



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **329111**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

C07F 9/10 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20013749	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.02.01 PCT/US00/02755
(22)	Inng.dag	2001.07.31	(85)	Videreføringsdag	2001.07.31
(24)	Løpedag	2000.02.01	(30)	Prioritet	1999.02.01, US, 118131
(41)	Alm.tilgj	2001.09.25			
(45)	Meddelt	2010.08.30			
(73)	Innehaver	Eisai R & D Management Co Ltd, 6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku, JP-112-8088 TOKYO, Japan			
(72)	Oppfinner	Michael D. Lewis, Andover, MA, US-, USA Lynn D Hawkins, Concord, MA, US-, USA Sally T Ishizaka, Weston, MA, US-, USA Pamela McGuinness, Methuen, MA, US-, USA Anneliese Nault, North Billerica, MA, US-, USA Jeffrey Rose, Chelmsford, MA, US-, USA Daniel P Rossignol, Mahwah, NJ, US-, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Forbindelse, immunologisk adjuvanssammensetning omfattende denne, vaksinesammensetning omfattende et antigen og en adjuvansforbindelse samt anvendelse av et antigen og en adjuvansforbindelse			
(56)	Anførte publikasjoner	INOUE et al., Immunochemical Studies of Phospholipids II. Syntheses of Cardiolipin and Its Analogues, Chem. Pharm. Bull., 1968, vol. 16, no 1, side 76-81. INOUE et al., Immunochemical Studies of Phospholipids IV: The Reactivities of Antisera against natural Cardiolipin and synthetic Cardiolipin Analogues-containing Antigens, Chem. Phys. Lipids, 1969, vol. 3, side 70-77.			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelse er rettet på nye forbindelser som fungerer som immunologiske adjuvansmidler når de tilføres sammen med antigener som vaksiner for bakterielle og virale sykdommer, videre på nye adjuvansmiddelsarrangementer som inkluderer minst en av adjuvansforbindelsene ifølge oppfinnelsen, videre på de nye immunstimulerende blandinger som omfatter et antigen og minst en av adjuvansforbindelsene ifølge oppfinnelsen, og på fremgangsmåter for immunisering av et dyr ved tilførsel av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, sammen med et antigen som dyret skal immuniseres mot.

IMMUNOLOGISK ADJUVANSFORBINDELSE

Foreliggende oppfinnelse vedrører en forbindelse, en immunologisk adjuvanssammensetning omfattende denne, vaksinesammensetning omfattende et antigen og en adjuvansforbindelse samt anvendelse av et antigen og en adjuvansforbindelse.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Vaksiner har vist seg å være vellykkede, høyt aksepterbare metoder for forebygging av smittsomme sykdommer. De er kostnadseffektive og induserer ikke antibiotisk resistens mot målpatogenet eller påvirker normal flora tilstede i verten. I mange tilfeller, som for eksempel ved induksjon av antiviral immunitet, kan vaksiner forebygge en sykdom for hvilken det ikke finnes noen kurative eller forbedrende behandlinger tilgjengelig.

Vaksiner fungerer ved å utløse immunsystemet for å iverksette en respons til et middel eller antigen, typisk en smittsom organisme eller en del derav som innføres i kroppen i en ikke smittsom eller ikke patogen form. Når først immunsystemet er blitt "initiert" eller sensitivert til organismen, vil senere eksponering av immunsystemet for denne organisme som et smittsamt patogen resultere i en hurtig og robust immunrespons som ødelegger patogenet før det kan formere seg og infisere nok celler i vertsorganismen til å utløse sykdomssymptomer.

Midlet eller antigenet anvendt for å initiere immunsystemet kan være hele organismen i en mindre smittsom tilstand, kjent som en "svekket" organisme, eller i noen tilfeller komponenter av organismen, som for eksempel karbohydrater, proteiner eller peptider som representerer forskjellige strukturelle komponenter av organismen.

I mange tilfeller er det nødvendig å forsterke immunresponsen til antigenene tilstede i en vaksine for å stimulere immunsystemet i en tilstrekkelig grad til å gjøre en vaksine effektiv, dvs. gi immunitet. Mange protein- og de fleste peptid- og karbohydratantigener tilført alene, utløser ikke en tilstrekkelig antistoffrespons til å gi immunitet. Slike antigener må frembys til immunsystemet på en slik måte at de gjenkjennes som fremmede og vil utløse immunrespons. For å oppnå dette er det utviklet tilsetningsstoffer (adjuvansmidler) som immobiliserer antigener og stimulerer immunresponsen.

Det best kjente adjuvansmiddel, Freund's komplette adjuvansmiddel, består av en blanding av mycobakterier i en olje/vann-emulsjon. Freund's adjuvansmiddel virker på to måter, først ved å øke celle- og humoralformidlet immunitet, og dernest ved å blokkere hurtig spredning av antigeneksponeringen ("depot-virkningen"). På grunn av hyppige toksiske, fysiologiske og

immunologiske reaksjoner til dette materiale, kan imidlertid Freund's adjuvansmiddel ikke anvendes i mennesker.

Et annet molekyl som har vist seg å ha immunstimulerende- eller adjuvansmiddel-virkning er endotoksin, også kjent som lipopolysakkarid (LPS). LPS stimulerer immunsystemet ved å utløse en "iboende" immunrespons - en respons som har utviklet seg til å gjøre en organisme i stand til å gjenkjenne endotoksin (og de innvaderende bakterier hvorav dette er en komponent) uten behov for at organismen tidligere er eksponert. Mens LPS er for giftig til å være et mulig adjuvansmiddel blir molekylstrukturmessig relatert til endotoksin, som for eksempel monofosforyllipid A ("MPL") testet som adjuvansmidler i kliniske forsøk. Hittil er imidlertid det eneste FDA-godkjente adjuvansmiddel for bruk i mennesker aluminiumsalter ("alun") som anvendes som "depot" for antigener ved utfelling av antigenene. Alun stimulerer også antigenenes immunrespons.

Inoue et al. beskriver, i *Immunochemical Studies of Phospholipids II: Syntheses of Cardiolipin and Its Analogues*, Chem., Pharm. Bull., 1968, vol. 16, no. 1, side 76-81, fremstillingen av cardiolipin og cardiolipinanaloger som skiller seg fra forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse. Forbindelsene som beskrives reagerer med Wassermann antistoff og benyttes ved påvisning av syfilis.

Inoue et al. beskriver, i *Immunological Studies of Phospholipids IV: The Reactivities of Antisera against natural Cardiolipin and synthetic Cardiolipin Analogues-containing Antigens*, Chem. Phys. Lipids, 1969, vol. 3, side 70-77, likeledes cardiolipiner og cardiolipinanaloger. Det ble blant annet funnet at det kan foreligge immunologiske forskjeller mellom cardiolipin antigen og antigener inneholdende syntetiske analoger.

Det er således et erkjent behov på området for forbindelser som kan tilføres sammen med antigener for å stimulere immunsystemet til å generere en mer robust antistoffrespons til antigenet enn det ville sees hvis antigenet ble injisert alene eller med Alun.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

I et aspekt er den foreliggende oppfinnelse rettet mot nye forbindelser som fungerer som immunologiske adjuvansmidler når de administreres sammen med antigener som for eksempel vaksiner for bakterielle og virale sykdommer.

I et annet aspekt er foreliggende oppfinnelse rettet mot nye sammensetninger av adjuvansmiddel som omfatter minst en adjuvansforbindelse ifølge oppfinnelsen.

I et tredje aspekt er oppfinnelsen rettet mot nye vaksinesammensetninger som omfatter et antigen og minst en av adjuvansforbindelsene ifølge oppfinnelsen.

- 5 Ved et ytterligere aspekt er den foreliggende oppfinnelse anvendelse av en effektiv mengde av et antigen og en effektiv mengde av en adjuvansforbindelse for fremstilling av et medikament for å stimulere en immunrespons mot nevnte antigen.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

- 10 Figur 1 er en graf som viser resultatene av et *in vitro* forsøk for induksjon av cytokin frigivelse ved hjelp av forbindelsen 100,184, eller 186 ifølge oppfinnelsen.

- 15 Figur 2 er en graf som viser stimulering av alkalisk fosfataseuttrykking fra en induserbar reporterkonstruksjon med TNF-promoteren (TNF-PLAP) i THP-1-celler ved hjelp av forbindelsene 106 og 126 i fravær og nærvær av 10 % serum.

- Figur 3 er en graf som viser stimulering av IL-10 frigivelse fra normale musesplenocyter ved hjelp av forbindelse 104, 106, 124, 126, 160 og 162 ifølge oppfinnelsen.

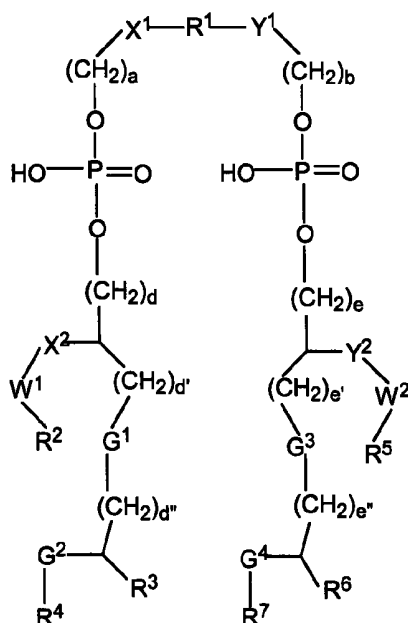
- 20 Figur 4 er en graf som viser stimulering av interferon-gamma frigivelse fra normale musesplenocyter ved hjelp av forbindelse 104, 106, 124, 126, 160 og 162 ifølge oppfinnelsen.

- Figur 5 er en graf som illustrerer resultatene av serum titeringsanalyse for bestemmelse av mengden antistoff som produseres i respons til albuskjell hemocyanin i fravær av og nærvær av forbindelsene 100, 116, 126, 160 og 184 ifølge oppfinnelsen.

- 25 Figur 6 er en graf som illustrerer resultatene av serum titeringsanalyse for å bestemme mengden av antistoff produsert i respons til tetanus toksoid i fravær og nærvær av forbindelsene 100, 116, 126, 160 og 184 ifølge oppfinnelsen.

DETALJERT BESKRIVELSE AV DE FORETRUKNE UTFØRELSESFORMER

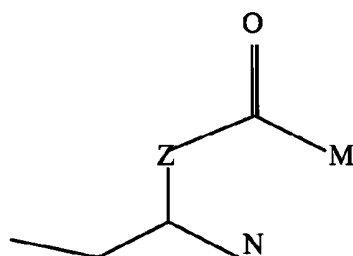
Foreliggende oppfinnelse er rettet mot nye forbindelser med formel I



hvor:

- 5 R1 er valgt fra gruppen bestående av
 - (a) C(O);
 - (b) C(O)-C₁₋₁₄ alkyl-C(O), hvori C₁₋₁₄ alkyl eventuelt er substituert med hydroksy, C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkenylendioksy, C₁₋₅ alkylamino, eller C₁₋₅ alkylaryl, hvori aryl delen av C₁₋₅ alkylaryl eventuelt er substituert med C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkylamino, C₁₋₅ alkoksylamino, C₁₋₅ alkylamino, C₁₋₅ - C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl C(O)OH, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl-C(O)-C₁₋₅ alkyl;
 - (c) C₂ til C₁₅ rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med hydroksy eller alkoksy; og
 - (d) -C(O)-C₆₋₁₂ aryl-C(O)- hvori aryl eventuelt er substituert med hydroksy,
- 15 halogen, nitro eller amino;
 - a og b er uavhengig 0, 1, 2, 3 eller 4;
 - d, d', d'', e, e' og e'' er uavhengig et helt tall fra 1 til 4;
 - X¹, X², Y¹ og Y² er uavhengig valgt fra gruppen bestående av null, oksygen, NH og N(C(O)C₁₋₄ alkyl), og N(C₁₋₄ alkyl)₂;
- 20 W¹ og W² er uavhengig valgt fra gruppen bestående av karbonyl, metylen, sulfon og sulfoksid;
 - R² og R⁵ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av:

- (a) C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy;
- (b) C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkenyl eller dialkenyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy;
- (c) C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkoksy som eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy;
- (d) $-NH-C_2$ til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl, hvori alkylgruppen eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy; og
- (e)



hvori Z er valgt fra gruppen bestående av O og NH, og M og N er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl, alkenyl, alkoksy, acyloksy, alkylamino og acylamino;

R^3 og R^6 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl eller eventuelt substituert med okso eller fluor;

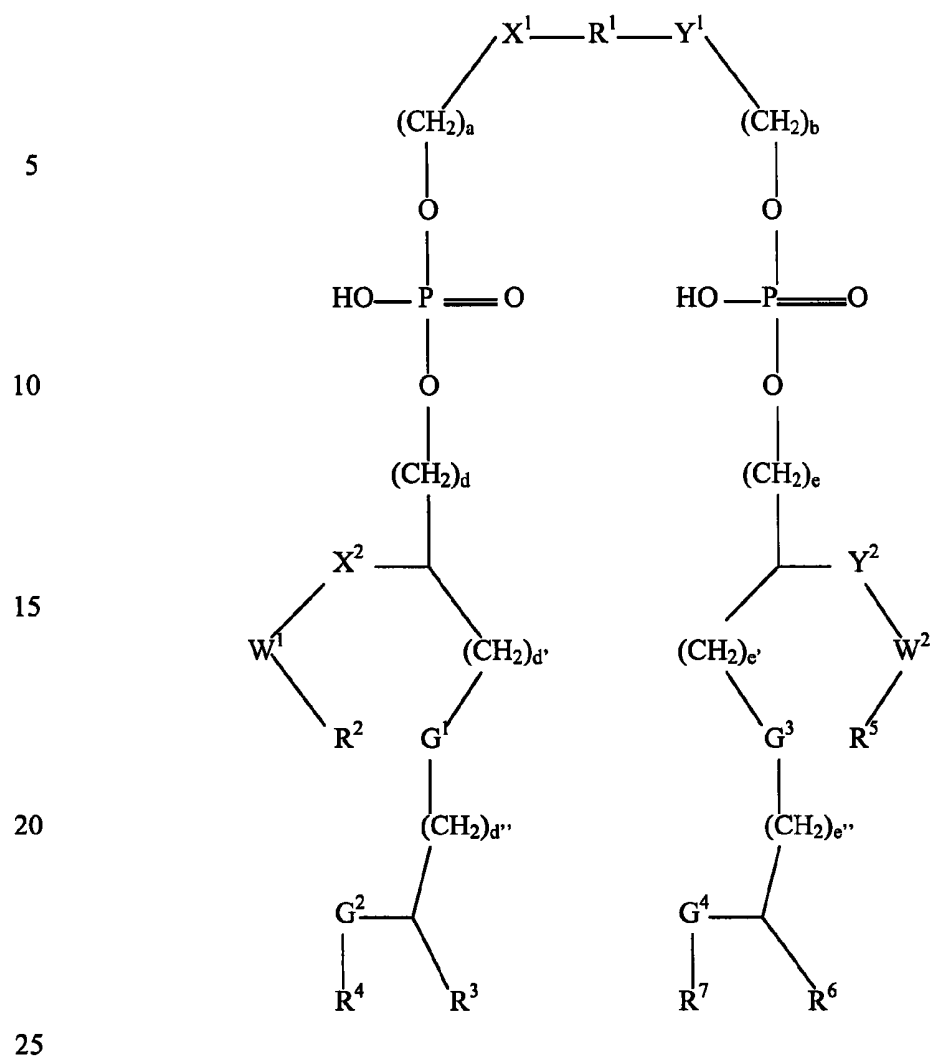
R^4 og R^7 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av $C(O)C_2$ til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl; C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl; C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkoksy; C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkenyl; hvori alkyl-, alkenyl- eller alkoksygruppene uavhengig og eventuelt kan være substituert med hydroksy, fluor eller C_1 til C_5 alkoksy;

G^1 , G^2 , G^3 og G^4 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av oksygen, metylen, amino, tiol, $-NHC(O)-$, og $-N(C(O)C_{1-4} \text{ alkyl})$;

eller G^2R^4 eller G^4R^7 kan sammen være et hydrogenatom eller hydroksyl;

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Den foreliggende oppfinnelse omfatter også immunologiske adjuvanssammensetninger omfattende en forbindelse med formel I



hvor:

R^1 er valgt fra gruppen bestående av

(a) C(O);

30 (b) C(O)-C₁₋₁₄ alkyl-C(O), hvori C₁₋₁₄ alkyl eventuelt er substituert med hydroksy, C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkenylendioksy, C₁₋₅ alkylamino, eller C₁₋₅ alkylaryl, hvori aryl delen av C₁₋₅ alkylaryl eventuelt er substituert med C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkylamino, C₁₋₅ alkoksyamino, C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl C(O)OH, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl-C(O)-C₁₋₅ alkyl;

35 (c) C₂ til C₁₅ rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med hydroksy eller alkoksy; og

(d) -C(O)-C₆₋₁₂ aryl-C(O)- hvori aryl eventuelt er substituert med hydroksy, halogen, nitro eller amino;

a og b er uafhængig 0, 1, 2, 3 eller 4;

d, d', d'', e, e' og e'' er uavhengig et helt tall fra 1 til 4;

X^1, X^2, Y^1 og Y^2 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av null, oksygen, NH og $N(C(O)C_{1-4} \text{ alkyl})$, og $N(C_{1-4} \text{ alkyl})_2$;

5 W¹ og W² er uavhengig valgt fra gruppen bestående av karbonyl, metylen, sulfon og sulfoksid:

R^2 og R^5 er uafhængig valgt fra gruppen bestående af:

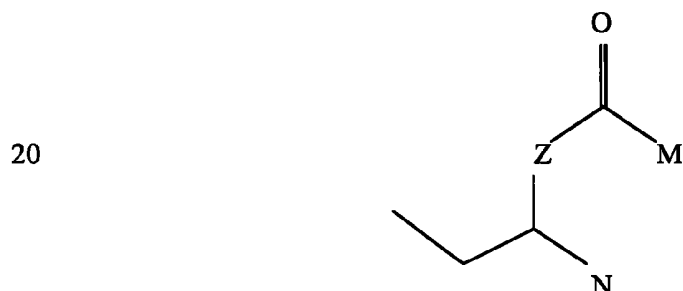
(a) C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy;

10 (b) C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkenyl eller dialkenyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy;

(c) C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkoksy som eventuelt er substituert med okso, hydrokso eller alkoksy;

(d) -NH-C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl, hvori alkylgruppen eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy; og

(e)



25 hvori Z er valgt fra gruppen bestående av O og NH, og M og N er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl, alkenyl, alkoksy, acyloksy, alkylamino og acylamino;

R³ og R⁶ er uafhængig valgt fra gruppen bestående af C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl eller eventuelt substitueret med okso eller fluor;

R⁴ og R⁷ er uafhængig valgt fra gruppen bestående af C(O)C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl; C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl; C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkoksy; C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkenyl; hvori alkyl-, alkenyl- eller alkoksygruppene uafhængig og eventuelt kan være substitueret med hydroksy, fluor eller C₁ til C₅ alkoksy;

35 G¹, G², G³ og G⁴ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av oksygen, metylen, amino, tiol, -NHC(O)-, og -N(C(O)C₁₋₄ alkyl);

eller G^2R^4 eller G^4R^7 kan sammen være et hydrogenatom eller hydroksyl;
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

I foretrukne forbindelser ifølge oppfinnelsen er en eller flere av de følgende tilstede: Hver av a og b er 2; hver av X^1 og Y^1 er NH; R^1 er C(O) eller C(O)- C_{1-14} alkyl-C(O); hver av d' og e' er 1; hver av d'' og e'' er 1; X er O eller NH, mer foretrukket NH; og W er C(O); eller hver av d' og e' er 2.

5

I videre foretrukne utførelsesformer er R' C(O) C_{1-14} alkyl-C(O), hvori C_{1-14} alkyl er substituert, for eksempel med en C_{1-5} alkoksygruppe.

I en mest foretrukket utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot forbindelse ER 803022, ER 803058, ER 803732, ER 804053, ER 804057, ER 804058, ER 804059, ER 804442, ER 804680 og ER 804764, og blandinger inneholdende disse forbindelser.

Oppfinnelsen er også rettet mot en vaksinesammensetning som er kjennetegnet ved at den omfatter et antigen og en adjuvansforbindelse med formel I som omtalt ovenfor i henhold til krav 10.

Videre omfatter oppfinnelsen anvendelse av en effektiv mengde av et antigen og en effektiv mengde av en adjuvansforbindelse med formel I som angitt ovenfor for fremstilling av et medikament for å stimulere en immunrespons mot nevnte antigen i henhold til søknadens selvstendige krav 13.

Definisjoner

Karbonyl som anvendt heri er en (C=O) del.

Dikarbonyl, som anvendt heri, er en del med strukturen (C=O)-alkyl-(C=O) eller (C=O)-aryl-(C=O), som er bundet til et molekyl gjennom karbonatomene i begge de terminale karbonyldeler.

Okso, som anvendt heri, er en =O gruppe.

Alkylester, som anvendt heri, er en del med strukturen O-(C=O)-alkyl, som er bundet til et molekyl gjennom det ikke-dobbeltbundne oksygen i estergruppen.

Alkenylester, som anvendt heri, er en del med en struktur O-(C=O)-karbonkjede, der karbonkjeden inneholder en karbon til karbonbinding som er bundet til et molekyl gjennom det ikke-dobbeltbundne oksygen i estergruppen.

Betegnelsen "alkylen" angir en bivalent rettkjedet eller forgrenet alkylhydrokarbongruppe.

Betegnelsen "alkenylene" angir en bivalent, rettkjedet eller forgrenet hydrokarbongruppe med en enkelt karbon til karbon dobbeltbinding.

5 Betegnelsen "dialkenylene" angir en bivalent, umettet, rettkjedet eller forgrenet hydrokarbongruppe med to karbon til karbon dobbeltbindinger.

Betegnelsen "arylene" refererer til en bivalent, aromatisk gruppe.

10 Forkortelsen "Boc" som anvendt heri, angir t-butyloksykarbonyl.

Som anvendt heri med henvisning til forbindelser og blandinger ifølge oppfinnelsen, refererer betegnelsen "type 1" til de forbindelser ifølge oppfinnelsen som tilsvare formel I i det foregående hvor verdiene av a og b er de samme; verdiene av d og e er de samme; verdiene av d' og e' er de samme; verdiene av d'' og e'' er de samme; X¹ og Y¹ er de samme; X² og Y² er de samme; W¹ og W² er de samme; R² og R⁵ er de samme; G¹ og G³ er de samme; R³ og R⁶ er de samme; G² og G⁴ er de samme; og R⁴ og R⁷ er de samme. "Type 2" som anvendt heri, refererer til forbindelser eller blandinger tilsvarende formel I hvor hvilke eller hvilken som helst av de følgende gjelder: Verdiene av a og b er forskjellige, verdiene av d og e er forskjellige, verdiene d' og e' er forskjellige, verdiene av d'' og e'' er forskjellige, X¹ og Y¹ er forskjellige; X² og Y² er forskjellige; W¹ og W² er forskjellige; R² og R⁵ er forskjellige; G¹ og G³ er forskjellige; R³ og R⁶ er forskjellige; G² og G⁴ er forskjellige eller R⁴ og R⁷ er forskjellige.

25 I tilfellet av en terminologikonflikt er den foreliggende fremstilling den bestemmende.

Generelle syntesemetoder

1. Syntese av diamidforbindelser

Generelt blir 2-amino-1,3-dihydroksypropan eller (±) serinol omdannet til 2-azido forbindelse ved reaksjon med trifluormetansulfonylazid etterfulgt av beskyttelse som per-acetatet for lett manipulering. Den resulterende forbindelse deacetyleres, etterfulgt av reaksjon med en passende aktivert primær alkohol av en dioldel. Den primære alkoholdel av produktet fra denne reaksjon blir så beskyttet, for eksempel ved å anvende TBDPSCI, etterfulgt av reaksjon med fosgen og deretter allylalkohol, for å gi en fullstendig beskyttet diol. Den beskyttede diol blir så behandlet for å spalte den beskyttende gruppe fra den primære alkohol. Den ubeskyttede alkohol omsettes med et passende funksjonalisert fosforyleringsmiddel med formel(11), som indikert i eksemplene, for å danne en fosfatesterforbindelse. Azidodelen av produktet reduseres og omsettes så med en aktivert acylform for å danne et amid. Det beskyttede terminale amin på det funksjonaliserte fosfat avbeskyttes og omsettes deretter med et fosgen eller en dikarboksylsyre i

nærvær av et dehydratiserende middel som for eksempel EDC. Fosfatgruppene i den resulterende forbindelse blir så avbeskyttet og gir et racemisk amid.

