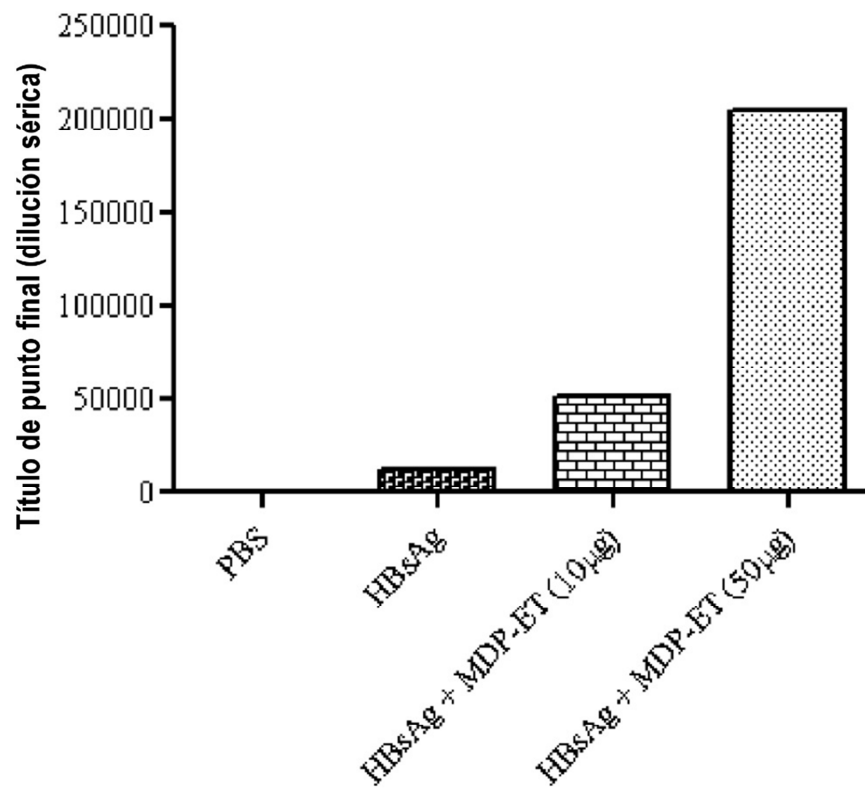


Figura 4



Ratones vacunados

Figura 5a

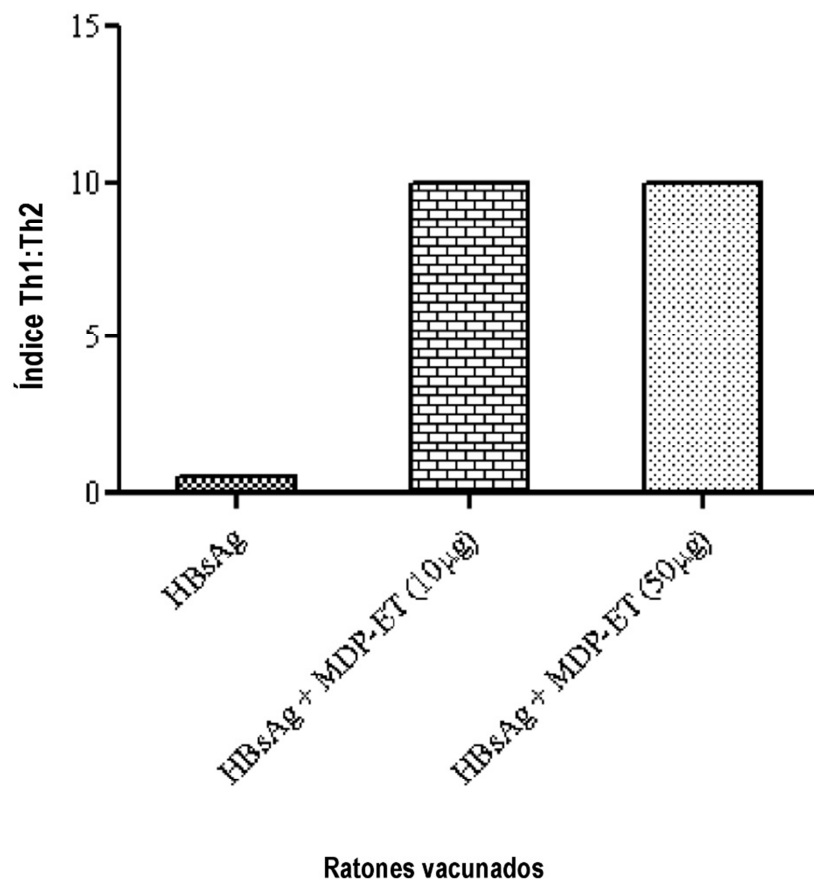


Figura 5b

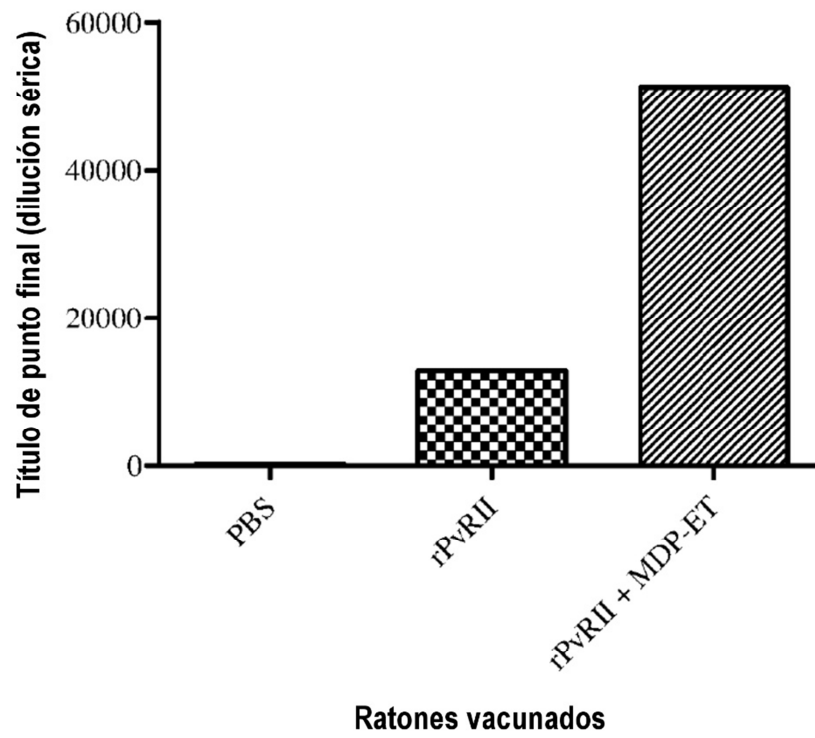


Figura 5c

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 1996001645 A
- US 4395399 A
- US 7173107 B2
- WO 2007045192 A
- WO 1996001645 A1

Literatura no patente citada en la descripción

- **GIRARDIN S. et al.** *J Biol Chem.*, 2003, vol. 278 (11), 8869-72
- **F. COULOMBE et al.** *PloS ONE*, 2012, vol. 7 (5)
- **I. JAKOPIN.** *Current Medicinal Chemistry*, 2013, vol. 20 (16), 2068-2079
- **OGAWA.** *CurrBioact Compd.*, 2011, vol. 7 (3), 180-197
- **NAMBA et al.** *Vaccine*, 1997, vol. 15 (4), 405-13
- *Australasian Biotechnology*, July 1996, vol. 6 (4), 223-229
- **ANDRONOVA T.M. et al.** *Review.Immunology*, 1991, vol. 4, 1
- **L. I. ROSTOVTSEVA et al.** *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 1981, vol. 7 (12), 1843-1858
- **MARINA et al.** *Vaccine*, 2012, vol. 30, 4859-4865