2. Syntese av chirale diamidforbindelser av type 1

- 5 Generelt blir en chiral aminosyreester med den ønskede struktur beskyttet med en benzimidatester. Den beskyttede forbindelse omsettes med et reduksjonsmiddel, for eksempel DIBAL eller liknende for å redusere syredelen av aminosyren til en alkohol. Den resulterende alkoholforbindelse omsettes med en passende aktivert primær alkohol av en diolenhet, etterfulgt av avspalting av benzimidatbeskyttelsesgruppen, og gir en aminodiol. Diolen blir så
10 omsatt med et passende syreklorid til å gi et diolamid.

- Diolamidet blir så omsatt med en passende funksjonalisert fosforyleringsreagens ved den frie primære hydroksylgruppe. Den resulterende forbindelse forestres ved den sekundære alkoholgruppe med en passende acylidel. N-BOC-gruppen blir så avspaltet fra aminogruppen,
15 innført ved hjelp av det fosforylerende reagens (11), og gir en fosfatesterforbindelse med et fritt primært amin. Dette produkt blir så omsatt med fosgen eller en dikarboksytsyre i nærvær av et dehydratiserende middel til å gi et diamidprodukt. De beskyttede fosfatgrupper i diamidproduktet blir igjen avbeskyttet, typisk med palladium (0) og fenylsilan.

20 3. Syntese av chirale diamidforbindelser av type 2

- Chirale diamidforbindelser av type 2 syntetiseres hovedsakelig som beskrevet for chirale diamidforbindelser av type 1 opptil punktet umiddelbart etter avspalting av den beskyttende gruppe fra den primære aminogruppe i fosfatesterforbindelsen. Ved dette punkt blir en dikarboksytsyre som har en av sine syredeler beskyttet, omsatt med den primære aminogruppe,
25 til å gi et monoamid. Den beskyttende gruppe på den andre karboksytsyre blir deretter avspaltet og gir en fri karboksytsyre som så kan omsettes med et primært amin fra et alternativt, passende substituert fosfatsystem, i nærvær av et dehydratiserende middel til å gi et diamid av type 2, som så kan behandles for å avbeskytte fosfatgruppen eller gruppene til å gi en ønsket forbindelse ifølge oppfinnelsen.

- 30 I det spesielle tilfellet med chirale ureaforbindelser av type 2 ifølge oppfinnelsen, blir den primære aminogruppe av N-BOC-aminogruppen i fosfatesteren avbeskyttet og deretter omsatt med triklormetylklorformiat eller liknende, for å danne en isocyanatforbindelse. Isocyanatet blir så omsatt med et primært amin fra et alternativt, passende substituert fosfatsystem til å gi
35 et ureaprodukt av type 2. Dette produkt kan så behandles for å avbeskytte fosfatgruppen eller gruppene.

4. Glyseroldiamidanaloger

Disse forbindelser ifølge oppfinnelsen har en esterdel knyttet til det karbonatom som er beta til fosfatgruppen i stedet for en amiddel.

- 5 Generelt fremstilles disse forbindelser ved forestering av en beskyttet, chiral glyserol med en aktivert primær alkohol av en dioldel, etterfulgt av forestering av den sekundære alkoholdel, og deretter avbeskyttelse av glyseroldelen til å gi en ny diol. Den primære hydroksylgruppe i diolen blir så beskyttet og den sekundære hydroksylgruppe kondenseres med en acyldel til å gi en diester. Det primære hydroksyl avbeskyttes etterfulgt av forestering med et
- 10 fosforylerende middel hvorav forbindelsen (11) i det følgende er et eksempel. Etter avbeskyttelse av aminogruppen innført ved det fosforylerende middel omsettes produktet med fosgen eller en dikarboksytsyre ved anvendelse av et dehydratiserende middel som for eksempel EDC. Etterfølgende avbeskyttelse av fosfatgruppen gir forbindelser ifølge oppfinnelsen.

15

I syntesen beskrevet generelt i det foregående kan substituenten ved R^1 i forbindelsen ifølge oppfinnelsen lett varieres ved å anvende forskjellige dikarboksylsyreforbindelser. Slike syrer kan kobles til aminogruppen i fosfatestermellomproduktet i reaksjonsskjemaet skissert i det foregående, enten ved anvendelse av et dehydratiserende middel som for eksempel EDC, eller

20 ved å aktivere dikarboksylsyren ved syntetisering, for eksempel det tilsvarende disyreklorid.

Substituentene representert ved de variable R^2 og R^5 i formel I i det foregående kan lett varieres ved å utnytte en passende aktivert syre eller et syreklorid ved amiderings- eller forestringsreaksjonen av heteroatomet representert ved X eller Y i formel I.

25

Substituentene representert ved de variable R^3 og R^6 i formel I kan varieres ved å anvende et mellomprodukt inneholdende det ønskede antall karbonatomer og som også inneholder en aktivert karbonfunksjonalitet, for eksempel et halogen eller sulfonat (OSO_2CH_3 , OSO_2CF_3 , $OSO_2CH_2C_6H_4-p-CH_3$), som kan omsettes med azidodiol-, aminoalkohol- eller glyserol-

30 utgangsmaterialer.

Substituentene representert ved variable R^4 og R^7 i formel I i det foregående kan varieres ved anvendelse av en passende aktivert syre eller et syreklorid ved foresteringen av den sekundære hydroksylgruppe anvendt i reaksjonsskjemaene skissert i det foregående.

35

Verdiene av a og b i forbindelsene med formel I kan varieres ved anvendelse av den passende N-BOC beskyttede aminoalkohol når det fosforylerende middel syntetiseres, for eksempel ved hjelp av forbindelse (11) i det følgende. Verdiene av variablene d og e i forbindelser med

formel I kan modifiseres ved anvendelse av de passende 2-aminodiol- eller 2-hydroksydiol-utgangsmaterialer.

Adjuvansmiddel og vaksinesammensetning og tilførsel

- 5 Den foreliggende oppfinnelse er også rettet mot adjuvansmiddelsammensetninger omfattende adjuvansforbindelser ifølge oppfinnelsen, så vel som vaksine og andre immunstimulerende sammensetninger som omfatter adjuvansforbindelsene ifølge oppfinnelsen. Metoder for stimuleringen av en immunrespons til et spesielt antigen kan oppnås ved hjelp av foreliggende oppfinnelse.

10

De vertsdyr hvortil adjuvansforbindelsen og de adjuvansmiddelholdige vaksinesammensetninger, ifølge den foreliggende oppfinnelse med fordel tilføres, inkluderer mennesker så vel som ikke-humane pattedyr, fisk, reptiler, etc.

- 15 Typisk anvendes et antigen i blanding med adjuvansforbindelsene ifølge oppfinnelsen. I andre sammensetninger av adjuvansmiddelet ifølge foreliggende oppfinnelse kan det være nyttig ved noen anvendelser å anvende et antigen, kovalent knyttet til en amino-, karboksyl-, hydroksyl- og/eller fosfatdel av adjuvansforbindelsene ifølge oppfinnelsen. Den spesifikke sammensetning av terapeutisk aktive blandinger ifølge den foreliggende oppfinnelse kan således gjennomføres
- 20 på en hvilken som helst passende måte som vil gjøre adjuvansmiddelet biotilgjengelig, sikkert og effektivt i det individ der sammensetningen tilføres.

Oppfinnelsen omfatter bredt terapeutiske vaksinesammensetninger som omfatter (i) ett terapeutisk effektivt antigen eller vaksine; og (ii) en adjuvansforbindelse ifølge oppfinnelsen.

25

En slik terapeutisk blanding kan for eksempel omfatte minst ett antigenisk middel valgt fra gruppen bestående av:

- (A) levende, varmedrepte eller kjemisk svekkede virus, bakterier, mykoplasmaer, fungi og
- 30 protozoer;

(B) fragmenter, ekstrakter, subenheter, metabolitter og rekombinante konstruksjoner av (A);

- (C) fragmenter, subenheter, metabolitter og rekombinante konstruksjoner av
- 35 mammaliaproteiner og glykoproteiner;

(D) tumorspesifikke antigener; og

(E) nukleinsyrevaksiner.

Den terapeutiske blanding kan derfor utnytte ent hvilken som helst egnet antigen- eller vaksinekomponent i kombinasjon med en adjuvansforbindelse ifølge oppfinnelsen, for

- 5 eksempel et antigenisk middel valgt fra gruppen bestående av antigener fra patogene og ikke-patogene organismer, virus og fungi, i kombinasjon med et adjuvansmiddel ifølge oppfinnelsen.

Som et ytterligere eksempel kan slike terapeutiske blandinger passende omfatte proteiner,

- 10 peptider, antigener og vaksiner som er farmakologisk aktive for sykdomstilstander og betingelser som for eksempel vannkopper, gul feber, valpesyke, kolera, fjærkrepper, skarlagensfeber, difteri, tetanus, kikhoste, influensa, rabies, kusma, meslinger, munn- og klovsyke og poliomyelitt. I den resulterende vaksinesammensetning, omfattende (i) et antigen, (ii) minst en adjuvansforbindelse ifølge oppfinnelsen, er antigenet og adjuvansforbindelsen hver tilstede i en
- 15 mengde effektiv til å utløse en immunrespons når sammensetningen tilføres et vertsdyr, embryo eller egg vaksinert dermed.

Det er også mulig at forbindelsene ifølge oppfinnelsen kovalent bindes til vaksineantigener, for eksempel over en amino-, karbonyl-, hydroksyl- eller fosfatdel. Forbindelsene ifølge

- 20 oppfinnelsen kan bindes ved hjelp av metoder for å knytte adjuvansmiddelblanding ifølge oppfinnelsen til vaksineantigener er forstått av vanlige, fagkyndige personer i betraktning av denne beskrivelse. Adjuvansmiddelblandingene kan knyttes til vaksiner ved hvilken som helst av metodene beskrevet i P. Hoffman et al., *Biol. Chem. Hoppe-Sayler*, **1989**, 370:575-582; K.-H. Wiesmuller et al., *Vaccine*, **1989**, 7:29-33; K.-H. Wiesmuller et al., *Int. J. Peptide Protein*
- 25 *Res.*, **1992**, 40:255-260; J.-P. Defourt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89:3879-3883; T. Tohokuni et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116:395-396; F. Reichel, *Chem. Commun.*, **1997**, 2087-2088; H. Kamitakahari, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37:1524-1528; W. Dullenkopf et al., *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5:2432-2438;

- 30 De resulterende vaksinesammensetninger, inkluderende (i) et antigen, og (ii) en adjuvansforbindelse, blir vanlig anvendt for å indusere en immunologisk respons i et dyr, for eksempel ved å tilføre dyret vaksinesammensetningen, i en mengde tilstrekkelig til å frembringe en antistoffrespons i dette dyr.

- 35 Tilførselsmåtene kan omfatte bruken av hvilke som helst egnede midler og/eller metoder for å avgi adjuvansmiddelet, den adjuvansmiddelholdige vaksine, eller adjuvansmiddelet og/eller antigenet til en eller flere korporlige steder på vertsdyret, hvor adjuvansmiddelet og assosierte antigener er immunstimulerende effektive. Tilførselsmåter kan inkludere parenterale

tilførselsmetoder, som for eksempel subkutan (SC) injeksjon, transkutan, intranasal (IN), oftalmisk, transdermal intramuskulær (IM), intradermal (ID), intraperitoneal (IP), intravaginal, pulmonal og rektal tilførsel, så vel som ikke-parenteral, for eksempel oral tilførsel.

- 5 Dosemengden og egnede doseformer for adjuvansmiddelet og vaksineblandingen ifølge den foreliggende oppfinnelse, kan lett bestemmes av de fagkyndige uten for mye eksperimentering, ved bruk av konvensjonelle antistofftiter bestemmelsesmetoder og konvensjonelle bioeffektivitets/bioforlikelighets protokoller, og avhengig av det spesielle antigen eller terapeutisk middel som anvendes sammen med adjuvansmiddelet, den ønskede terapeutiske
- 10 virkning, og den ønskede tidsvarighet for bioaktiviteten.

Adjuvansmiddelet kan fordelaktig tilføres vertsdiret sammen med hvilket som helst andre egnede farmakologisk eller fysiologisk aktive midler, for eksempel antigeniske og/eller andre biologisk aktive substanser.

15

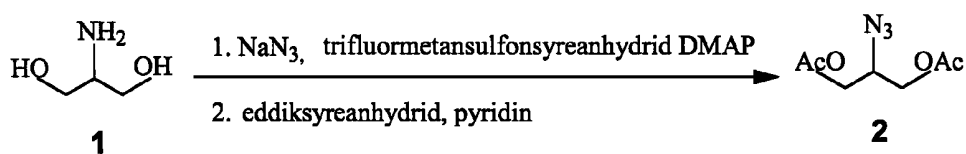
Sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan inkludere ytterligere komponenter som saltoppløsning, olje, squalen, olje-vann dispersjoner, liposomer og andre adjuvansmidler som for eksempel QS-21, muramyl peptider, Freund's ufullstendige adjuvansmiddel og liknende.

20 Synteseeksempler

Alle reaksjonsprodukter i syntesemetodene beskrevet i det følgende ga tilfredsstillende NMR-spektra og tynnsjikt-kromatografiprofiler på silikagel. All kromatografi ble utført på silikagel og elueringen overvåket ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi. Alle fullførte reaksjoner ble bestemt ved hjelp av tynnsjikt-kromatografisk analyse. Alle reaksjoner ble gjennomført under

25 nitrogen ved romtemperatur med mindre annet spesielt er angitt. Alle reaksjonsløsningsmidler var vannfrie med mindre annet er angitt. Den typiske opparbeidelse for de kjemiske reaksjoner beskrevet i det følgende inkluderer vandige vaskinger, tørking over vannfritt natriumsulfat og fjerning av løsningsmiddel under redusert trykk.

30 Eksempel 1: Suksinat-1

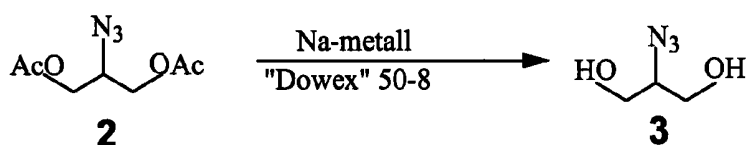


En oppløsning av natriumazid (107,67 g) i 250 ml vann ble tilsatt 300 ml metylenklorid.

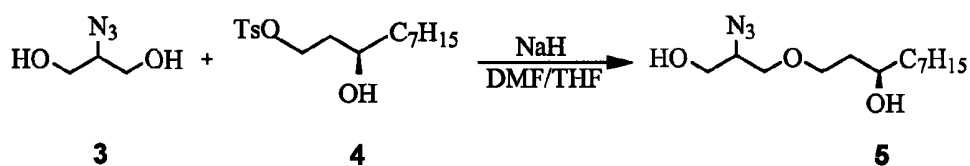
Blandingen ble avkjølt til 0°C og trifluoromethanesulfonic anhydride (57 ml) ble tilsatt dråpevis

- 35 med 0,32 ml/minutt takt. Blandingen ble omrørt i ytterligere 6 timer ved 0°C og lagret ved

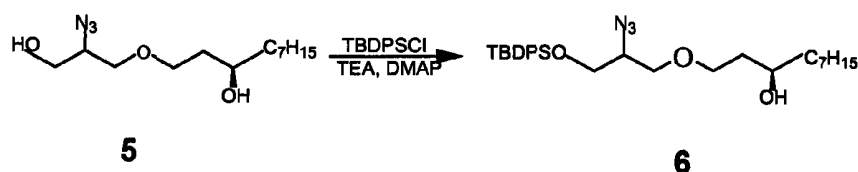
10 timer ved romtemperatur. Ytterligere eddiksyreanhydrid (20 ml) ble tilsatt og etter 4 timer ble blandingen helt ut på is og opparbeidet på den vanlige måte. Kromatografi ga 16 g diacetat (2) som olje.



15 Diacetatet (2) (16 g) ble oppløst i metanol (150 ml) og natriummetallet (2,0 g) ble sakte tilsatt. Blandingen ble omrørt i 90 minutter og "Dowex" 50-8 harpiks ble tilsatt inntil pH var mindre enn eller lik 7. Blandingen ble filtrert etterfulgt ved konsentrasjon av filtratet og kromatografi til å gi 6,73 g av diol (3).



25 fortynnet med metanol (200 ml), omrørt med "Amberlite" 125 H⁺ i 25 minutter og konsentrert til tørrhet. Kromatografi ga 4,37 g av (5).



5



15

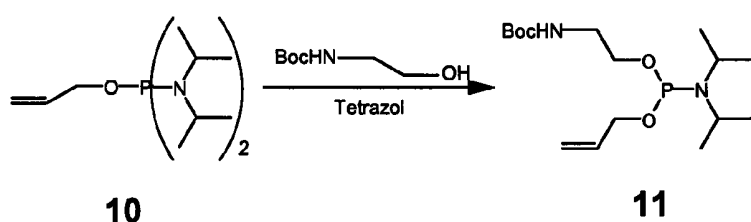


C



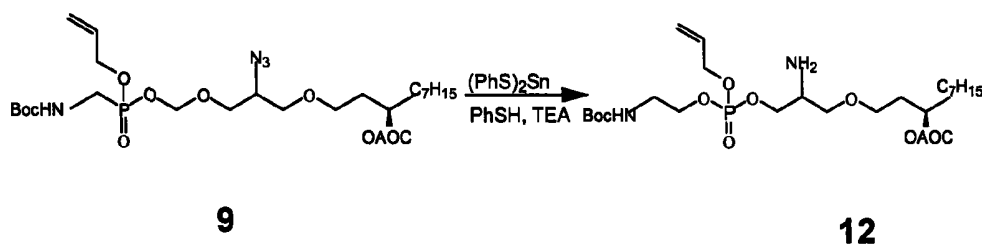
9

- En oppløsning av alkohol (8) (150 mg) i metylenklorid (0,6 ml) ble tilsatt tetrazol (74 mg) og det fosforylerende reagens (11) (175 mg). Etter 30 minutter ble okson (323 mg) i en avkjølt THF (0,5 ml)-vann (0,5 ml) oppløsning tilsatt til den avkjølte reaksjonsblanding. Etter 3 timer ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 242 mg av (9) som en olje.



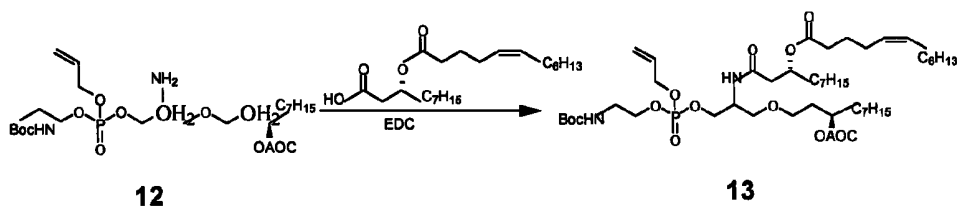
- 10 For å fremstille det fosforylerende reagens (11) ble en oppløsning av destillert diisopropylamin (9,0 ml) i metylenklorid sakte tilsatt tetrazol (4,51 g) ved romtemperatur, etterfulgt av omrøring i 1,5 timer. Allylfosforodiamidit (10) (20,5 ml) ble dråpevis tilsatt i en takt på 6,5 ml/time, etterfulgt av omrøring i ytterligere 3 timer. *N*-BOC-2-aminoetanol (10,36 g) i metylenklorid (50 ml) ble dråpevis tilsatt den ovennevnte reaksjonsblanding med en takt på 8,4 ml/time, etterfulgt av omrøring i ytterligere 18 timer. Den hvite suspensjon ble filtrert gjennom "Celite" 545 med to 20ml vaskinger med metylenklorid. Filtratet ble konsentrert, etterfulgt av en suspensjon og filtrering av resten med heksaner (200 ml). Det resulterende heksanfiltrat ble konsentrert til tørrhet og azeotropdestillert med to 10-ml porsjoner av toluen til å gi råproduktet (11) (21,54 g) som en olje.

20

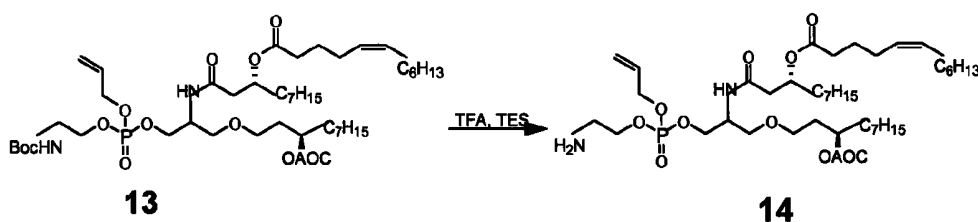


- En suspensjon av ditiofenoltinn (1,3 g) i metylenklorid (7,8 ml) ble tilsatt tiofenol (400 µl) etterfulgt av TEA (543 µl). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 15 minutter etterfulgt av stans i omrøringen slik at resten fikk avsette seg på bunnen av kolben. 1,0 ml av den ovennevnte oppløsning ble tilsatt til en oppløsning av azidet (9) (242 mg) i metylenklorid (0,5 ml) og blandingen ble omrørt i 30 minutter. Reaksjonsstans med 0,1 N NaOH etterfulgt av den vanlige opparbeidelse ga 193,1 mg av aminet (12) som en olje.

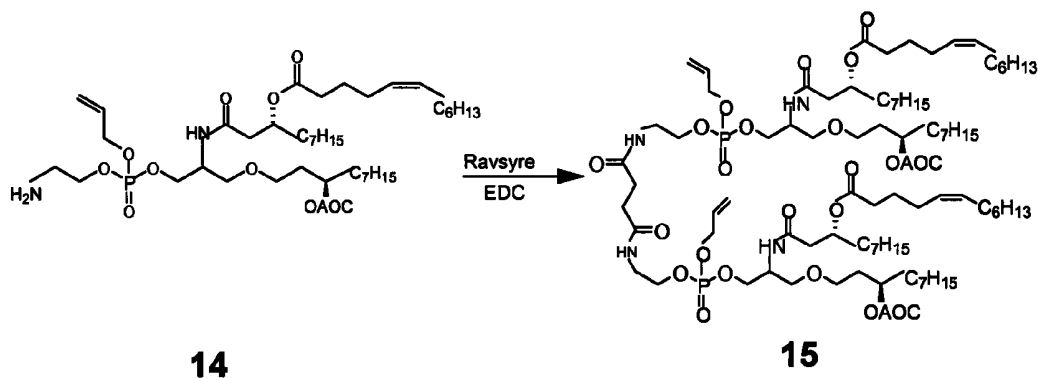
25



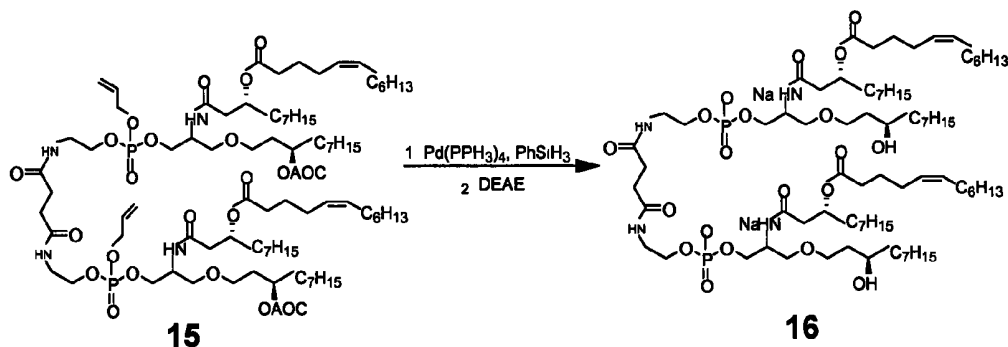
En tørket oppløsning av aminet (12) (193 mg) og acylsyre (som kan fremstilles ifølge Christ et al., U.S.Pat.Nr. 5 530 113) (132 mg) i metylklorid ble tilsatt 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimidhydroklorid (EDC, 93 mg). Etter omrøring ved romtemperatur i 90 minutter ble reaksjonen stanset og blandingen ble behandlet på vanlig måte til å gi 232 mg beskyttet fosfat (13) som en olje.



En oppløsning av det beskyttede fosfat (13) (232 mg) i metylenklorid (1 ml) ble tilsatt trietylsilan (TES, 120 μ l) og trifluoreddiksyre (TFA, 1,2 ml) etterfulgt ved omrøring i 30 minutter. TFA ble fjernet under redusert trykk etterfulgt ved azeotrop destillasjon med 3,5-ml porsjoner av toluen. 20 ml metylenklorid ble tilsatt og blandingen ble opparbeidet på vanlig måte til å gi 174 mg av det fri amin (14) som en olje.



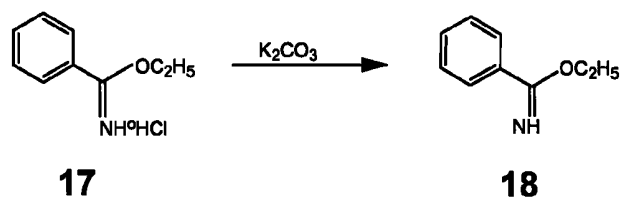
En tørket oppløsning av det frie amin (14) (174 mg) i metylenklorid (0,5 ml) ble tilsatt ravsyre (12,1 mg) og EDC (59 mg). Etter 1 time ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 143,1 mg av blokkert difosfat (15) som en olje.



En oppløsning av blokkert difosfat (15) (177,9 mg) i avgasset kloroform (1,7 ml) i et tørkeskap ble først tilsatt fenylsilan (PhSiH_3 , 50 μl), og deretter tetrakis-

- 5 trifenylofosfinpalladium (0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 70 mg). Etter 1 time ble reaksjonsblandingen fjernet fra tørkeskapet og kloroform:metanol:vann 2:3:1 ble tilsatt og blandingen omrørt i 1 time. Blandingen ble helt ut på en diethylaminoetylcellulose (DEAE) kromatografikolonne. Eluering av kolonnen med en lineær gradient på 0,0 M til 0,1 M ammoniumacetat i kloroform:vann 2:3:1, ekstraksjon av de ønskede fraksjoner med et likt volum av kloroform, konsentrasjon til
- 10 tørrhet og tilsetning av 0,1 N NaOH (175 μl) etterfulgt av frysetørking ga 136,2 mg av (16) som et hvitt, fast stoff.

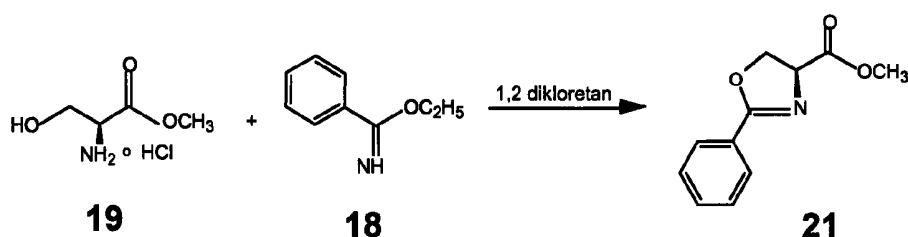
Eksempel 2: Chiralt malonat - type 1



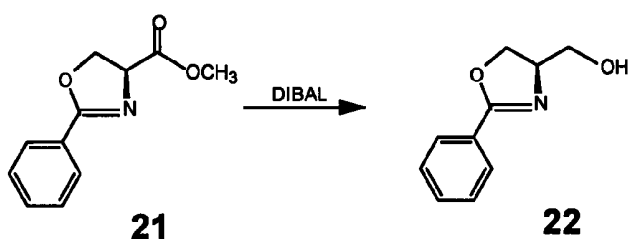
15

En avkjølt oppløsning av kaliumkarbonat (165 g) i vann (575 ml) ble tilsatt metylenklorid (200 ml) etterfulgt av etylbenzimidathydroklorid (17) (100 g) og blandingen ble omrørt i 8 minutter. Lagene ble separert og det vandige lag ekstrahert med metylenklorid. De organiske lag ble kombinert, tørket og løsningsmiddel fjernet under redusert trykk til å gi 83 g av (18).

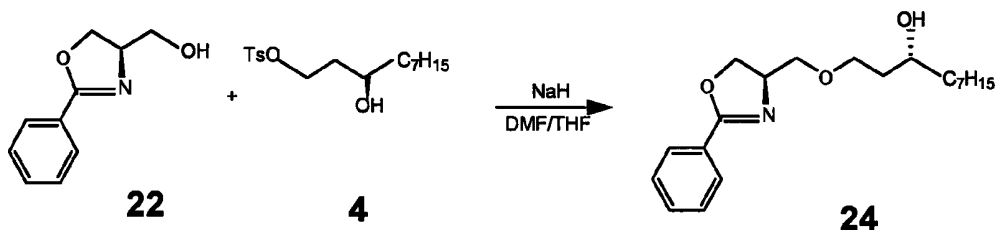
20



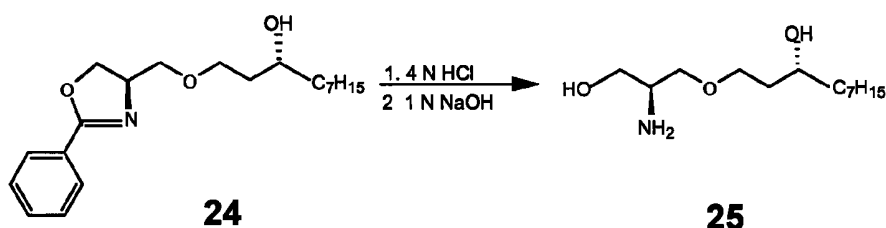
- En oppløsning av L-serin metylesterhydroklorid (19) (41,6 g) i 1,2-diklorethan (450 ml) ble tilsatt etylbenzimidat (18) (36 g). Blandingen ble oppvarmet til tilbakeløp i 20 timer, avkjølt, filtrert gjennom diatomejord, og konsentrert til tørrhet til å gi 56 g av etylester (21) som et hvitt, fast stoff.



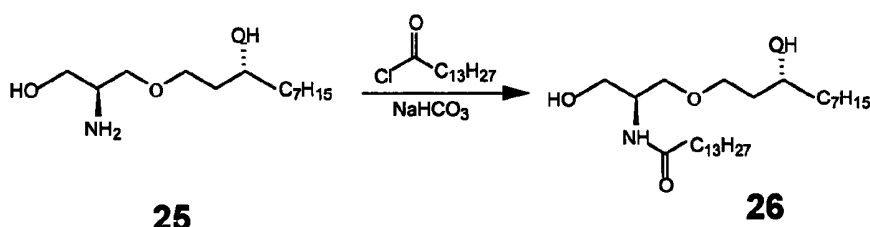
- En iskald oppløsning av etylester (21) (56 g) i THF (500 ml) ble dråpevis tilsatt diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL, 545 ml av en 1 M oppløsning i heksan). Blandingen ble oppvarmet til romtemperatur over natten og deretter forsiktig helt ut på en vandig oppløsning av Rochelle-salt (500 g i 1,0 l vann). Blandingen ble omrørt i 1 time og opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 25,5 g av alkohol (22) som et hvitt, fast stoff.



- En suspensjon av vasket natriumhydrid (5,3 g av en 60 % oljedispersjon) i DMF (200 ml) ble tilsatt alkoholen (22) (24 g) i 250 ml av THF. Etter 30 minutter ble tosylatet (4) tilsatt i 250 ml THF i løpet av 2,5 timer og omrørt over natten. Blandingen ble avkjølt i is, metanol ble tilsatt, løsningsmiddelet fjernet under redusert trykk og kromatografert til å gi 4,32 g alkohol (24) som en olje.

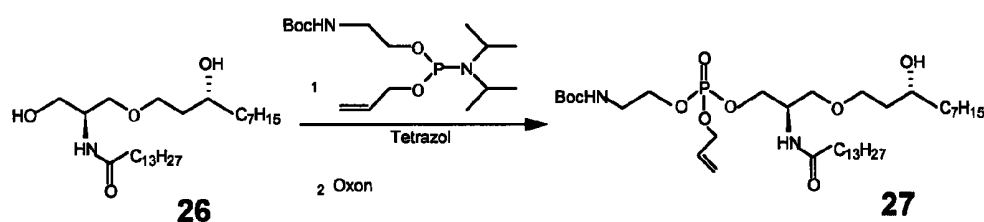


Alkoholen (24) (4,3 g) ble oppløst i 4 N vandig saltsyre og oppvarmet under tilbakesløp i 20 timer. Blandingen ble avkjølt, filtrert, ekstrahert med eter, gjort alkalisk med natriumhydroksid og ekstrahert to ganger med kloroform. De kombinerte kloroformlag ble tørket og løsningsmiddelet fjernet til å gi 2,88 g diol (25) som en olje.

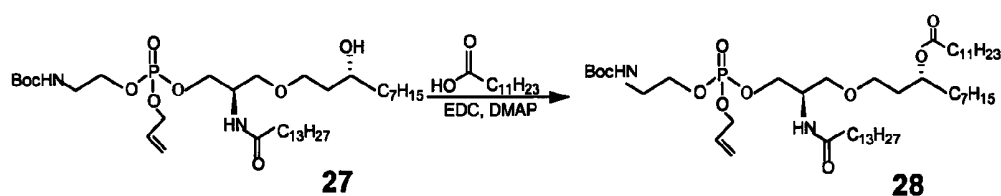


Diolen (25) (2,88 g) ble oppløst i mettet vandig natriumbikarbonat (45 ml) og THF (25 ml) og blandingen ble omrørt i 5 minutter. Myristoylchlorid (3,4 ml) ble dråpevis tilsatt over en periode på 25 minutter og deretter ble reaksjonsblandingen omrørt i ytterligere 1 time.

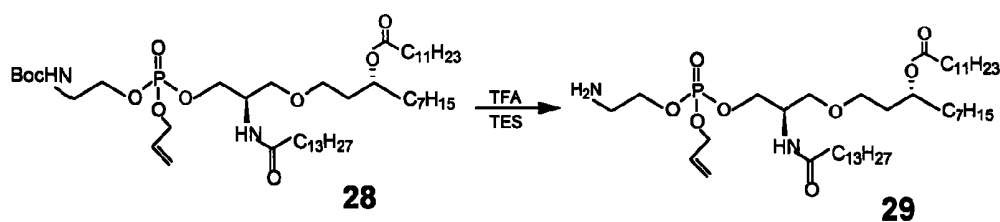
- 10 Reaksjonsblandingen ble opparbeidet på vanlig måte og kromatografert til å gi 3,7 g av alkohol (26) som en olje.



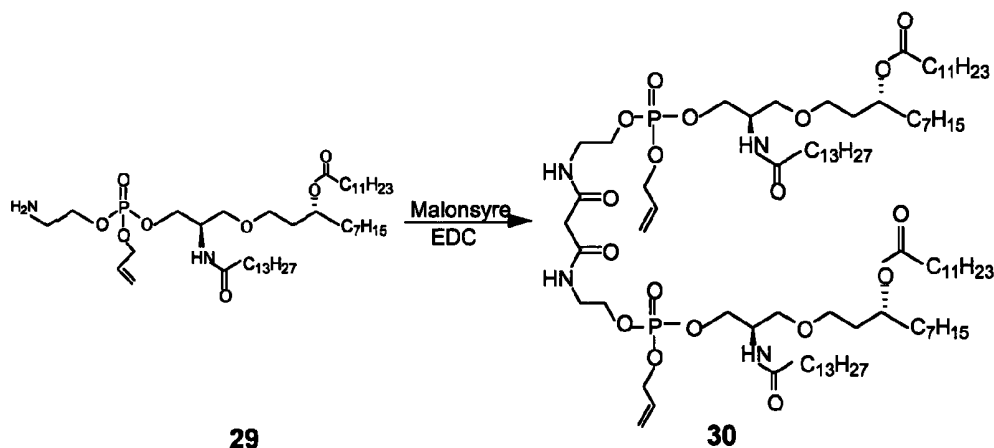
- 15 En oppløsning av alkoholen (26) (1,78 g) i metylenklorid (140 ml) ble tilsatt tetrazol (683 mg), etterfulgt av det fosforylerende reagens (11) (1,6 ml). Etter 30 minutter ble blandingen avkjølt på is og THF (105 ml) ble tilsatt etterfulgt av en "Oxone"-oppløsning (3 g i 90 ml vann). Etter 5 minutter ble isbadet fjernet og blandingen omrørt i 30 minutter. Reaksjonsblandingen ble opparbeidet på vanlig måte og kromatografert for å gi 2,99 g av alkohol (27) som en olje.
- 20



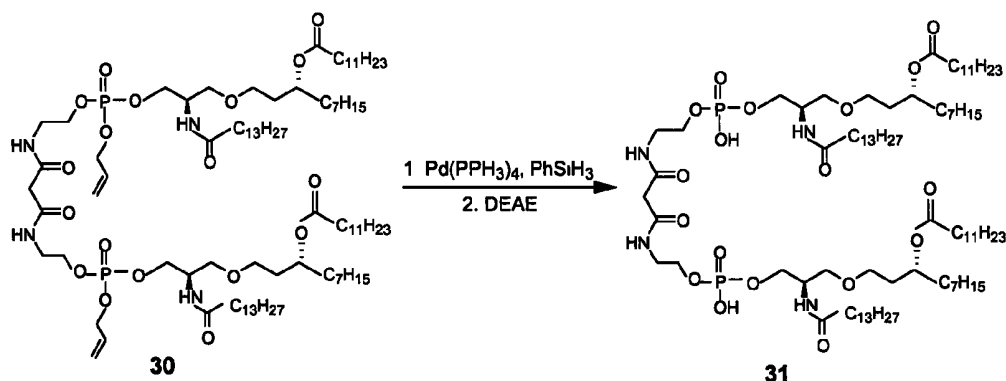
En oppløsning av alkoholen (27) (3,9 g) i metylenklorid (126 ml) ble tilsatt EDC (10,8 g), DMAP (66 mg) og dodecylsyre (1,62 g) og omrørt over natten. Ytterligere syre (1,6 g), EDC (1 g) og DMAP (0,5 g) ble tilsatt. Etter 3 timer ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte og kromatografert til å gi 2,07 g *N*-BOC-beskyttet amin (28).



En oppløsning av det *N*-BOC-beskyttede amin (28) (187,3 mg) i metylenklorid (1,5 ml) ble tilsatt TES (240 μ l) og TFA (300 μ l) og blandingen ble omrørt i 45 minutter. Toluen ble tilsatt og løsningsmiddelet fjernet under redusert trykk. Resten ble oppløst i metylenklorid og opparbeidet på vanlig måte til å gi 154 mg av amin (29) som en olje.



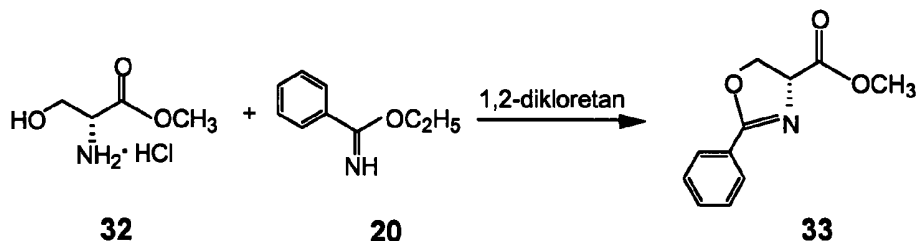
En iskald oppløsning av aminet (29) (75,6 mg) og malonsyre (4,8 mg) i metylenklorid (0,5 ml) ble tilsatt EDC (27 mg), etterfulgt av fjerning av kjølebadet. Etter 1 time ble tilsatt et spor av DMAP. Etter 2,5 timer ble blandingen direkte kromatografert til å gi 54,1 mg av dimert produkt (30).



En oppløsning av dimeren (30) (54 mg) i avgasset kloroform (2 ml) ble tilsatt PhSiH₃ (14 µl) og Pd(PPh₃)₄ (18 mg) etterfulgt av fjerning av kjølebadet. Etter 1 time ble reaksjonen brakt til opphør med kloroform:metanol:vann (2:3:1) og helt ut på en DEAE cellulose

- 5 kromatografikolonne og kromatografert til å gi et halvfast stoff. Faststoffet ble oppløst i sterilt vann og 0,1 N vandig natriumhydroksid (306 µl) ble tilsatt og blandingen frysetørket til å gi et hvitt, fast stoff (31) (25 mg).

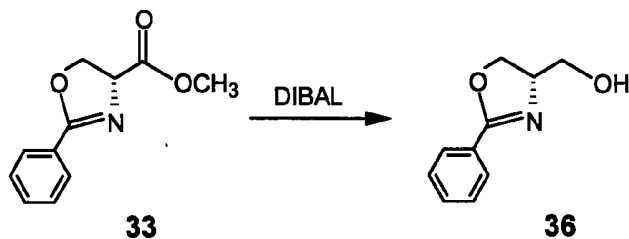
Eksempel 3: Chiralt malonat - type 2



10

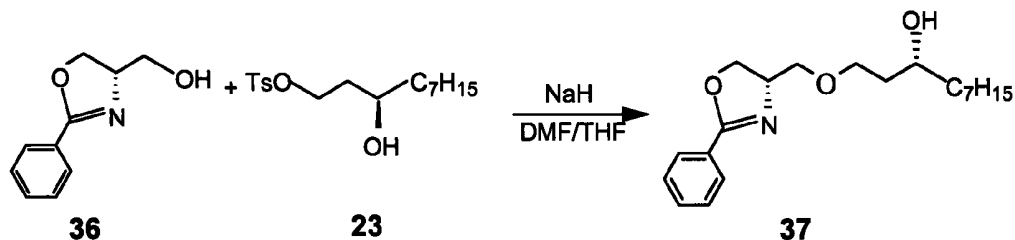
En oppløsning av D-serin metylesterhydroklorid (32) (25 g) i dikloretan (270 ml) ble tilsatt etylbenzimidat (20) (24 g). Etter 20 timer under tilbakebøl ble blandingen avkjølt til romtemperatur, filtrert gjennom diatomejord og løsningsmiddelet fjernet under redusert trykk til å gi 34 g metylester (33) som et hvitt, fast stoff.

15

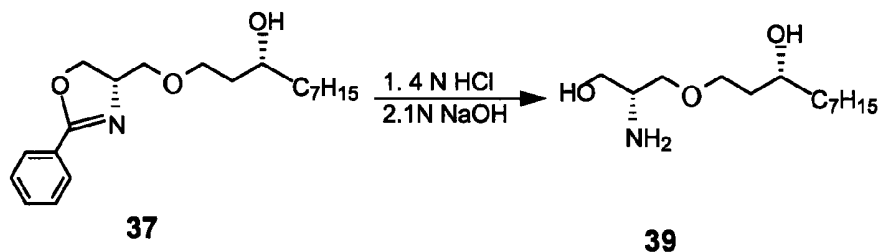


En iskald oppløsning av etylesteren (33) (34 g) i THF (300 ml) ble tilsatt dråpevis en oppløsning av DIBAL i heksan (1,0 M, 322 ml). Blanding ble oppvarmet til romtemperatur

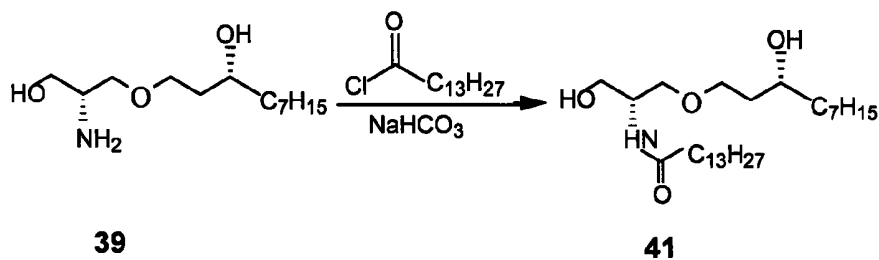
over natten og ble så helt ut i en vandig oppløsning av Rochelle-salt. Blandingen ble så omrørt i 1 time og opparbeidet. Kromatografi ga 18,6 g av alkohol (36) som et hvitt, fast stoff.



- 5 En suspensjon av vasket natriumhydrid (4 g av en 60 % oljesuspensjon) i DMF (100 ml) ble tilsatt en oppløsning av alkoholen (36) (8,6 g) i THF (40 ml). Blandingen ble omrørt i 1 time og en oppløsning av tosylatet (23) (17,5 g) i THF (40 ml) ble tilsatt. Blandingen ble omrørt over natten og deretter ble ytterligere tosylat (23) tilsatt (5 g) og blandingen ble omrørt i ytterligere 4 timer. Metanol ble tilsatt den avkjølte reaksjonsblandingen, løsningsmiddelet ble
- 10 fjernet under redusert trykk og resten ble kromatografert til å gi 1,03 g av alkohol (37) som et fast stoff.

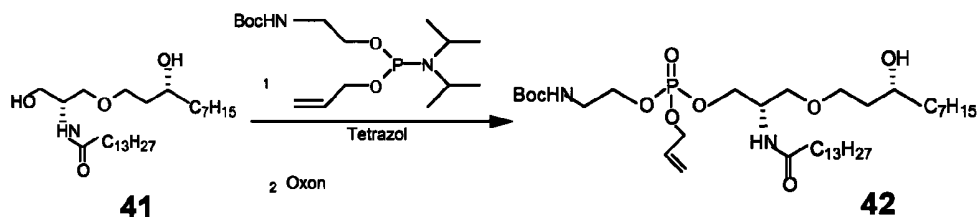


- Alkoholen (37) (1,03 g) ble oppløst i 4 N vandig saltsyre (25 ml) og blandingen ble
- 15 oppvarmet til 100 °C i 20 timer. Ytterligere saltsyre (5 ml) ble tilsatt og tilbakeløpet fortsatte i 6 timer. Blandingen ble avkjølt, vasket med eter, gjort alkalisk med 1 N vandig natriumhydroksid, og ekstrahert (3x) med kloroform. De kombinerte kloroformlag ble tørket og løsningsmiddelet fjernet under redusert trykk til å gi 553 mg av aminodiol (39).



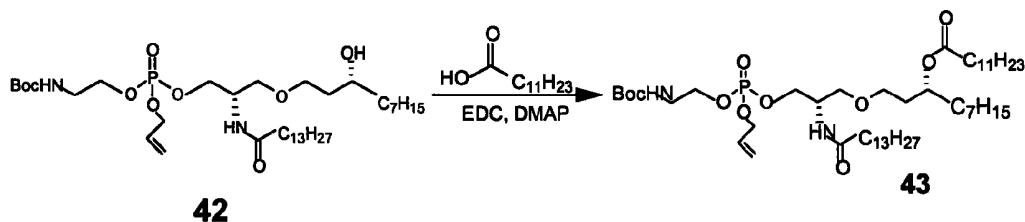
En oppløsning av aminodiol (39) (553 mg) i THF (3 ml) ble tilsatt mettet vandig natriumbikarbonat (6 ml) etterfulgt av myristoylchlorid (628 μ l). Etter 50 minutter ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 389 mg av amid-diols (41) som en olje.

5



En oppløsning av amid-diolen (41) (531 mg) i metylenklorid (40 ml) ble tilsatt tetrazol (203 mg) og blandingen ble omrørt i 5 minutter. Deretter ble det fosforylerende reagens (11) (482 mg) tilsatt. Etter 20 minutter ble tilsatt ytterligere fosforylerende reagens (11) (100 mg), og etter ytterligere 20 minutter ble 100 mg mer tilsatt. Etter ytterligere 20 minutter ble 50 mg mer tilsatt. Etter 20 minutter ble blandingen helt ut i en kald oppløsning av THF (30 ml)/"oxone" (1,07 g)/vann (30 ml). Blandingen ble omrørt ved 0 °C i 5 minutter og deretter i 20 minutter ved romtemperatur idet reaksjonsblandingen etter denne tid ble opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 852 mg av fosfatalkoholen (42) som en olje.

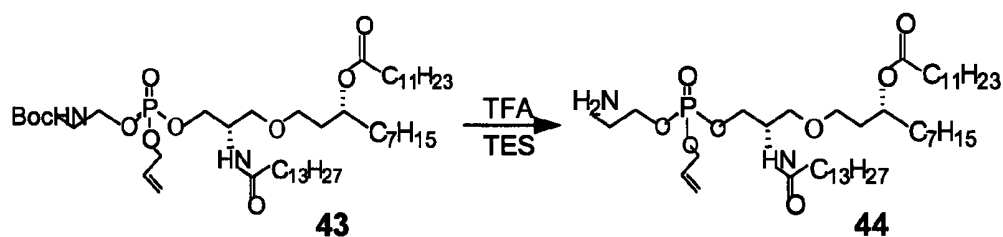
10



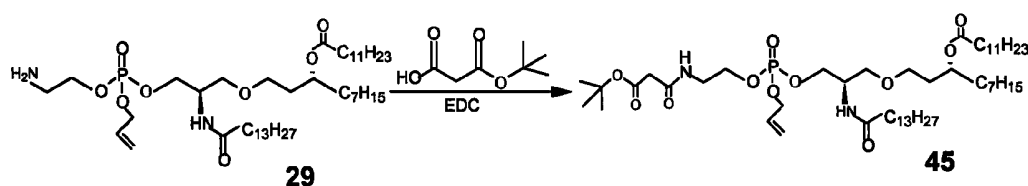
15

En oppløsning av fosfatalkoholen (42) (3,9 g) i metylenklorid (126 ml) ble tilsatt EDC (10,8 g), DMAP (66 mg) og dodecylsyre (1,62 g). Reaksjonsblandingen ble omrørt over natten. Ytterligere syre (1,6 g), EDC (1 g) og DMAP (0,5 g) ble tilsatt. Etter 3 timer ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte og kromatografert til å gi 2,07 g av det beskyttede amin (43).

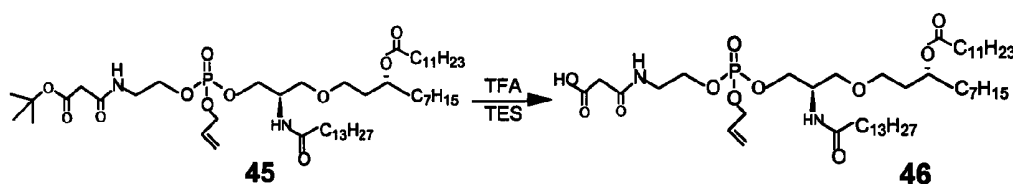
20



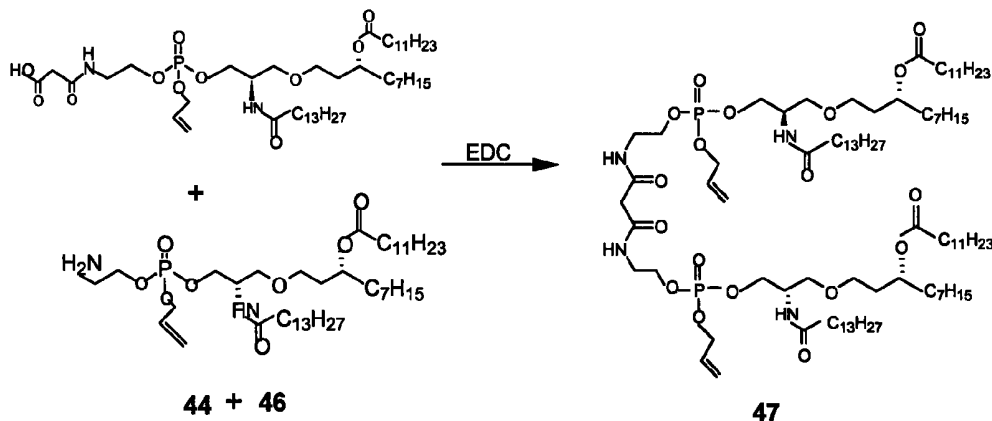
- En oppløsning av det beskyttede amin (43) (194 mg) i metylenklorid (1,5 ml) ble tilsatt TES (240 μ l), og TFA (300 μ l). Blandingen ble omrørt i 20 minutter og ytterligere TES (50 μ l) og TFA (50 μ l) ble tilsatt. Etter 1 time ble toluen tilsatt og løsningsmiddelet ble fjernet under redusert trykk og deretter ble blandingen opparbeidet på vanlig måte. Det rå, frie
- 5 aminproduktet (44) ble anvendt omgående i den neste reaksjon.



- En iskald oppløsning av det frie amin (29) (43,5 mg) i metylenklorid (250 μ l) ble tilsatt mono-t-butylmalonat (8,3 μ l), EDC (12,4 mg) og spor av DMAP. Isbadet ble fjernet og etter 2
- 10 timer ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 44 mg av amid (45).

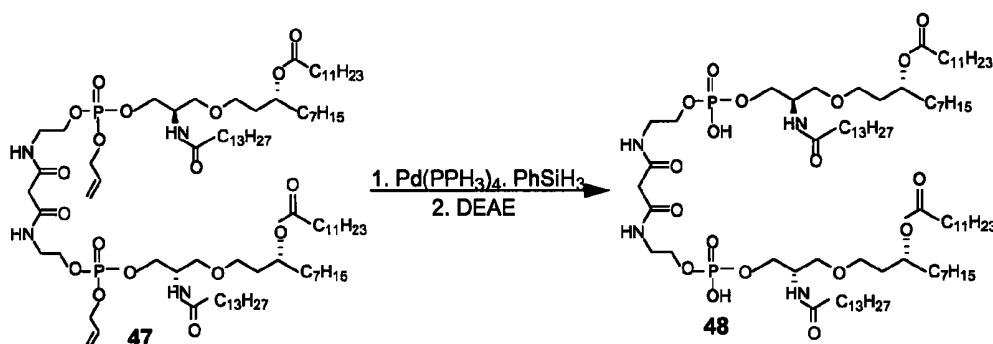


- En oppløsning av amidet (45) (44 mg) i metylenklorid (0,5 ml) ble tilsatt TES (90 μ l) og TFA
- 15 (100 μ l). Etter 2 timer ble toluen tilsatt og løsningsmiddelet fjernet under redusert trykk. Blandingen ble opparbeidet på vanlig måte til å gi 44,2 mg av fri syre (46).



En iskald oppløsning av den fri syre (46) (41 mg) og det fri amin (44) (26,3mg) i metylenklorid (500 µl) ble tilsatt EDC (13 mg) og blandingen ble omrørt i 30 minutter. Ytterligere EDC (5 mg) og PMAP (2 mg) ble tilsatt og etter 1 time ble reaksjonsblanding

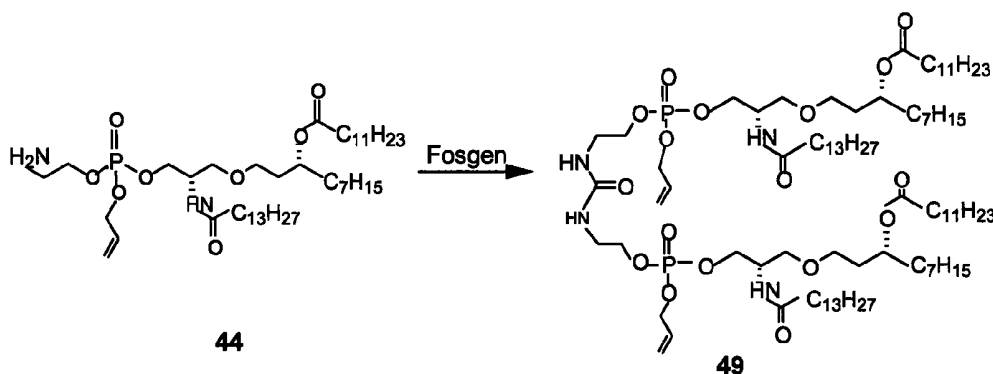
5 en olje.



En oppløsning av den koblete forbindelse (47) (32,7 mg) i avgasset kloroform (1,5 ml) i et tørkeskap ble tilsatt PhSiH₃ (8,5 µl) og Pd(PPh₃)₄ (11 mg). Blandingen ble fjernet fra tørkeskapet og avkjølt i is. Etter 5 minutter ble isbadet fjernet og etter 1 time ble

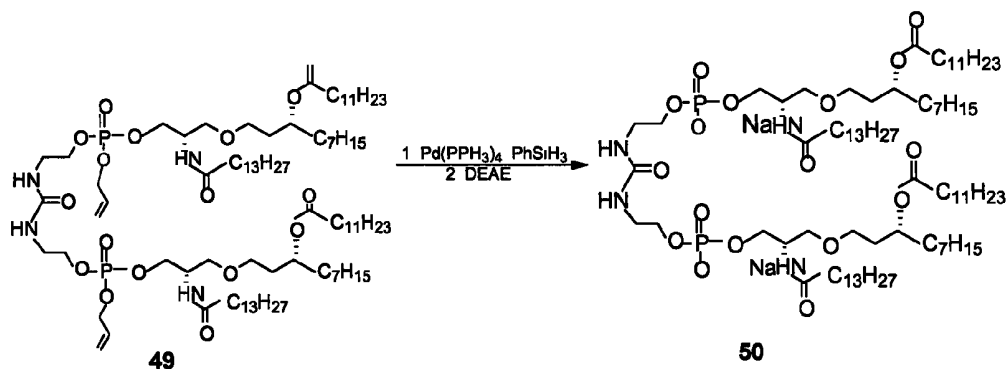
- 10 kloroform:metanol:vann (2:3:1) tilsatt og blandingen omrørt i 15 minutter og lagret i fryseren over natten. Blandingen ble så helt ut på en DEAE kromatografikolonne. Kromatografi ga 13,9 mg av en forbindelse (48) som et hvitt pulver etter 0,1 N NaOH behandling etterfulgt av frysetørrking.

15 Eksempel 4: Chiral ureaforbindelse - type 1



En oppløsning av amin (44) (46,1 mg) i toluen ble tilsatt mettet natriumbikarbonat (0,5 ml) etterfulgt av fosgen (15 µl) av en 1,93 M oppløsning i toluen). Etter 30 minutter ble ytterligere fosgen (10 µl) tilsatt. Etter 2 timer ble ytterligere fosgen (5 µl) tilsatt. Reaksjonen ble brakt til

opphør med vandig natriumbikarbonat og opparbeidet på vanlig måte til å gi 29,6 mg urea (49) med beskyttede fosfater.

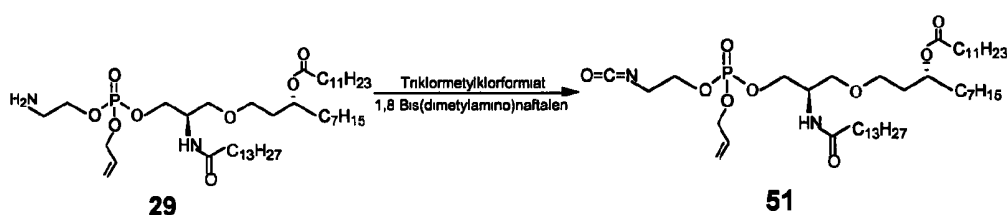


5

En oppløsning av ureaforbindelsen med beskyttede fosfater (49) (29,6 mg) i avgasset kloroform (1,5 ml) i et tørkeskap ble tilsatt PhSiH₃ (8 µl). Reaksjonskaret ble fjernet fra tørkeskapet og anbrakt på is. Pd(PPh₃)₄ (10 mg) ble tilsatt og etter 5 minutter ble isbadet fjernet. Etter 1 time ble reaksjonen brakt til opphør ved tilsetning av kloroform:metanol:vann.

- 10 Blandingen ble omrørt i 15 minutter og lagret over natten i fryseren. Den ble kromatografert på DEAE til å gi 24,1 mg av forbindelsen (50) som et hvitt pulver etter 0,1 N NaOH behandling etterfulgt av frysetørking.

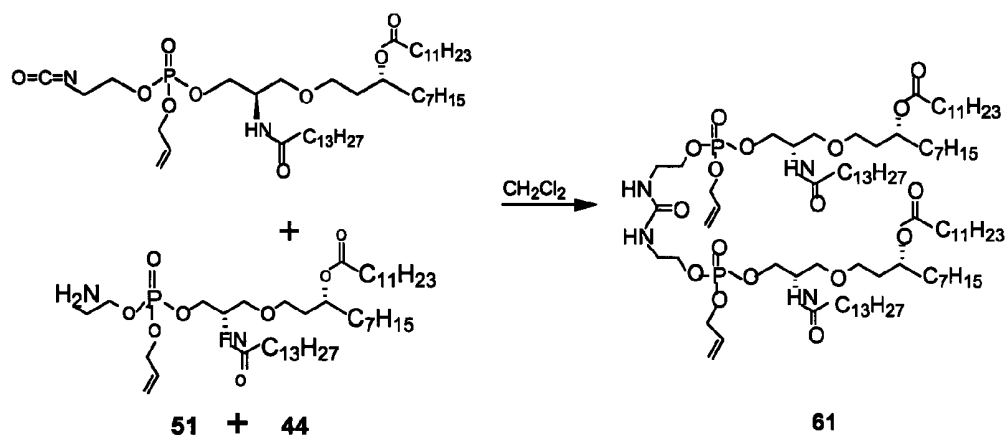
Eksempel 5: Chiral ureaforbindelse - type 2



15

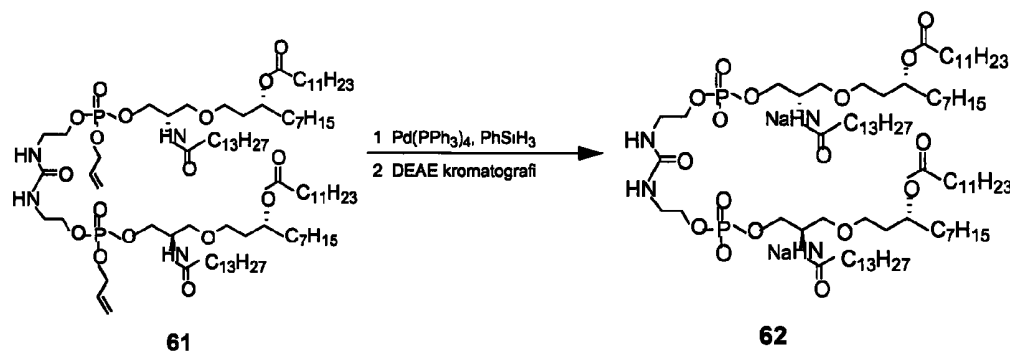
En iskald oppløsning av triklorometylkloroformiat (2,6 µl) i metylenklorid (200 µl) ble tilsatt en oppløsning av fritt amin (29) (35 mg) og 1,8-bis-(dimetylamino)-naftalen i metylenklorid (200 µl). Etter 5 minutter ble isbadet fjernet. Etter 15 minutter ble ytterligere metylenklorid tilsatt og blandingen ble opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 9,4 mg isocyanat (51)

- 20 som en olje.



En oppløsning av isocyanat (51) (9,4 mg) i metylenklorid (0,2 ml) ble tilsatt en oppløsning av aminet (44) (10,3 mg) i metylenklorid. Etter 15 minutter ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 5,5 mg av den koblede forbindelse (61) som en olje.

5

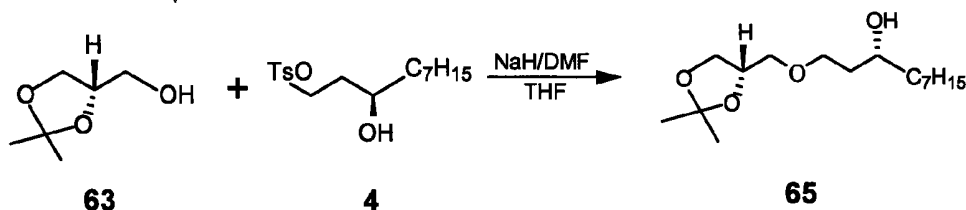


10

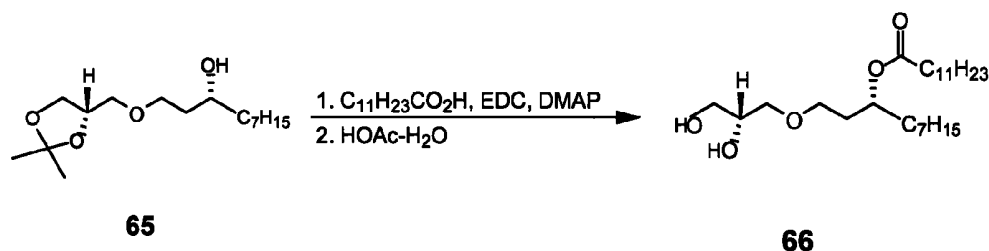
En oppløsning av den koblede forbindelse (61) (25,2 mg) i avgasset kloroform (0,5 ml) i et tørkeskap ble tilsatt PhSiH_3 (6,6 μl) og $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (8,8 mg). Blandingen ble fjernet fra tørkeskapet og avkjølt i is. Etter 5 minutter ble isbadet fjernet og etter 1 time ble kloroform:metanol:vann (2:3:1) tilsatt og blandingen ble omrørt i 15 minutter og lagret i

15

fryseren over natten. Blandingen ble så helt ut på en DEAE kromatografikolonne. Kromatografi ga 7,5 mg av (62) som et hvitt pulver etter 0,1 N NaOH behandling etterfulgt av frysetørrking.

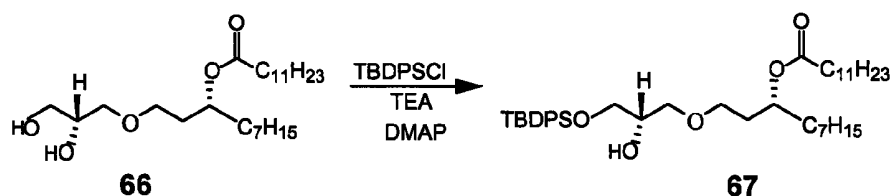
Eksempel 6: Chiral glyserolanalogue av type 1

- 5 En omrørt suspensjon av natriumhydrid (145,5 mg av 60 % oljedispersjon vasket med heksaner) i DMF (12 ml) ble tilsatt (S)-(+)-alkohol (63) (0,41 ml) i 8 ml av THF dråpevis i løpet av en 1-times periode. Blandingen ble omrørt i ytterligere 30 minutter etterfulgt av en dråpevis tilsetning av tosylatet (4) (0,789 g) i 10 ml THF i løpet av en 10-minutters periode. Den resulterende reaksjonsblanding ble omrørt over natten. Den vanlige opparbeidelse ga 0,6 mg av det ønskede addukt (65).



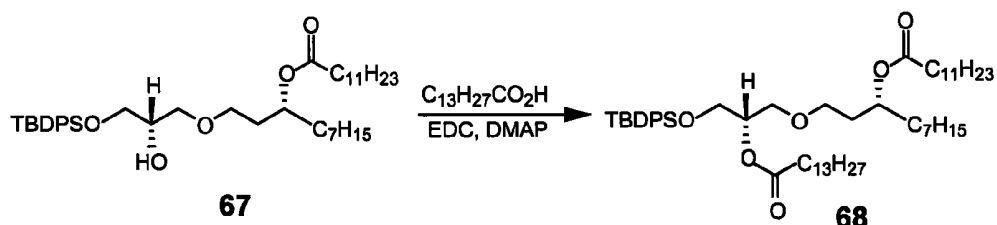
En oppløsning av laurinsyre (1,40 g), EDC (1,35 g), DMAP (0,04 g) og alkoholadduktet (65) (0,564 g) i 4 ml metylenklorid ble omrørt i 15 timer ved romtemperatur. Saltløsning og mettet vandig bikarbonat (1:1) ble tilsatt og blandingen ble ekstrahert med metylenklorid.

- 15 Blandingen ble opparbeidet på vanlig måte og kromatografert. Den ønskede fraksjon ble oppløst i 20 ml eddiksyre:vann (4:1) og omrørt i 15 timer. Løsningsmiddelet ble fjernet under redusert trykk og resten kromatografert til å gi 0,77 g av den halvfasten diol (66).

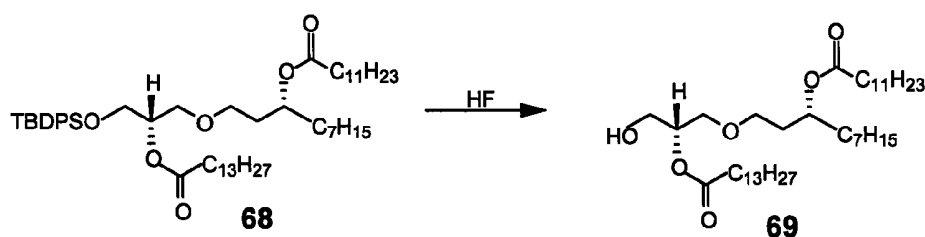


- 20 En oppløsning av diolen (66) (0,22 g), DMAP (6,3 mg), TEA (100myl) og TBDPSCI (164 μ l) ble omrørt i 24 timer ved romtemperatur. Metanol (2 ml) og spor av vandig saltsyre ble tilsatt,

etterfulgt av ekstraksjon med metylenklorid. Blandingen ble opparbeidet på vanlig måte. Resten ble kromatografert til å gi 0,3 g av alkoholen (67) som en olje.

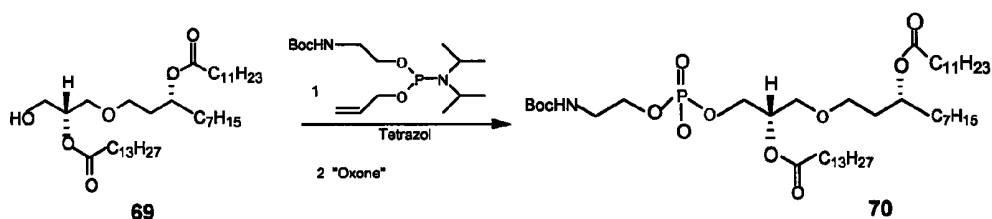


- 5 En oppløsning av alkoholen (67) (0,3 g), DMAP (5,5 mg), EDC (258 mg), myristinsyre (308 mg) i metylenklorid (4 ml) ble omrørt i 18 timer ved romtemperatur, etterfulgt av tilsetning av saltløsning og mettet natriumbikarbonat. Blandingen ble opparbeidet på vanlig måte og kromatografert til å gi 0,4 g silylbeskyttet eterprodukt (68).



10

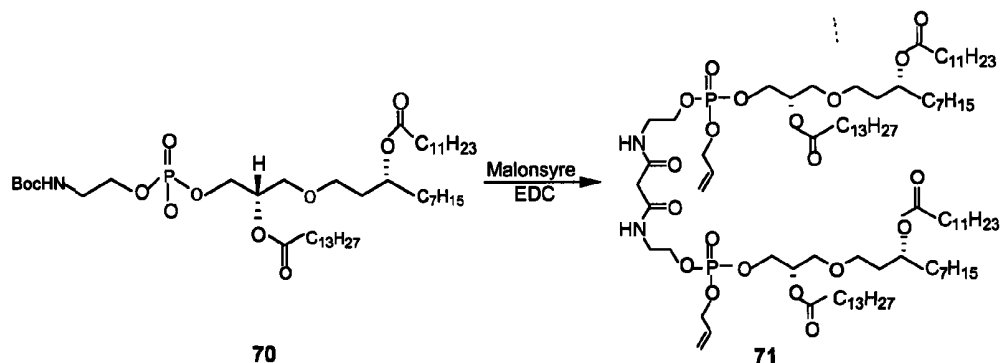
En oppløsning av den silylbeskyttede eter (68) (195 mg) i acetonitril (2,7 ml) ble tilsatt 48 % flusssyre (0,756 ml). Etter 30 timer ble mettet natriumbikarbonat tilsatt og blandingen opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 94,7 mg av fri alkohol (69).



15

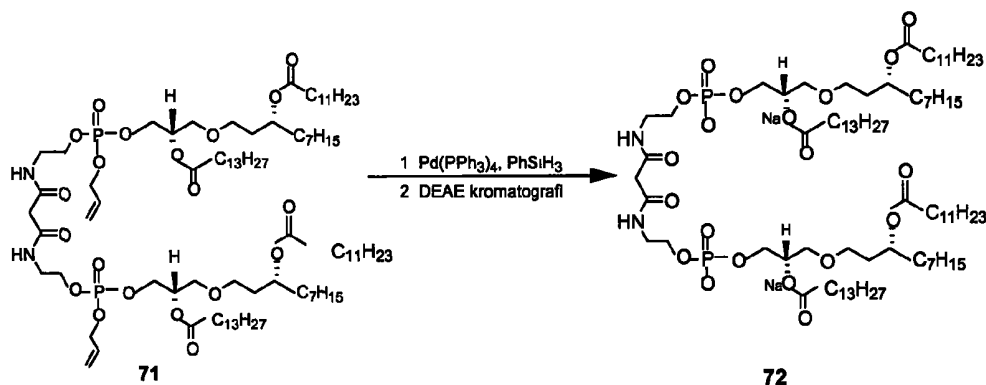
En oppløsning av den fri alkohol (69) (57 mg) i metylenklorid (0,5 ml) ble tilsatt tetrazol (15,6 mg) og fosforylerende reagens (11) (40 mg) ved romtemperatur. Etter 4 timer ble blandingen avkjølt til 0 °C etterfulgt av tilsetning av "Oxone" (82 mg) i THF (0,5 ml):vann (0,6 ml). Blandingen ble oppvarmet til romtemperatur og omrørt i 80 minutter. Den endelige reaksjonsblandingen ble opparbeidet på vanlig måte. Kromatografi ga 72 mg av beskyttet fosfat (70).

20



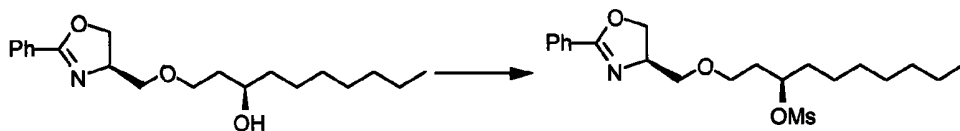
En oppløsning av det beskyttede fosfat (70) (72 mg) i metylenklorid (1 ml) ble tilsatt TES (120 μ l) og trifluoreddiksyre (0,6 ml), etterfulgt av omrøring i 1 time. TFA ble fjernet under redusert trykk etterfulgt av azeotrop destillasjon med 10 ml toluen. 20 ml metylenklorid ble tilsatt og blandingen ble opparbeidet på vanlig måte til å gi 0,52 g av en olje.

Det rå amin ble oppløst i metylenklorid (0,7 ml), etterfulgt av tilsetning av malonsyre (4,5 mg) og EDC (25,6 mg). Blandingen ble omrørt over natten og opparbeidet på vanlig måte til å gi 32,5 mg av det dimere produkt (71).

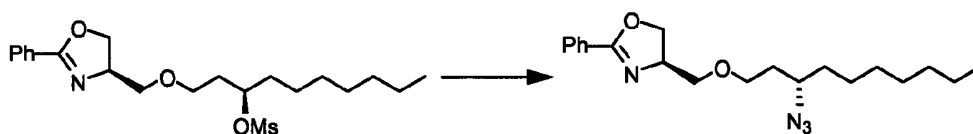


Den beskyttede dimeren (71) (32,5 mg) fra den foregående reaksjonen ble oppløst i avgasset kloroform (2 ml) og PhSiH₃ (8,6 μ l) ble tilsatt i et tørkeskap. Blandingen ble fjernet fra tørkeskapet og Pd(PPh₃)₄ (22,6 mg), på forhånd veiet i tørkeskapet, ble tilsatt. Etter 2 timer ble blandingen kromatografert på DEAE til å gi 27,9 mg hvitt, fast stoff (72) etter tilsetningen av 1 N natriumhydroksid (34,2 μ l) etterfulgt av frysetørking.

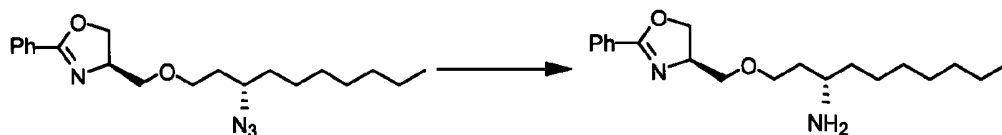
Fremstilling av ER-804253



- Alkoholen (558 mg) ble oppløst i metylenklorid (5 ml), avkjølt til 0 °C og trietylamin (0,466 ml) ble tilsatt under en nitrogenatmosfære. Etter omrøring i 5 minutter ble metansulfonylchlorid (0,142 ml) tilsatt dråpevis. Blandingen ble omrørt i ytterligere 5 minutter ved 0 °C og deretter oppvarmet til romtemperatur. Etter omrøring i ytterligere 1 time ble blandingen opparbeidet med mettet natriumbikarbonat, ekstrahert med etylacetat og ekstrakten vasket med vann, fortynnet vandig saltsyre, vann, saltløsning, tørket og løsningsmiddelet fjernet til å gi 630 mg.

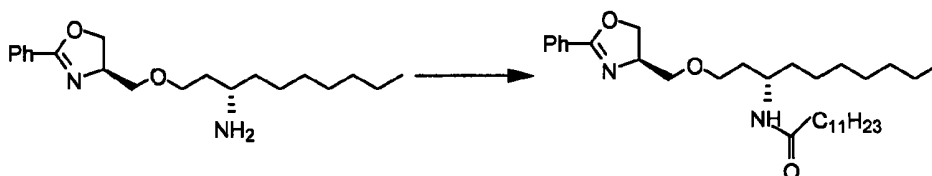


- Mesylatet (630 mg) og natriumazid (299 mg) ble oppløst i DMSO (6 ml) og oppvarmet til 60 °C i 90 minutter. Etter avkjøling til romtemperatur ble reaksjonsblandingen fortynnet med metylenklorid, vasket med vann og saltløsning. Etter ekstraksjon av de vandige vaskeløsninger ble den kombinerte, organiske fase tørket, konsentrert, renses over silikagel ved bruk av et 4:1 forhold mellom heksan og etylacetat og de tørkede produktfraksjoner ga 420 mg.



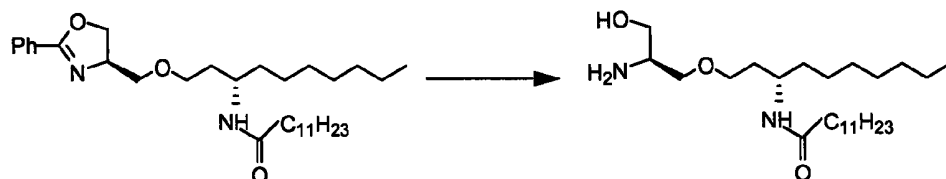
20

Azidet (295 mg) ble oppløst i etanol (5 ml) og Lindlar-katalyst (200 mg) ble tilsatt. Etter omrøring under en atmosfære av hydrogen gass ved atmosfærisk trykk ble den filtrerte oppløsning tørket til å gi 274 mg.



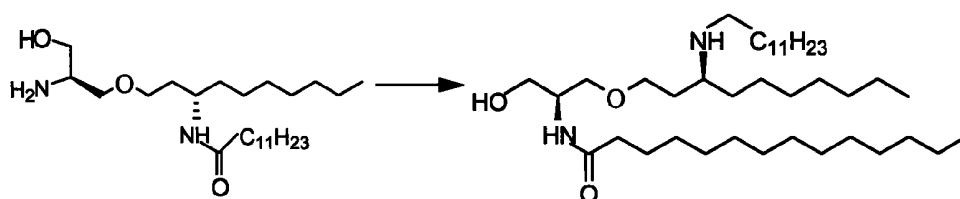
Aminet (930 mg) ble oppløst i THF (10 ml) og mettet natriumbikarbonat (22 ml). Etter omrøring i 5 minutter ble lauroylklorid (0,712 ml) tilsatt dråpevis i løpet av 20 minutter. Den endelige blanding ble ekstrahert med kloroform, tørket til å gi 1,45 g.

5



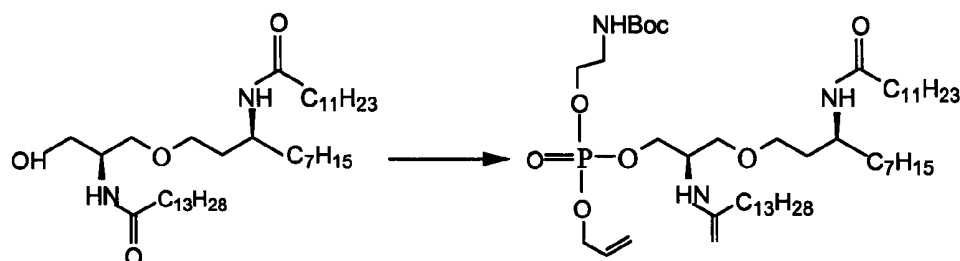
Amidet (1,11 g) ble oppløst i metanol (14 ml) og tilsatt 4 N saltsyre (8 ml). Blandingen ble omrørt i 1 time ved 50 °C og deretter konsentrert. Metanol (16 ml) og 40 % natriumhydroksid (8 ml) ble tilsatt og blandingen ble tilbaketrukket i 1 time. Den ble avkjølt, ekstrahert med metylenklorid og ekstraktet vasket med vann, tørket og løsningsmiddelet fjernet til å gi 930 mg.

10



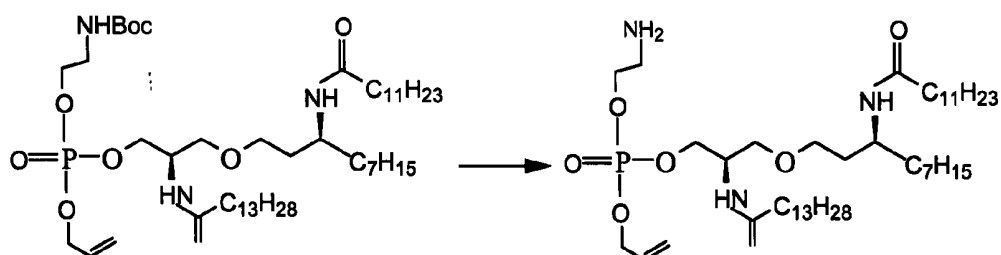
Aminoalkoholen ble oppløst i THF (6 ml) og mettet natriumbikarbonat tilsatt (13 ml). Etter 5 minutter ble blandingen avkjølt til 0 °C og myristoylklorid (300 µl) tilsatt. Etter 30 minutter ble blandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 430 mg.

15



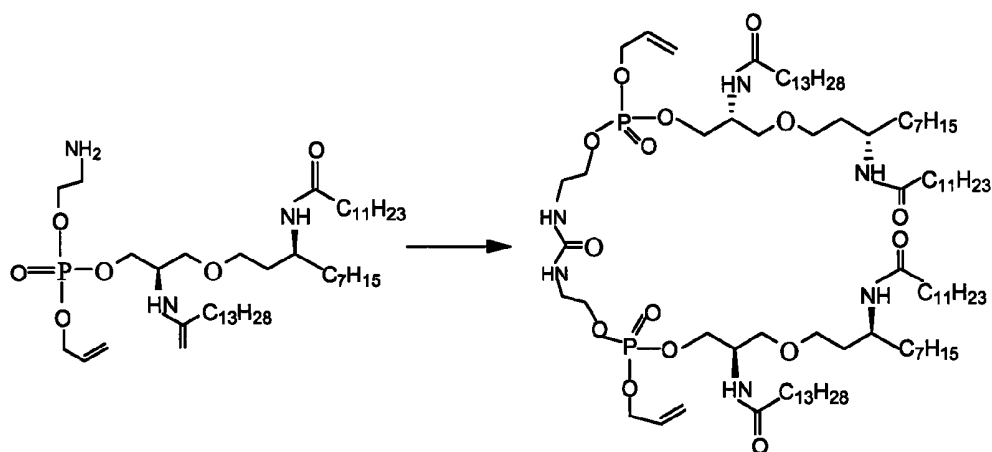
Alkoholen (101,7 mg) ble oppløst i iskaldt metylenklorid og fosforylerende reagens 11 (90 µl) ble tilsatt, og blandingen omrørt i 30 minutter. Iskaldt "Oxone" (166,3 mg) ble tilsatt og blandingen omrørt i 30 minutter. Reaksjonen ble brakt til opphør med tiosulfat. Blandingen ble opparbeidet på vanlig måte og kromatografert til å gi 174 mg (ikke rensset).

20



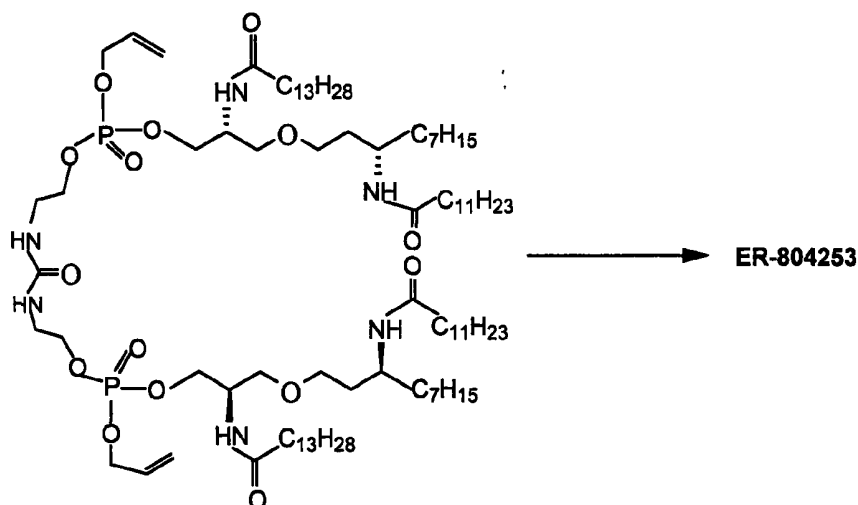
Det beskyttede amin fra den ovennevnte reaksjon ble oppløst i iskaldt metylenklorid (1 ml), trifluoreddiksyre (1 ml) ble tilsatt, og blandingen omrørt i 1 time. TFA ble fjernet og blandingen renset til å gi 106,7 mg.

5



Aminet ble oppløst i metylenklorid (3 ml) og mettet natriumbikarbonat oppløsning (3 ml) ble tilsatt. Blandingen ble avkjølt i is, og fosgen i toluen (0,55 ekv.) ble tilsatt dråpevis. Blandingen ble omrørt i 20 minutter og opparbeidet til å gi 112,3 mg.

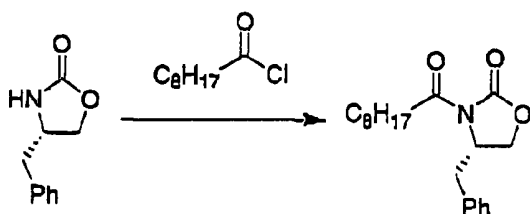
10



En blanding av det blokkerte fosfat (40,5 mg) i iskaldt kloroform (2,6 ml) ble tilsatt fenylsilan (10,7 mg) og tetrakistriphenylfosfinpalladium [0] (28,7 mg) og blandingen ble omrørt i 1 time. Blandingen ble kromatografert på en DEAE kolonne til å gi 27,7 mg av ER-804253.

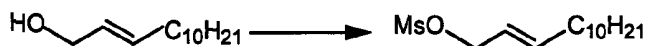
5

Fremstilling av ER-804130



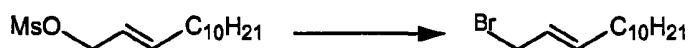
En oppløsning av amidet (3 g) i THF (65 ml) ved -78 °C ble tilsatt en ekvivalent butyllitium, etterfulgt av en oppløsning av nonanoylchlorid i THF (6 ml). Vandig ammoniumklorid ble tilsatt og blandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 5,35 g.

10



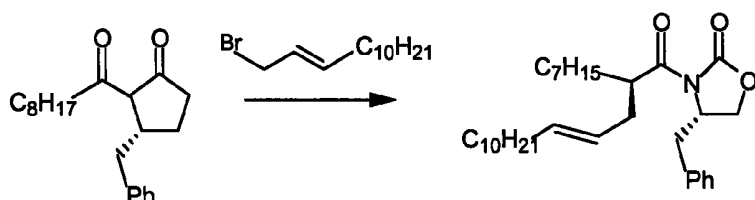
En oppløsning av alkoholen (5 g) i iskaldt metylenklorid (100 ml) ble tilsatt trietylamin (4,1 ml) og mesylklorid (2,1 ml). Blandingen ble omrørt i 4 timer og opparbeidet på vanlig måte til å gi 6,99 g.

15



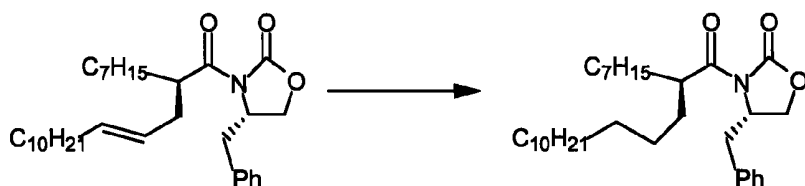
En oppløsning av mesylatet (6,99 g) i iskald DMF (100 ml) ble tilsatt kaliumbromid.

Blandingen ble oppvarmet til romtemperatur og omrørt i 5 timer. Blandingen ble opparbeidet på vanlig måte til å gi 4,63 g av en klar olje.



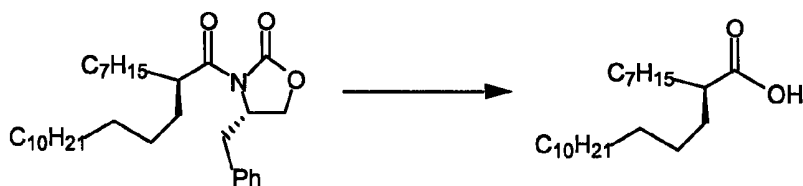
5

En oppløsning av amidet (2,8 g) i THF (15 ml) ble tilsatt til en -78°C oppløsning av natrium bis-trimetylsilylamid i THF (15 ml). Etter 1 time ble bromidet tilsatt og blandingen ble oppvarmet til romtemperatur, opparbeidet på vanlig måte til å gi 1,02 g.



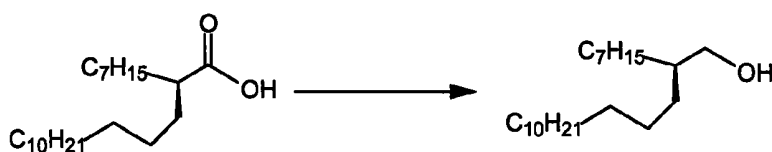
10

En oppløsning av olefinet (1,02 g) i EtOAc ble tilsatt palladium på karbon (126 mg) og blandingen ble anbrakt under hydrogen. Etter 4 timer ble blandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 1,0 g.



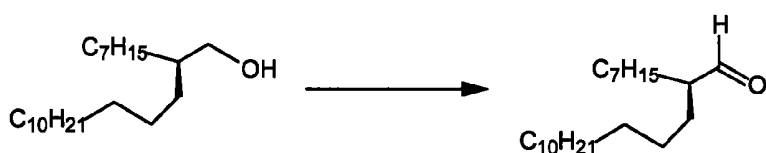
15

En oppløsning av aminet (1,0 g) i iskald THF (20 ml) ble tilsatt vann, hydrogenperoksyd og litiumhydroksid. Den neste dag ble blandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 590 mg av syren.

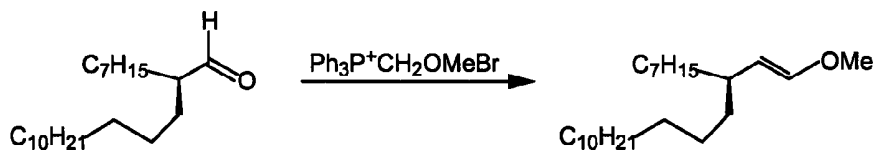


20

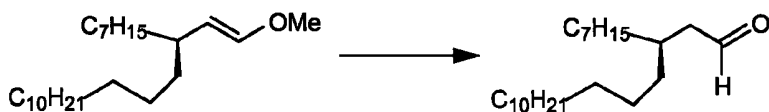
En oppløsning av syren i iskald THF (10 ml) ble tilsatt diboran:THF kompleks og blandingen ble sakte oppvarmet. Etter 7 timer ble fortynnet saltsyre forsiktig tilsatt og blandingen opparbeidet på vanlig måte. Råmaterialet ble oppløst i iskald eter og LAH-oppløsning (2 ml av 1M) ble tilsatt. Etter 5 minutter ble blandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 556 mg av alkoholen.



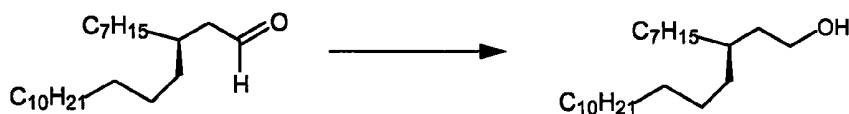
En -78°C oppløsning av oksalyklorid (2,2 ml) i metylenklorid (10 ml), ble tilsatt DMSO (1,1 ml) og etter 2 minutter ble alkoholen (556 mg) tilsatt i metylenklorid (5 ml). Etter 20 minutter ble trietylamin (1 ml) tilsatt og blandingen ble oppvarmet til 0°C . Blandingen ble fortynnet med eter og opparbeidet på vanlig måte til å gi 567 mg.



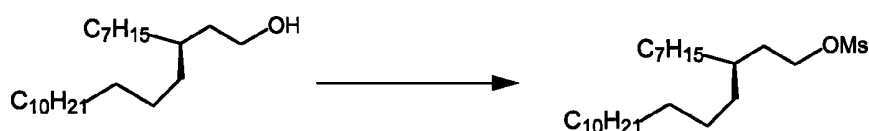
Wittig-reagenset (679 mg) ble suspendert i THF (10 ml) og KHMDS-oppløsning (4 ml av 0,5M) ble tilsatt. Etter 20 minutter ble blandingen avkjølt til -78°C og aldehydet (567 mg) i THF (5 ml) ble tilsatt. Etter 15 minutter ble blandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 342 mg.



En oppløsning av enoleteren (342 mg) i acetonitril (3,5 ml) og vann (0,15 ml) ble tilsatt jodhydrogensyre. Etter 4 timer ble blandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 325 mg.

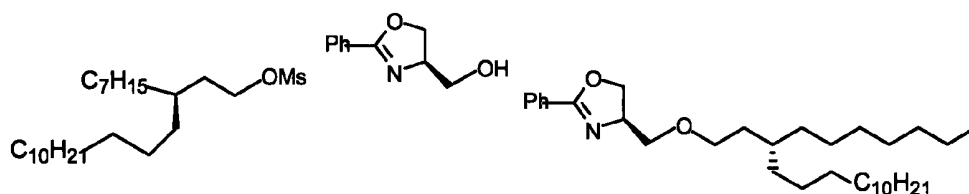


En oppløsning av aldehydet (325 mg) i metanol (10 ml) ble tilsatt natriumborhydrid (38 mg). Etter 3 timer ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 303 mg av alkoholen.



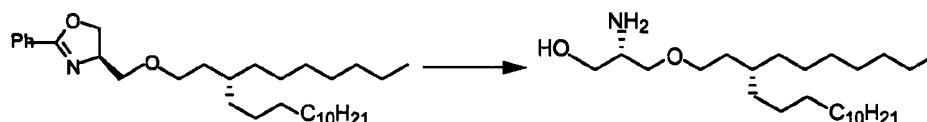
5

En iskald oppløsning av alkoholen (303 mg) i metylenklorid (10 ml) ble tilsatt trietylamin (150 μ l) og mesylklorid (76 μ l). Etter 4 timer ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 352 mg.



10

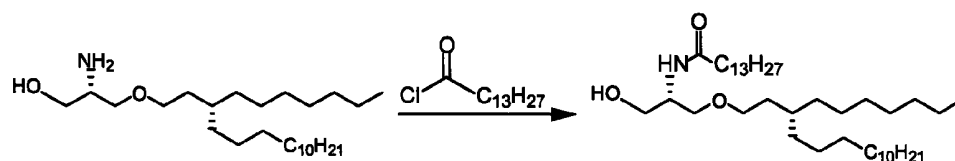
En oppløsning av oksazolin (1 ml) i iskald THF (5 ml) ble tilsatt kalium t-butoksidoppløsning (2,2 ml av 1M). Etter 30 minutter ble mesylatet tilsatt i THF (5 ml) og blandingen ble omrørt i 8 timer. Den vanlige opparbeidelse ga 318,5 mg.



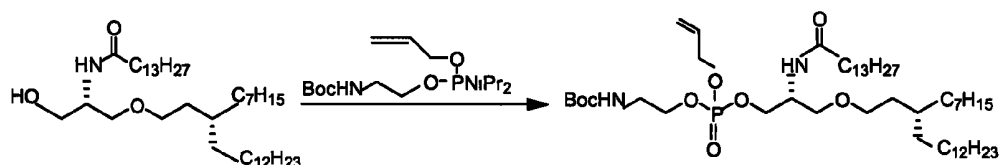
15

En oppløsning av oksazolinet i metanol (8 ml) og saltsyre (4 ml av 4M) ble oppvarmet til 50 °C i 90 minutter. Ytterligere metanol ble tilsatt og løsningsmiddelet fjernet. Resten ble oppløst i metanol (8 ml) og natriumhydroksidoppløsning (4 ml) og hurtig oppvarmet til 50 °C. Blandingen ble avkjølt og ekstrahert med kloroform. Den vanlige opparbeidelse ga 114 mg.

20



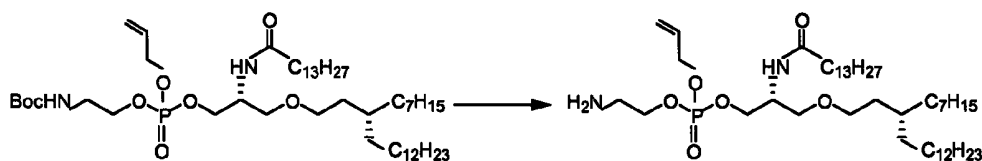
En oppløsning av aminet (114 mg) i THF (2 ml) og mettet vandig natriumbikarbonat (2 ml) ble tilsatt syrekloridet. Etter 30 minutter ble ytterligere syreklorid tilsatt. Etter 30 minutter ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 146 mg.



5

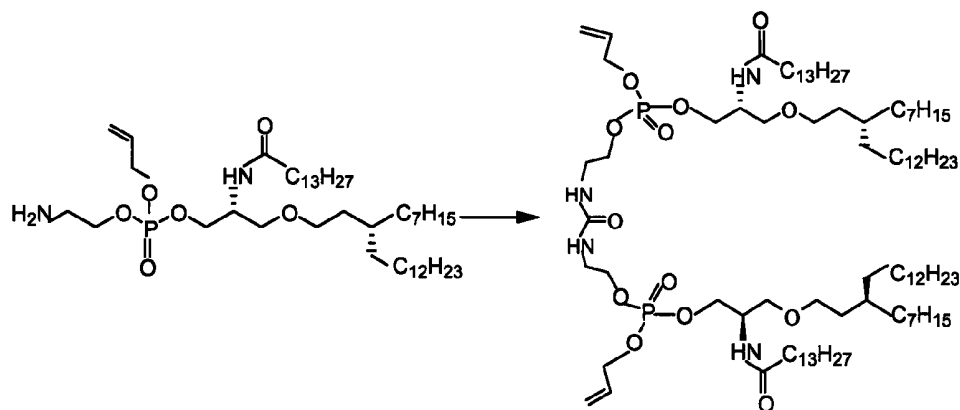
En oppløsning av tetrazol (48 mg), det fosforylerende reagens (122 mg) i iskaldt metylenklorid (2 ml), ble tilsatt alkoholen (146 mg). "Oxone" (230 mg) i vann (1 ml) og THF (2 ml) ble tilsatt. Etter 90 minutter ble tiosulfat anvendt for å avbryte reaksjonen. Standard opparbeidelse ga 140 mg.

10

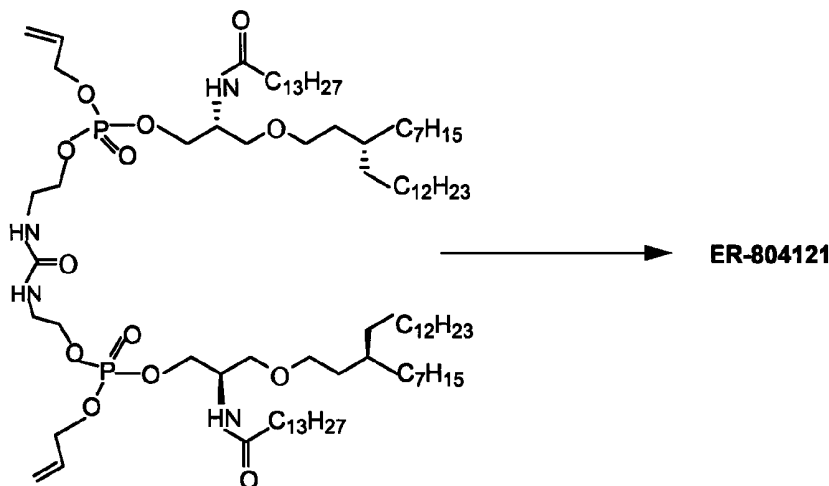


En oppløsning av substratet i iskaldt metylenklorid ble tilsatt trietylsilan (370 μ l) og trifluoreddiksyre (110 μ l). Etter 5 minutter ble de flyktige bestanddeler fjernet til å gi 148 mg.

15

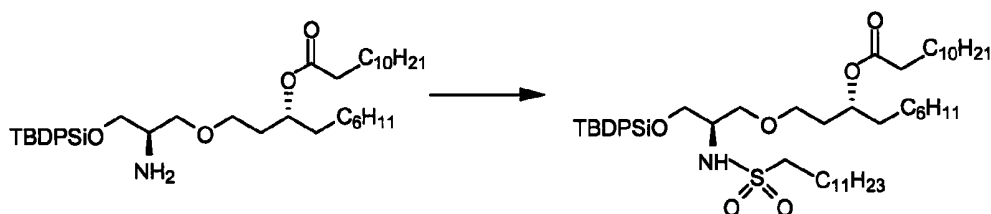


En oppløsning av aminet (66,9 mg) i iskaldt metylenklorid (0,8 ml) ble tilsatt mettet vandig natriumbikarbonat (0,8 ml) og fosgenoppløsning (20 μ l av 1,93M). Etter 1 time ble ytterligere fosgen (10 μ l) tilsatt. Etter 30 minutter ga den vanlige opparbeidelse 47,7 mg.

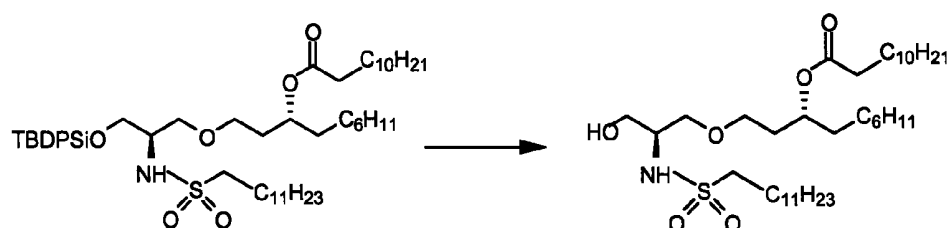


- Til en oppløsning av fenylsilan (15 μ l), tetrakistriphenylfosfinpalladium [0] (24,8 mg) i iskald kloroform ble substratet tilsatt under en inert atmosfære. Etter 5 minutter ble blandingen
- 5 påført en DEAE-kolonne og kromatografert til å gi 31 mg av ER-804130.

Fremstilling av ER-804558



- 10 En oppløsning av aminet (325 mg) i metylenklorid ble tilsatt trietylamin (321 μ l) og 1-dodecansulfonylchlorid. Etter 3 timer ga vanlig opparbeidelse 384 mg.



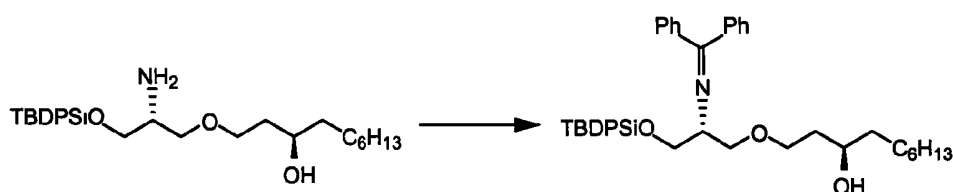
- En oppløsning av den beskyttede alkohol (384 mg) i THF (4 ml) ble tilsatt
- 15 tetrabutylammoniumfluorid (123 mg) og eddiksyre (29 μ l). Etter 2 timer ga den vanlige opparbeidelse 180 mg.

Resten av syntesen ble fullført som skissert i det foregående for andre forbindelser ifølge den foreliggende oppfinnelsen, dvs. fosforylering, avblokkering, kobling med fosgen og avbeskyttelse med fenylsilan og palladium.

5

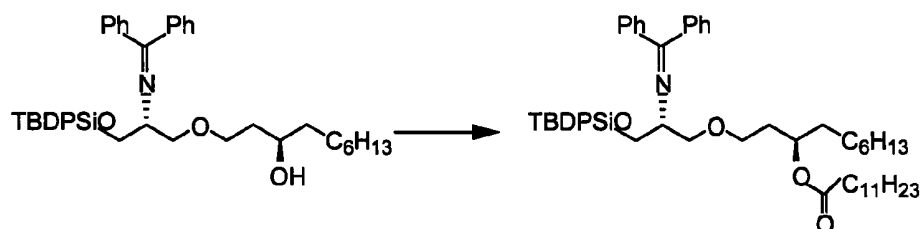
Fremstilling av ER-804442

Diolaminet ble mono-beskyttet som dets t-butyl-difenylsilyleter skissert i det foregående.

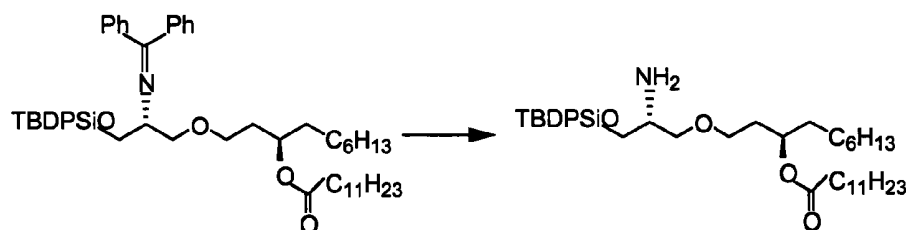


10

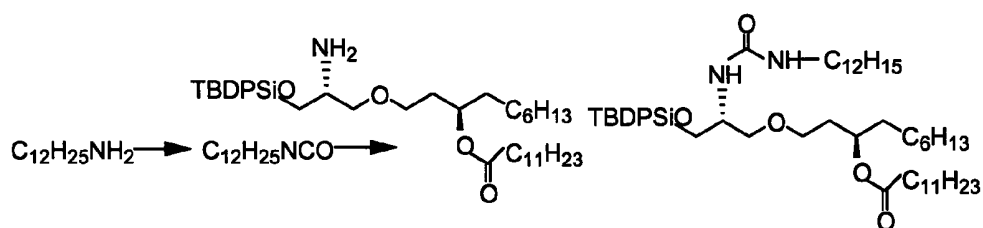
Aminet (2,6 g) og benzofenonimin (1,1 ml) ble blandet og oppvarmet til 40 °C i 4 dager til etter kromatografi å gi 3,3 g.



- 15 En oppløsning av iminet (3,3 g) ble i iskald metylenklorid tilsatt laurinsyre (1,5 g), EDC (1,7 g) og DMAP (155 mg). Neste dag ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 3,15 g.



- 20 En oppløsning av iminet (3,14 g) i eter, ble tilsatt 1 N vandig saltsyre tilsatt. Neste dag ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 2,81 g.



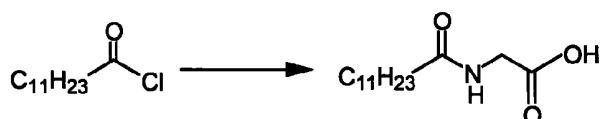
En oppløsning av triklormetylchlorformiat (12 μ l) i iskaldt metylenklorid (250 μ l) ble tilsatt dodecylamin (18 μ l) og diisopropyletylamin (27 μ l). Etter 30 minutter ble løsningsmiddelet fjernet. Resten ble oppløst i iskaldt metylenklorid, hvortil aminet (55,6 mg) og ytterligere

5 diisopropyletylamin (13 μ l) ble tilsatt. Etter 2 timer ga den vanlige opparbeidelse etter kromatografi 60,9 mg.

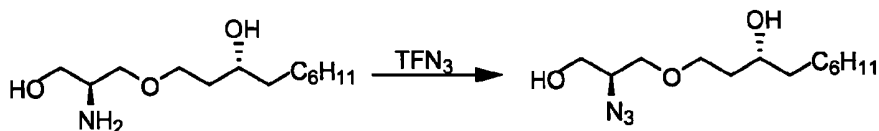
Dette produkt ble avbeskyttet med fluorid, fosforylert, avbeskyttet med TFA, dimerisert med fosgen og avblokkert med fenylsilan og palladium som skissert i det foregående til å gi ER-

10 804442.

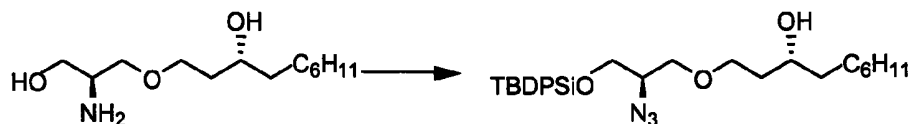
Fremstilling av ER-804221



- 15 En iskald oppløsning av glysin (8,26 g) i vandig natriumhydroksid (4,4 g i 60 ml) ble tilsatt lauroylklorid (21,8 g). Etter 1 time ble syre tilsatt og blandingen opparbeidet på vanlig måte. Omkrystallisering fra etylacetat ga 9,7 g.



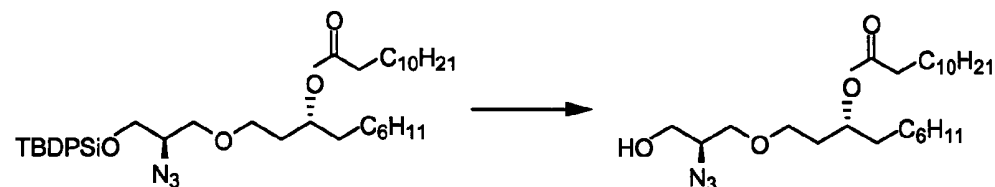
En iskald oppløsning av aminet (1,4 g) i metanol ble tilsatt TFN_3 (triflinazid) (20 mg). Neste dag ble ytterligere azid tilsatt. Etter 2 timer ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 1,14 g etter kromatografi.



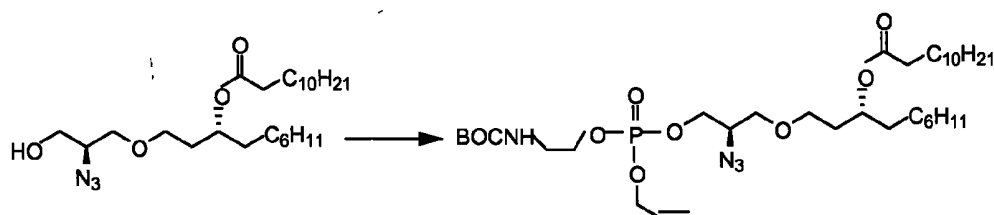
En oppløsning av alkoholen (1,14 g) i metylenklorid ble tilsatt t-butyldifenylsilylchlorid (1,09 ml), trietylamin (1,8 ml) og DMAP (50 mg). Etter 3 timer ga den vanlige opparbeidelse 1,4 g.



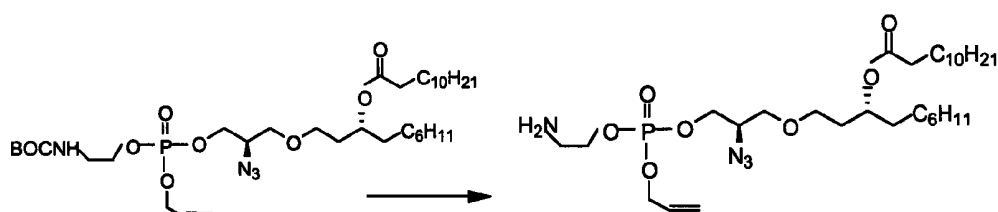
En oppløsning av alkoholen (1,4 g) i iskald metylenklorid ble tilsatt laurinsyre (826 mg), EDC (1,05 g) og DMAP (33 mg). Neste dag ga den vanlige opparbeidelse etter kromatografi 778 mg.



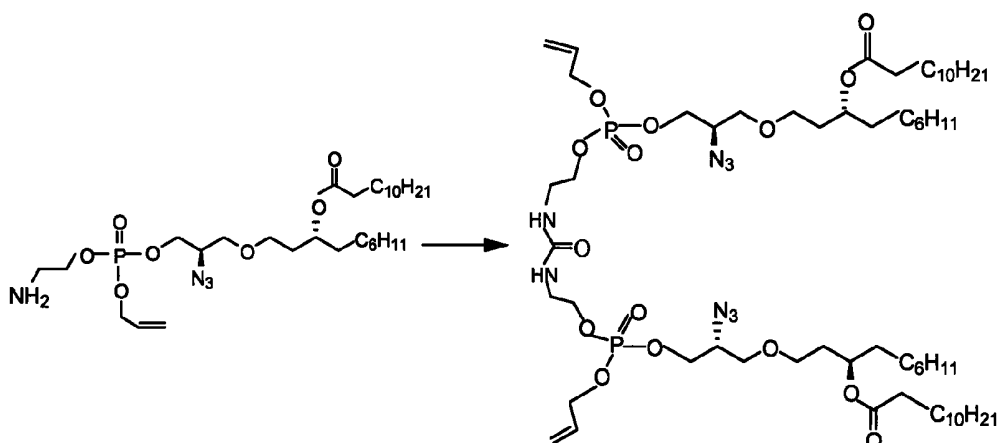
En oppløsning av azidet (778 mg) i THF ble tilsatt eddiksyre (77 μl) og TBAF (323 mg). Neste dag ga den vanlige opparbeidelse etter kromatografi 428 mg.



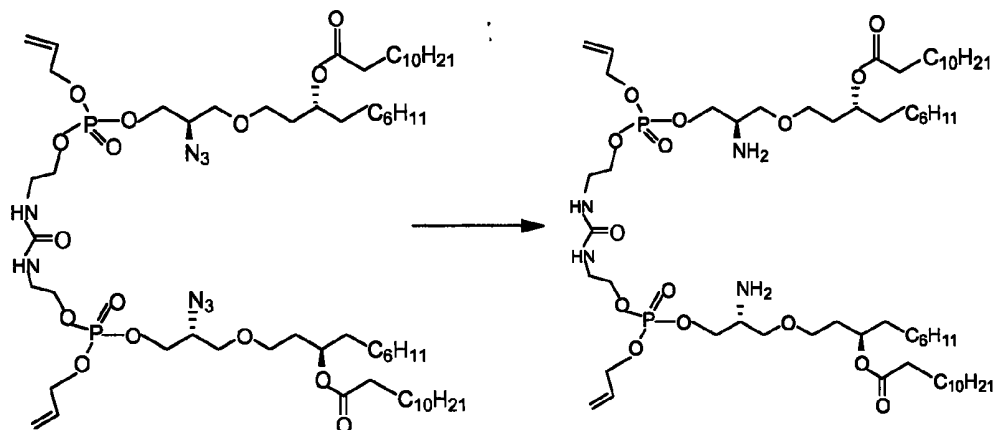
En oppløsning av azidet (460 mg) i metylenklorid ble tilsatt tetrazol (165 mg), det fosforylerende reagens (390 mg), og etter 30 minutter, "Oxone" i vann (722 mg i 3 ml). Reaksjonen ble brakt til opphør med tiosulfat. Vanlig opparbeidelse etter kromatografi ga 392 mg.



Det beskyttede aminet (460 mg) ble oppløst i metylenklorid og trifluoreddiksyre (394 µl) og trietylsilan (308 µl). Etter 1,5 time ga den vanlige opparbeidelse 392 mg.

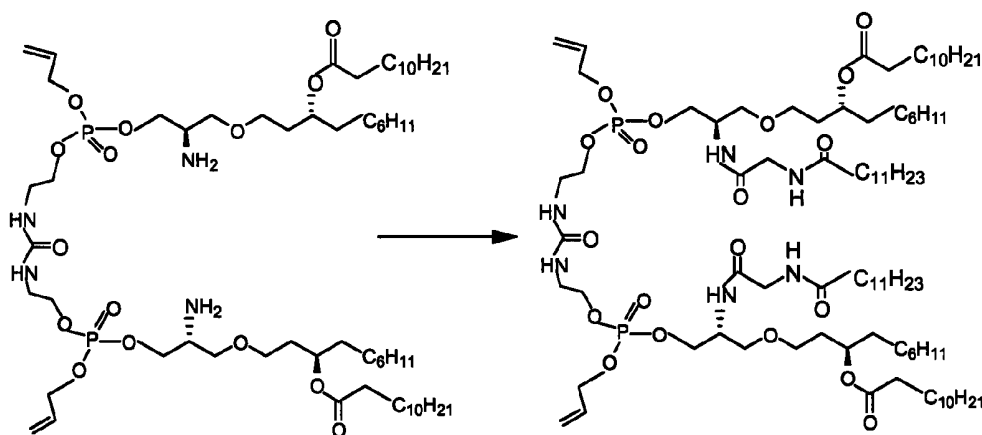


En iskald oppløsning av aminet i metylenklorid (5,5 ml) ble tilsatt mettet natriumbikarbonat (5,5 ml), og fosgen (164 µl av en 1,93M oppløsning i toluen). Etter 15 minutter ga den vanlige opparbeidelse etter kromatografi 342 mg.



En iskald oppløsning av azidet (187 mg) i metylenklorid ble tilsatt tinnreagenset (1,5 ml) som var fremstilt som skissert i U.S. patent skrift 5 756 718. Etter 30 minutter ble blandingen

5 kromatografert til å gi 187 mg.



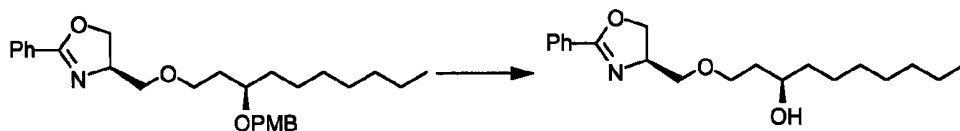
En iskald oppløsning av ureaforbindelsen (55 mg) i metylenklorid ble tilsatt syren (59 mg) (fremstilt som i det foregående) og EDC (44 mg). Neste dag ble ytterligere EDC (5 mg) og

10 syre (5 mg) tilsatt. Etter 2 timer ga den vanlige opparbeidelse 45,7 mg.

Normal fjerning av beskyttelsesgruppene med fenylsilan og palladium ga ER-804221.

ER-804222 ble fremstilt på liknende måte, bortsett fra at kondensasjonsproduktet mellom

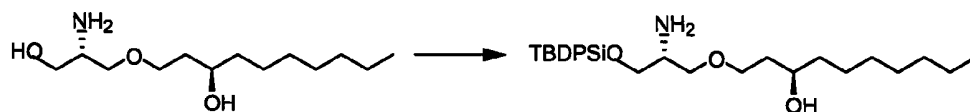
15 laurylklorid og glysin, 15-metylmystinsyre ble anvendt.

Fremstilling av ER-804281

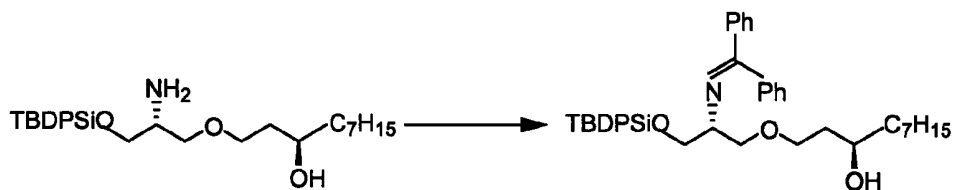
En iskald oppløsning av den beskyttede alkohol (8,3 g) i acetonitril:vann ble tilsatt CAN (41,4 g). Etter 1 time ga den vanlige opparbeidelse 5,7 g.



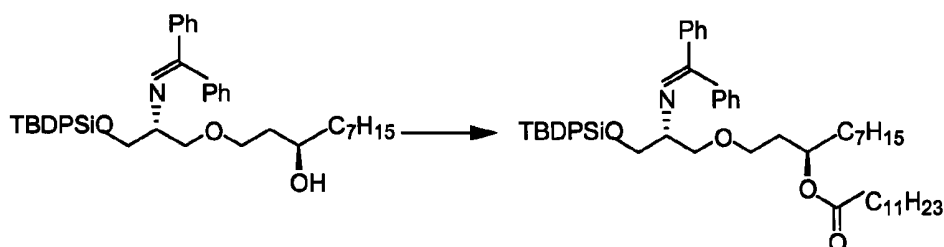
En oppløsning av alkoholen (5,63 g) i 4 N HCl-oppløsning ble oppvarmet til tilbakesløp i 1 time, avkjølt, nøytralisert med natriumhydroksid og opparbeidet på vanlig måte til å gi 2,1 g.



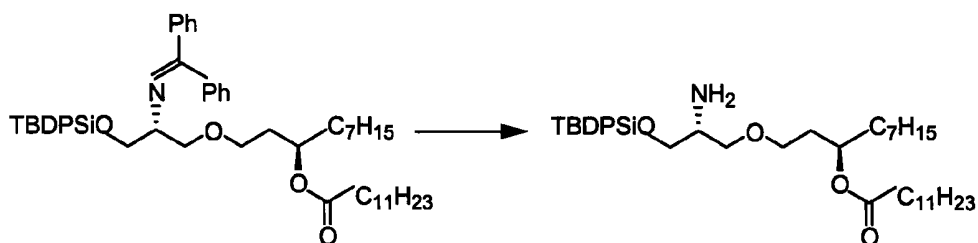
En iskald oppløsning av alkoholen (2,2 g) i metylenklorid ble tilsatt imidazol (0,7 g), t-butyl-difenylylsilyl-klorid i 15 ml av metylenklorid. Neste dag ga vanlig opparbeidelse 1,54 g.



En oppløsning av alkoholen (1,93 g) i metylenklorid (40 ml) ble tilsatt benzofenonimin (0,8 ml). Etter 1 dag ble blandingen oppvarmet til tilbakesløp over natten. Den vanlige opparbeidelse ga 1,67 g.

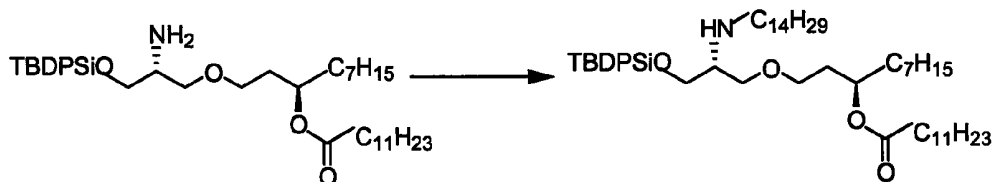


En iskald oppløsning av alkoholen (1,67 g) i metylenklorid ble tilsatt DMAP (159 mg), EDC (0,99 g) og laurinsyre (1,04 g). Etter 1 dag ga vanlig opparbeidelse 74 % utbytte.

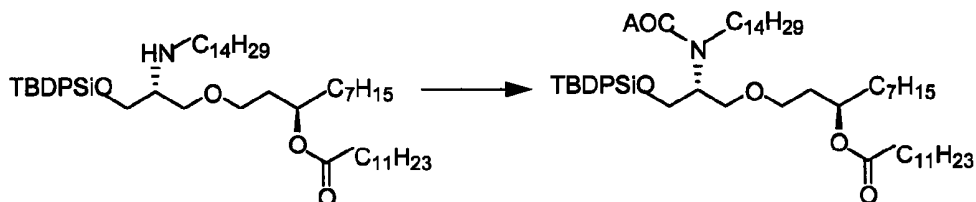


5

En iskald oppløsning av iminet (2,9 g) i eter (50 ml) ble tilsatt 1 N HCl (50 ml). Neste dag ga vanlig opparbeidelse 2,09 g.

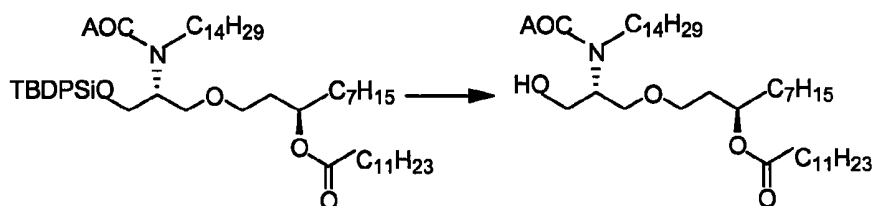


- 10 En oppløsning av aminet (1,24 g) i dikloretan ble tilsatt natriumcyanborhydrid (178 mg) og tetradecanal (411 mg). Neste dag ga vanlig opparbeidelse 1,5 g.



En iskald oppløsning av aminet (221 mg) i dioksan ble tilsatt allylchlorformiat (40 mg) og 308

- 15 μ l av 1 N NaOH-oppløsning. Etter 2 timer ga vanlig opparbeidelse 200 mg.



En iskald oppløsning av den beskyttede alkohol (365 mg) i THF ble tilsatt TBAF (1924 μ l) og eddiksyre (122 μ l). Neste dag ga vanlig opparbeidelse 271 mg.

- 5 Dette materialet ble fosforylert, deblokkert med TFA, dimerisert med fosgen og de allylbeskyttende grupper fjernet med fenylsilan og palladium som beskrevet i det foregående til å gi ER-804281.

Fremstilling av ER-804339

10



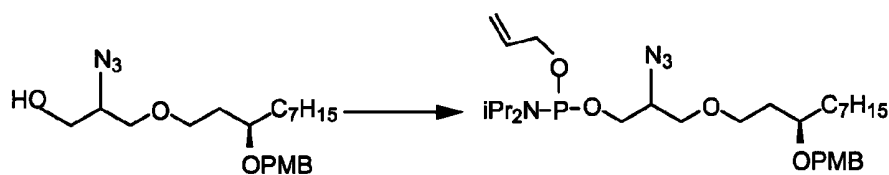
En iskald oppløsning av ER-804281 (7 mg) i metylenklorid ble tilsatt trietylamin (5 μ l), DMAP (0,6 mg) og acetylklorid (1,8 μ l). Etter 4 dager ga vanlig opparbeidelse 1,1 mg.

15 Fremstilling av ER-804674

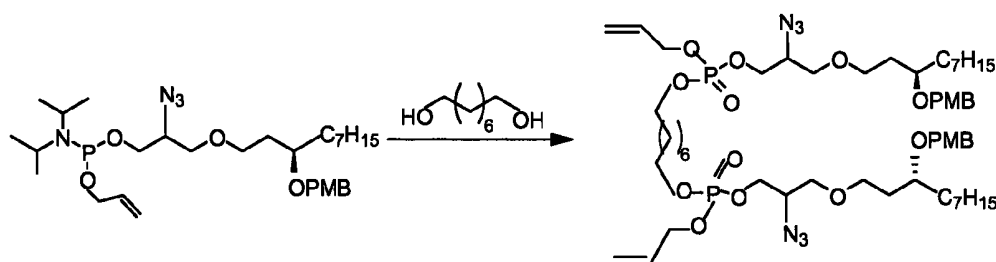


- 20 En oppløsning av ER-804281 (12,7 mg) i THF (1,0 ml) ble tilsatt metyljodid (9,2 mg) og natriumbikarbonat (6,8 mg). Blandingen ble omrørt i 5 dager og natriumbikarbonat (14 mg) og ytterligere metyljodid (8 ml) ble tilsatt. Etter enda 3 dager ble ytterligere bikarbonat (28 mg) og MeI (16 μ l) tilsatt. Etter enda 6 dager ble blandingen opparbeidet til å gi 9,1 mg av produktet.

25 Fremstilling av ER-804596

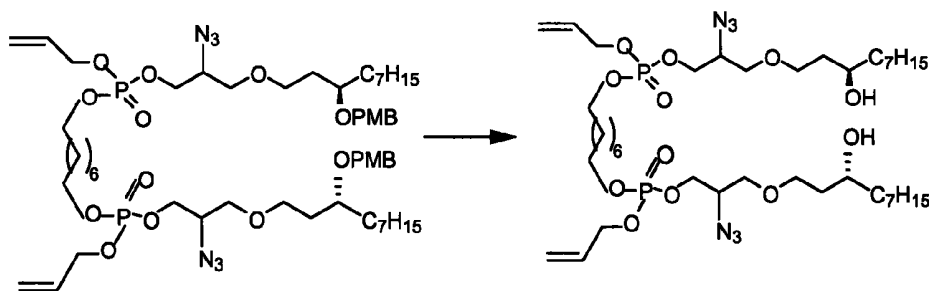


En oppløsning av alkoholen (393 mg) i metylenklorid (2 ml) ble tilsatt diisopropylamin (210 μ l), tetrazol (105 mg) og fosforylerende middel (som beskrevet ovenfor) (488 mg). Etter 2 1/5 timer ga vanlig opparbeidelse det ønskede produkt.



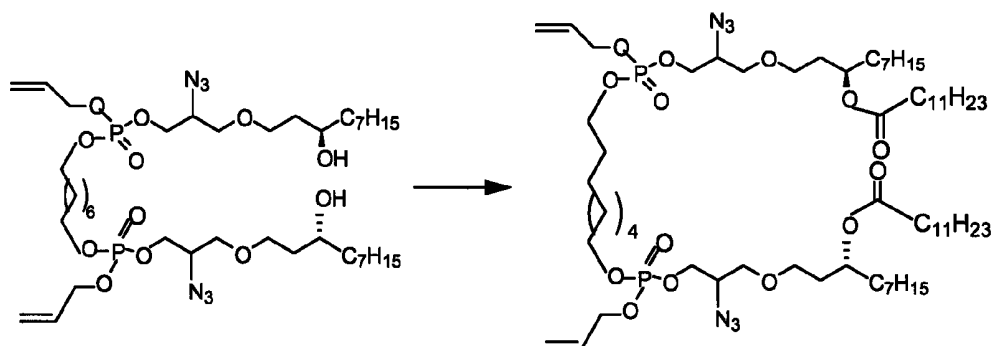
5

En oppløsning av diolen (73 mg) i avetonitril ble tilsatt tetrazol (175 mg), azidet (1 ekvivalent). Etter 3 timer ble blandingen avkjølt og ozon (1229 mg) tilsatt. Neste dag ga vanlig opparbeidelse det ønskede produkt.



10

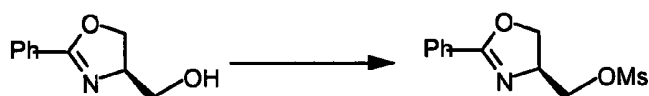
En iskald oppløsning av den beskyttede alkohol (92,9 mg) i acetonitril:vann (6 ml:1,5 ml) ble tilsatt CAN (358 mg). Etter 1 time ga vanlig opparbeidelse 68,5 mg.



15 En iskald oppløsning av diolen (68,5 mg) i metylenklorid ble tilsatt laurinsyre (76,5 mg), DMAP (4,7 mg) og EDC (73 mg). Neste dag ga vanlig opparbeidelse 76,5 mg.

Azidene ble redusert ved bruk av tinnreagenset beskrevet ovenfor. Diaminet ble acylert med dodekanoylchlorid, og de beskyttende grupper fjernet med fenylsilan og palladium som beskrevet ovenfor til å gi ER-804596.

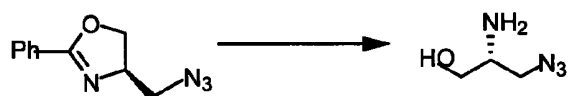
5 Fremstilling av ER-804732



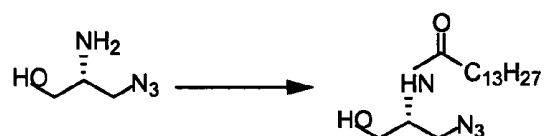
- Alkoholen (7,04 g) ble oppløst i metylenklorid (300 ml) med trietylamin (11,13 ml) og deretter avkjølt til 0 °C under en nitrogenatmosfære. Metansulfonylchlorid (3,69 ml) ble tilsatt
 10 dråpevis og reaksjonsblandingen ble deretter omrørt ved romtemperatur i 1 time. Vanlig opparbeidelse ga 5,551 g.



- Den mesylerte forbindelse (1,114 g) ble oppløst i DMF (30 ml) etterfulgt av natriumazid
 15 (0,9337 g). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 57 °C og omrørt i 16 timer og deretter til 104 °C og ytterligere 3 timer. Etter avkjøling til romtemperatur ble blandingen opparbeidet på vanlig måte og ga 0,466 g.

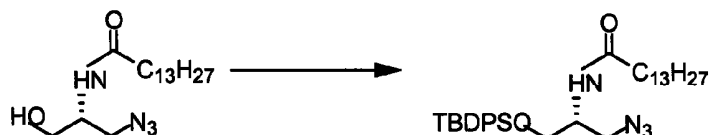


- 20 Den beskyttede aminoalkohol (0,466 g) ble hydrolysert ved bruk av 4 N HCl (15 ml) ved 107 °C i 3 timer. Etter avkjøling til romtemperatur ble reaksjonsblandingen filtrert og ekstrahert med etyleter, tørket, konsentrert og anvendt i den neste reaksjon.

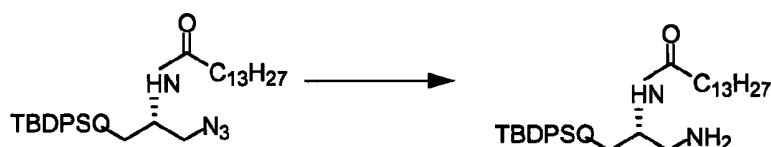


- 25 Den rå aminoalkoholen ble oppløst i THF (5 ml) med mettet natriumbikarbonat (6 ml) og avkjølt til 0 °C. Myristoylchlorid (0,79 ml) ble tilsatt dråpevis og blandingen ble deretter

oppvarmet til romtemperatur og omrørt i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble opparbeidet ved bruk av de vanlige metoder og ga 0,751 g.



- 5 Alkoholen (0,185 g) ble oppløst i DMF (3,0 ml) med imidazol (0,077 g) og tert-butyldifenylsilylchlorid (0,197 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer hvorefter den vanlige opparbeidelse ga 0,320 g.

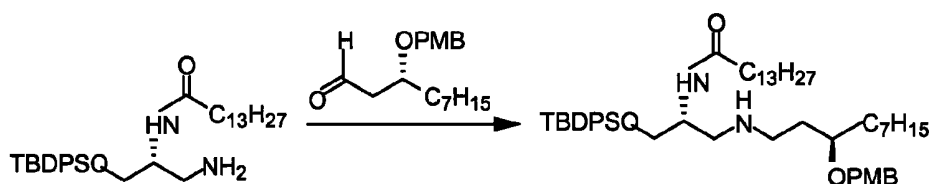


- 10 Azidet (0,975 g) ble oppløst i metanol (20 ml) med 10 % palladium på karbon (0,180 g). Blandingen ble omrørt under en atmosfære av hydrogen gass under atmosfærisk trykk i 2 timer hvorefter gassen ble evakuert og blandingen filtrert over "Celite" 545 og konsentrert. Rensing ved bruk av de vanlige metoder ga 0,873 g.

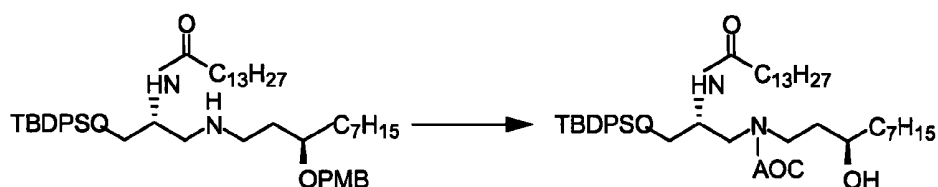


15

DMSO (1,5 ml) ble tilsatt dråpevis til oksalyklorid (0,92 ml) i metylenklorid (30 ml) ved -78 °C. Etter omrøring i 15 minutter ble alkoholen (1,727 g) i metylenklorid (30 ml) tilsatt dråpevis og blandingen ble omrørt i ytterligere 30 minutter. Trietylamin (4,90 ml) ble tilsatt dråpevis, reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 0 °C og reaksjonen avbrutt ved anvendelse av mettet ammoniumklorid. Rensing av det rå produkt ved bruk av silikagelkromatografi med 20 % etylacetat i heksaner ga 1,653 g.



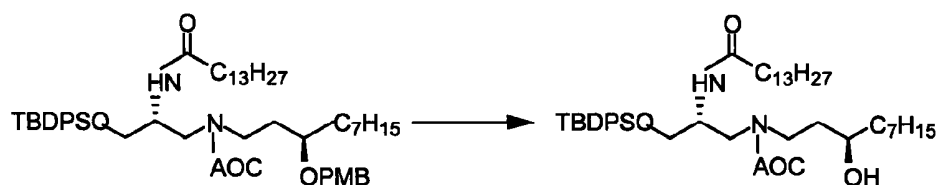
Det primære amin (0,135 g) og aldehyd (0,077 g) ble oppløst i 1,2-dikloretan (5 ml) og tilsatt natriumcyanborhydrid (0,032 g). Reaksjonsblandingen ble omrørt i 20 timer, tilsatt eddiksyre (0,02 ml) og opparbeidet på vanlig måte til å gi 0,103 g.



5

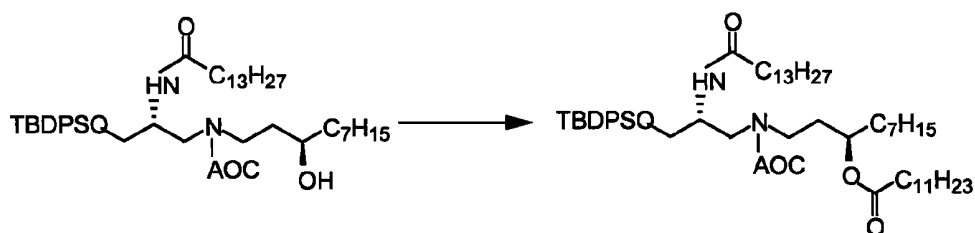
Det sekundære amin ble oppløst i 1,4-dioksan (15 ml), avkjølt til 0 °C og sakte tilsatt 1 M natriumhydroksid (3,0 ml). Etter omrøring i 10 minutter ble allylklorformiat (0,236 ml) tilsatt dråpevis, og reaksjonsblandingen ble oppvarmet til romtemperatur og omrørt i 16 timer. Vanlig opparbeidelse ga 0,613 g.

10

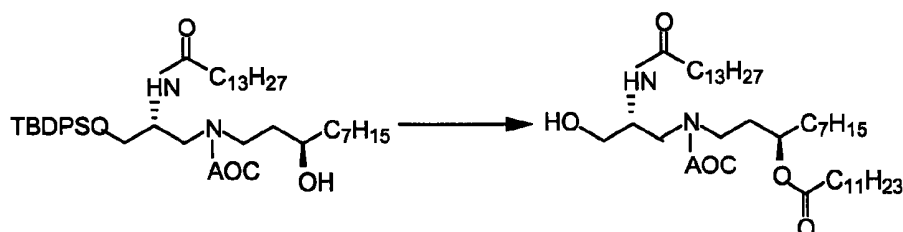


Parametoksybenzyleteren (0,613 g) ble oppløst i et forhold 4 til 1 mellom acetonitril og vann (15 ml), avkjølt til 0 °C og deretter ble CAN (1,525 g) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 0 °C i 2 timer, og deretter opparbeidet på vanlig måte til å gi 0,357 g.

15



Alkoholen (0,357 g) ble oppløst i metylenklorid (5 ml) med laurinsyre (0,184 g), EDC (0,175 g) og avkjølt til 0 °C. 4-dimetylaminopyridin (0,012 g) ble tilsatt og den resulterende blanding ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer. Opparbeidelse på vanlig måte ga 0,436 g.

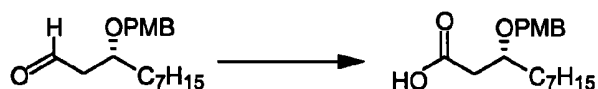


Den silylbeskyttede alkoholen (0,211 g) ble oppløst i THF (5 ml) med eddiksyre (0,03 ml). Tetrabutylammoniumfluorid (0,115 g) ble tilsatt i en porsjon og reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer. Vanlig opparbeidelse ga 0,150 g.

- 5 Dette materialet ble fosforylert, avblokkert med TFA, dimerisert med fosgen og de allylbeskyttende grupper fjernet med fenylsilan og palladium som beskrevet ovenfor til å gi ER-804732.

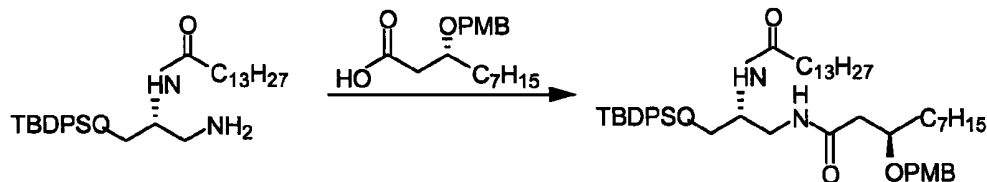
Fremstilling av ER-804680

10



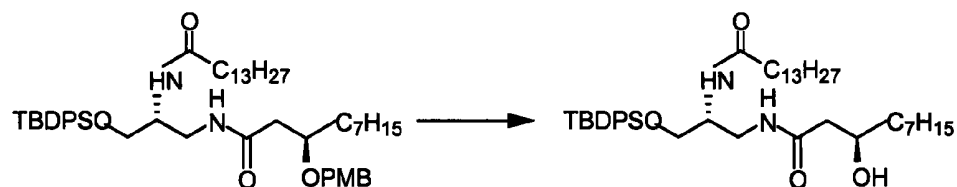
Aldehydet (1,54 g) ble oppløst i THF (28 ml), avkjølt til 0 °C og tilsatt 2-metyl-2-buten (14 ml) og tertbutylalkohol (28 ml). En omrørt suspensjon av natriumkloritt (3,70 g) og natriumtrihydrogenfosfat (4,09 g) i vann (42,7 ml) ble tilsatt den ovennevnte blanding og omrørt ved 0 °C i 1,5 time. Den ferdige reaksjonen ble fortynnet med etylacetat (100 ml) og

- 15 vasket med 10 % natriumbisulfit, saltoppløsning, konsentrert og silikagelkromatografert til å
gi 1,55 g.



Aminet (0,553 g) og syre (0,381 g) ble blandet i metylenklorid (8 ml) og avkjølt til 0 °C,

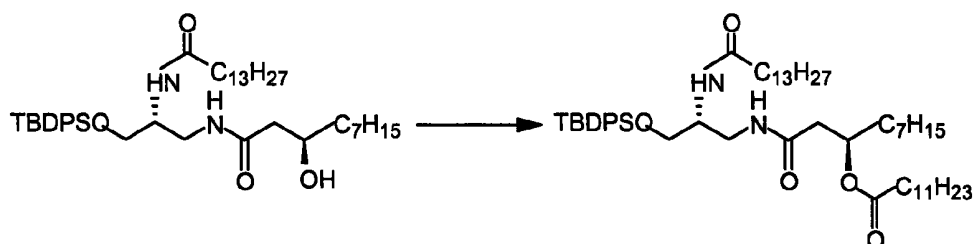
- 20 deretter ble EDC (0,230 g) tilsatt og reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 72 timer. Vanlig opparbeidelse ga 0,567 g.



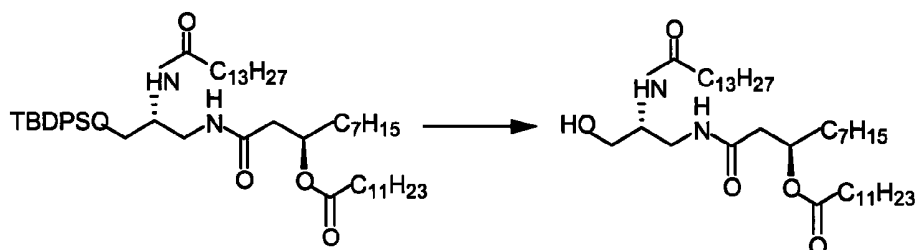
Metoksybenzyleteren (0,567 g) ble oppløst i et forhold 1 til 1 mellomacetonitril og vann (16

- 25 ml) med metylenklorid (8 ml) og avkjølt til 0 °C. CAN (1,53 g) ble tilsatt og

reaksjonsblandingen ble omrørt i 1 time hvorefter den ble opparbeidet på vanlig måte til å gi den rå alkohol.



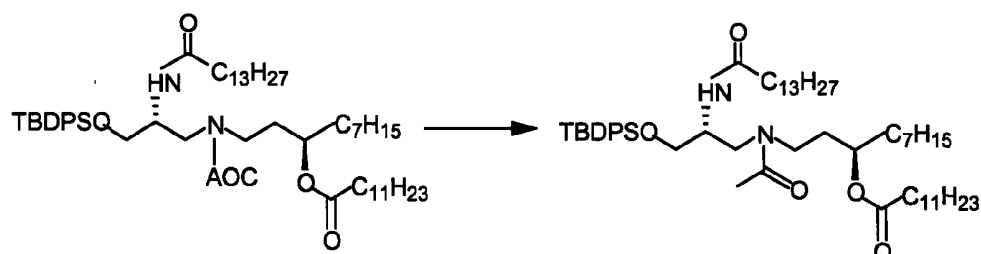
- 5 Den rå alkohol fra det foregående ble oppløst i metylenklorid (15 ml) med laurinsyre (0,280 g) og 4-dimetylaminopyridin (0,017 g). Reaksjonsblandingen ble avkjølt til 0 °C og EDC (0,267 g) ble tilsatt i en porsjon, hvorefter reaksjonsblandingen ble oppvarmet til romtemperatur og omrørt i 16 timer. Vanlig opparbeidelse ga 0,622 g.



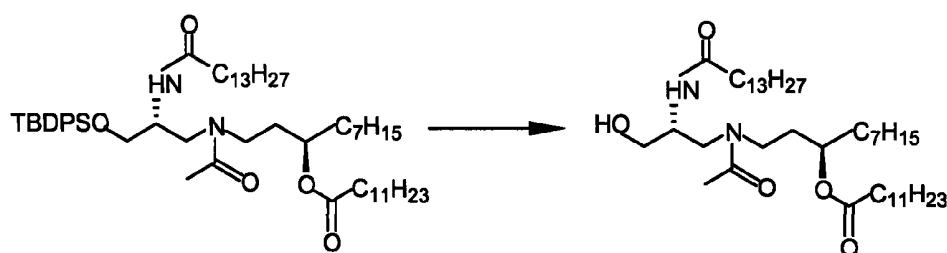
10

Silyleteren (0,563 g) ble oppløst i THF (10 ml) med eddiksyre (0,087 ml). Tertbutylammoniumfluorid (0,330 g) ble tilsatt og reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer. Opparbeidelse på vanlig måte ga 0,384 g.

- 15 Dette materialet ble fosforylert, avblokkert med TFA, dimerisert med fosgen og de allylbeskyttende grupper fjernet med fenylsilan og palladium som beskrevet ovenfor til å gi ER-804780.

Fremstilling av ER-804679

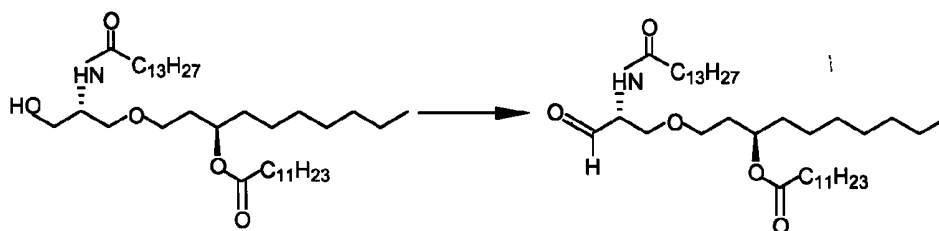
Det beskyttede sekundære amin (0,071 g) ble oppløst i avgasset kloroform (3 ml) med
 5 fenylsilan (0,017 ml) og eddiksyreanhydrid (0,014 ml). Reaksjonsblandingen ble avkjølt til 0 °C og deretter tilsatt tetrakistrifenyfosfinpalladium (0) (0,002 g). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til romtemperatur og omrørt i 30 minutter. Den ferdige reaksjonsblanding ble fortynnet med metylenklorid, vasket med vann, tørket, konsentrert og kromatografert til å gi 0,068 g.



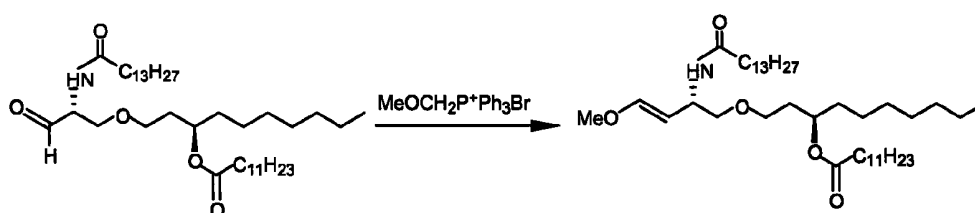
Silyleteren ble avbeskyttet i THF (5 ml) med eddiksyre (0,025 ml) med tilsetning av
 tertbutylammoniumfluorid (0,092 g). Etter omrøring ved romtemperatur i 16 timer ble
 reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 0,120 g.

Dette materialet ble fosforylert, avblokkert med TFA, dimerisert med fosgen og de
 allylbeskyttende grupper fjernet med fenylsilan og palladium som beskrevet ovenfor til å gi
 ER-804679.

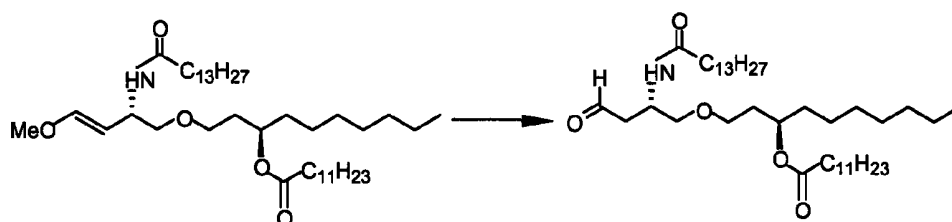
Fremstilling av ER-804764



- DMSO (0,33 ml) ble tilsatt dråpevis til oksalyklorid (0,203 ml) i metylenklorid (10 ml) ved -78 °C. Etter omrøring i 15 minutter ble alkoholen (0,993 g) i metylenklorid (3 ml) tilsatt dråpevis og omrørt for ytterligere 30 minutter. Trietylamin (1,08 ml) ble tilsatt dråpevis, 5 reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 0 °C og reaksjonen ble brakt til opphør ved bruk av mettet ammoniumklorid. Rensing av det rå produkt ved bruk av silikagelkromatografi med 20 % etylacetat i heksaner ga 0,743 g.

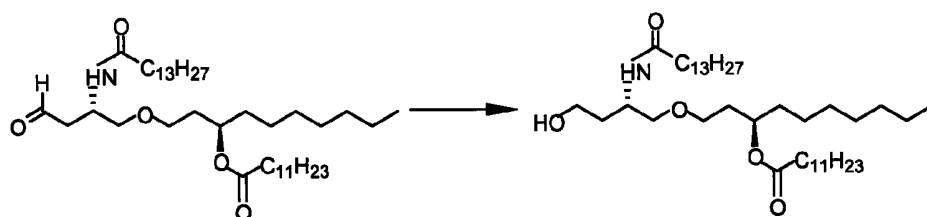


- 10 1,6 M n-butyllitium i heksaner (1,5 ml) ble tilsatt dråpevis til fosfoniumsaltet (0,797 g) i THF (10 ml) ved 0 °C. Etter omrøring i 30 minutter ble aldehydet (0,734 g) i THF (15 ml) tilsatt dråpevis. Etter omrøring ved romtemperatur i 1 time ble reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte til å gi 0,193 g.



15

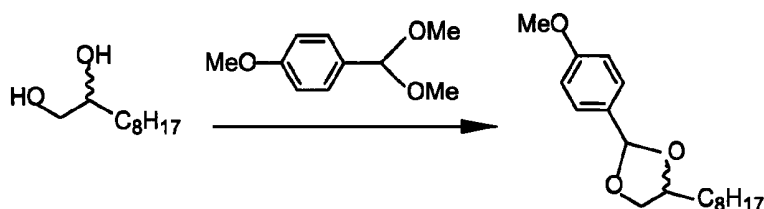
Enoleteren (0,193 g) ble hydrolysert med 57 % hydrogenjodid (0,114 l) i acetonitril (2 ml). Etter omrøring ved romtemperatur i 2 timer ble reaksjonen brakt til opphør med mettet natriumbikarbonat, ekstrahert med metylenklorid og tørket til å gi 0,211 g rått aldehyd.



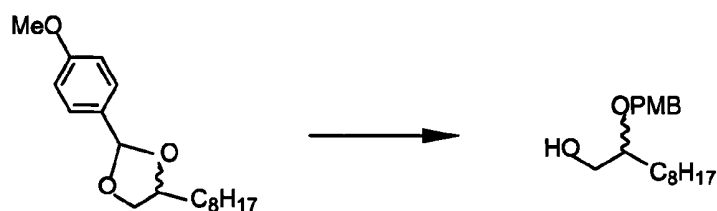
Det rå aldehydet (0,211 g) ble oppløst i metanol (3 ml) og natriumborhydrid (0,033 g) ble tilsatt ved 0 °C. Etter omrøring i 30 minutter ble reaksjonsblandingen fortynnet med vann, ekstrahert med metylenklorid, tørket, konsentrert og renset ved silikagelkromatografi til å gi 0,148 g.

Dette materialet ble fosforylert, avblokkert med TFA, dimerisert med fosgen og de allylbeskyttende grupper fjernet med fenylsilan og palladium som beskrevet ovenfor til å gi ER-804764.

Fremstilling av ER-804772

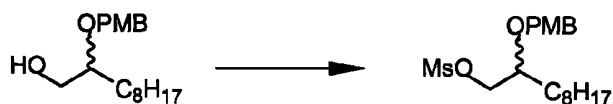


Den kommersielt tilgjengelige diol (1,486 g) ble blandet med acetalet (1,864 g) og *para*-toluensulfonsyre (0,195 g) i DMF (10 ml). Etter omrøring i 20 timer ved romtemperatur under en nitrogenatmosfære ble reaksjonen brakt til opphør med mettet natriumbikarbonat, ekstrahert med metylenklorid, tørket og konsentrert via høyvakuum. Silikagelkromatografi av det resulterende råprodukt ved bruk av 10 % etylacetat i heksaner ga 2,084 g.

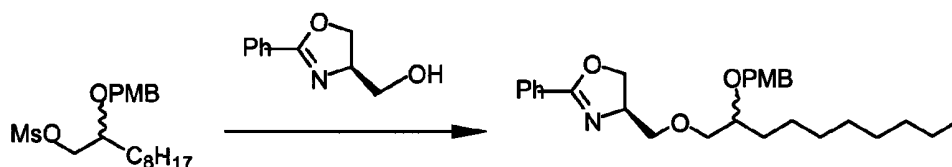


Acetalet (2,084 g) ble avkjølt til -78 °C under en nitrogenatmosfære i metylenklorid (30 ml) etterfulgt av dråpevis tilsetning av 1,0 M DIBAL i heksaner (14,3 ml). Etter ytterligere DIBAL

(14 ml) ble tilsatt, ble reaksjonsblandingen omrørt i 1 time, oppvarmet til romtemperatur og reaksjonen brakt til opphør med natrium, kaliumtartarat. Vanlig opparbeidelse ga 2,1 g.

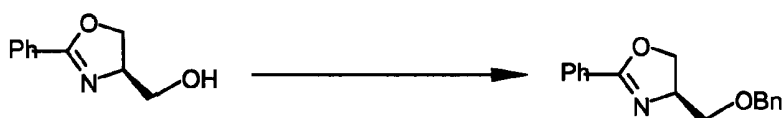


- 5 Alkoholen (1,286 g) ble blandet med trietylamin (0,883 g) i metylenklorid (15 ml) og avkjølt til 0 °C. Metansulfonylchlorid (0,575 g) ble tilsatt dråpevis etterfulgt av omrøring i 20 minutter ved 0 °C og romtemperatur i 2 timer. Vanlig opparbeidelse ga 1,496 g.



- 10 Alkoholen (1,495 g) i DMF (10 ml) dråpevis ble tilsatt en omrørende suspensjon av vasket 60 % natriumhydrid (0,257 g) i DMF (20 ml) ved 0 °C. Etter omrøring i 3 timer ble mesylatet (0,925 g) i DMF (10 ml) tilsatt dråpevis. Etter omrøring i ytterligere 3 dager ble reaksjonen brakt til opphør, og reaksjonsblandingen opparbeidet på vanlig måte ga 0,905 g.
- 15 Som med eksempler angitt ovenfor, ble den *para*-metoksybenzylbeskyttende gruppe hydrolysert med CAN, den beskyttede aminoalkohol ble hydrolysert ved bruk av vandig HCl og deretter KOH, acylering av aminen med tetradekanoylchlorid, silylering av den primære alkohol med TBDPS, acylering av den sekundære alkohol med dodekanoylchlorid og hydrolyse av silylbeskyttelsesgruppen ved bruk av TBAF for å gi den primære alkohol. Dette
- 20 materialet ble fosforylert, avblokkert med TFA, dimerisert med fosgen og de allylbeskyttende grupper fjernet med fenylsilan og palladium som beskrevet ovenfor til å gi ER-804772.

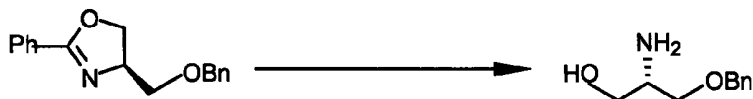
Fremstilling av ER-804947



25

Alkoholen (0,263 g) i THF (5 ml) ble tilsatt dråpevis til vasket 60 % natriumhydrid (0,216 g) i DMF (2,0 ml) ved romtemperatur under en nitrogenatmosfære. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 30 minutter deretter benzylbromid (0,272 ml) med en katalytisk mengde (0,05 g) av

tetrabutylammoniumjodid. Den endelige reaksjonsblandingen ble omrørt i ytterligere 1 time hvorefter blandingen ble brakt til opphør og opparbeidet på vanlig måte til å gi 0,365 g.

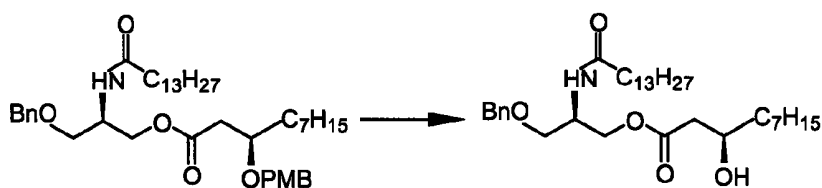


- 5 Den beskyttede aminoalkohol (0,189 g) ble hydrolysert ved bruk av 4 N saltsyre (2,5 ml) fulgt av 40 % natriumhydroksid (2,5 ml) som tidligere beskrevet til å gi 0,121 g.

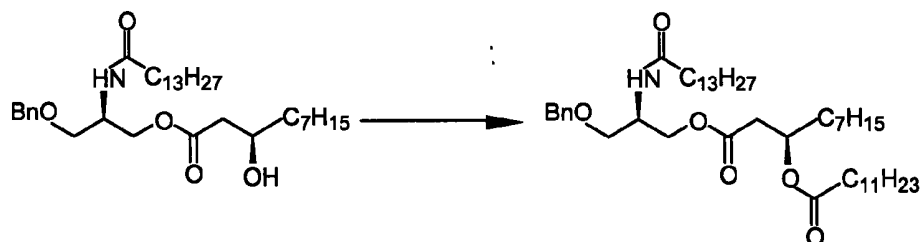


- Aminoalkoholen (0,121 g) ble oppløst i metylenklorid (2 ml) med mettet natriumbikarbonat (2 ml). Etter avkjøling til 0 °C ble myristoylchlorid (0,199 ml) tilsatt dråpevis. Etter fortsatt omrøring i 2 timer ble blandingen opparbeidet på vanlig måte og ga 1,81 g.

- Alkoholen (0,181 g) ble oppløst i metylenklorid (5 ml) med syren (0,180 g) og 1-[3-(dimetylamino)propyl]-3-etylkarbodiimid, EDC (0,133 g). Blandingen ble avkjølt til 0 °C og 4-dimetylaminopyridin ble tilsatt etterfulgt av omrøring i 16 timer ved romtemperatur. Vanlig opparbeidelse ga 0,310 g.

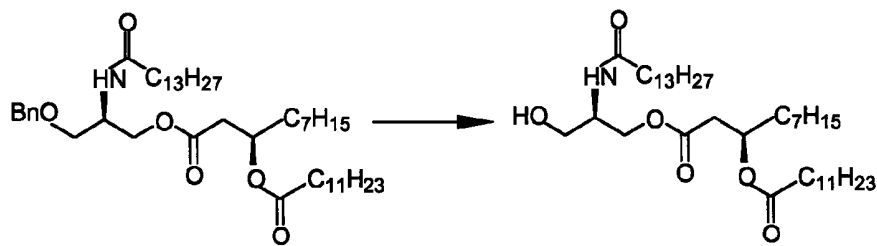


- Para*-metoksybenzyleteren (0,305 g) ble oppløst i acetonitril (8 ml) med vann (2 ml) og avkjølt til 0 °C. Ceriumammoniumnitrat (1,110 g) ble tilsatt og reaksjonsblanding ble omrørt i 2 timer, hvorefter vanlig opparbeidelse ga rå alkohol.



Den rå alkohol ble oppløst i metylenklorid (8 ml) med laurinsyre (0,126 g) og 4-dimetylaminopyridin (0,011 g). Etter avkjøling til 0 °C ble EDC (0,119 g) tilsatt og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer. Vanlig opparbeidelse ga 0,355 g.

5



Benzyleteren (0,355 g) ble oppløst i etylacetat (50 ml) med palladiumhydroksid (0,048 g) og eddiksyre (0,25 ml). Reaksjonsblandingen ble anbrakt under 3,5 kg/cm² hydrogenatmosfære og rystet i 10 timer. Opparbeidelse på vanlig måte ga 0,255 g.

10

Dette materialet ble fosforylert, avblokkert med TFA, dimerisert med fosgen og de allylbeskyttende grupper fjernet med fenylsilan og palladium som beskrevet ovenfor til å gi ER-804947.

BIOLOGISKE EKSEMPLER

Eksempel 7: Induksjon av cytokiner (in vitro)

Det er ingen anerkjente *in vitro* prøver som kan anvendes som indikator på adjuvansaktivitet.

- 5 Et molekyls manglende evne til å utløse stimulerende respons i makrofager er imidlertid en sterk indikasjon på at molekylet ikke sannsynlig vil være et immunoadjuvansmiddel. Av denne grunn kan evnen av forbindelser til å stimulere frigivelse av TNF-alfa og andre cytokiner fra immune celler være indikative på deres evne til å stimulere en immunrespons som kan resultere i adjuvansaktivitet.

10

A. Prøver i humant fullblod

Det mest tilgjengelige humane system for å teste forbindelsesaktivitet på

monocytt/makrofager er i fullblod. Forskjellige konsentrasjoner av forbindelser ifølge oppfinnelsen ble tilsatt til 10x stamløsninger i 50 µl Ca.⁺⁺, Mg⁺⁺-fri Hank's balanserte

- 15 saltoppløsning (HBSS) etterfulgt av 50 µl HBSS i 400 µl heparinisert fullblod oppnådd fra normale, frivillige (18-51 år gamle; vekt 50-105 kg) i brønnene på plast-analyseplater, for et totalt volum på 500 µl/brønn (sluttkonsentrasjon av fullblod var 80 %). Etter en 3-timers inkubasjon med forsiktig risting ved 37 °C i en 5 % CO₂ atmosfære, ble analyseplatene sentrifugert ved 1000 x g i 10 minutter ved 4 °C og plasma ble avsuget og frosset ved -80 °C.
- 20 Plasmaprøver ble analysert for TNF-alfa ved hjelp av ELISA (Genzyme Corp., Cambridge, MA). Hvert analysepunkt ble testet i triplikat.

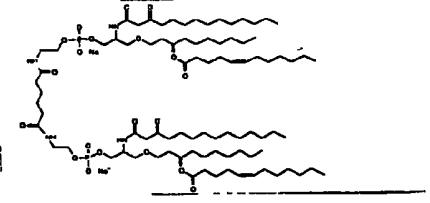
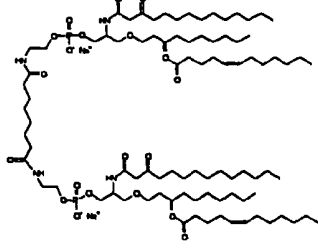
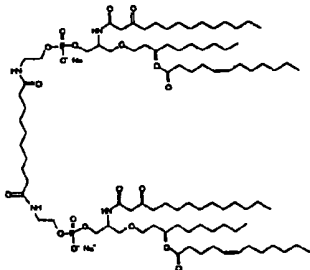
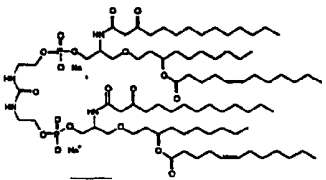
Som vist i figur 1 stimulerer forbindelser, slik som 100, 184 og 186 blodoverførte celler til å friggi TNF-alfa. Denne stimulatoriske aktivitet kan sammenliknes med aktiviteten av 10 ng/ml

25 endotoksin (eller LPS) tilstede i liknende inkubasjoner i den samme analyse. Som vist i tabell 1 er aktiviteten av forbindelser (testet ved 10 µM) i området fra inaktive (som f. eks. forbindelsen 110) til forbindelser som viser større aktivitet enn LPS-standard.

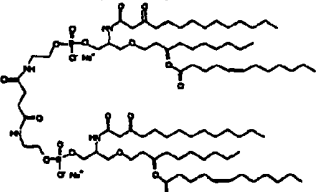
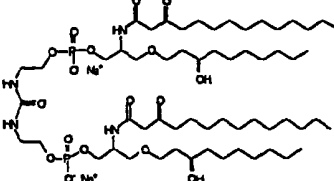
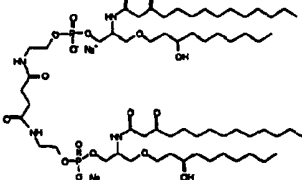
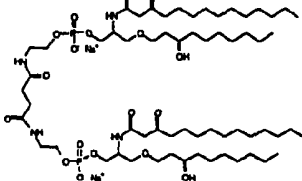
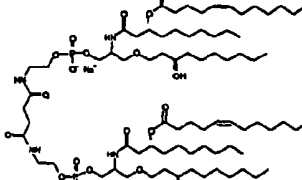
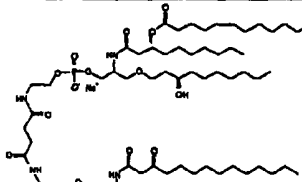
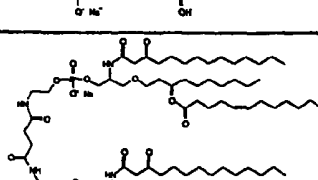
B. Dyrkede humane cellelinjer

- 30 Liknende resultater kan oppnås når forbindelser ifølge oppfinnelsen testes i en celledyrkingsmodell. I denne prøve testes forbindelser ifølge oppfinnelsen på deres evne til å stimulere sekresjon av alkalisk fosfatase fra THP-1-celler som er blitt transfektert med genet for sekretert alkalisk fosfatase under kontroll av TNF-alfa-promoteren, som beskrevet i detalj i Goto et al., Molecular Pharmacology 49; 860-873 (1996). I denne analyse kan imidlertid
- 35 virkningene ved å fjerne serum¹- en tilstand som mer sannsynlig etterlikner et subkutan miljø - bedømmes. Som vist i figur 2 og beskrevet i tabell 1 indikerer resultatet fra disse prøver at forbindelser ifølge oppfinnelsen stimulerer induksjon av gener under kontroll av TNF-alfa-promoteren når de tilsettes celler i fravær av så vel som i nærvær av serum.

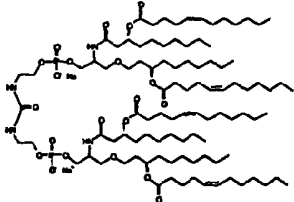
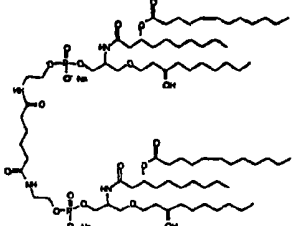
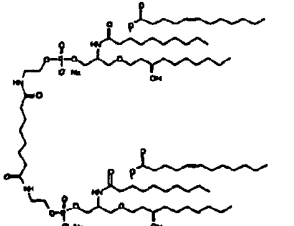
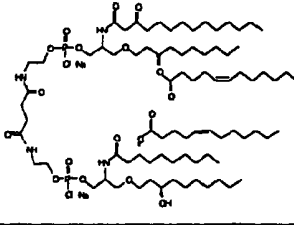
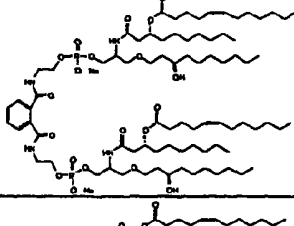
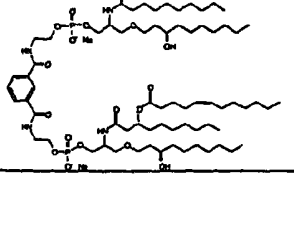
Tabell 1. Stimulering av cytokin frigivelse ved hjelp av forbindelser in vitro

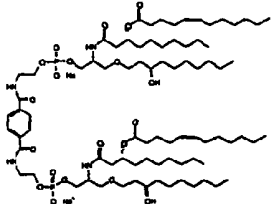
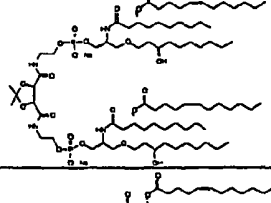
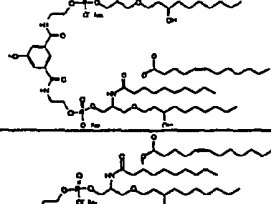
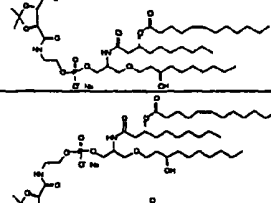
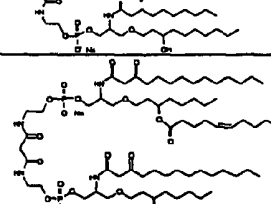
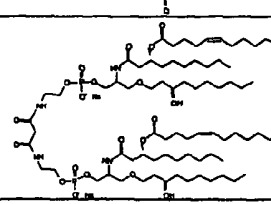
ER#	Forbindelse	Fullblod (% av LPS ved 10 µM)	THP-1 cellestimulasjon (% av forbindelse 100 ved 10 µM) ⁽¹⁾	
			+serum	-serum
	MPL Standard	29 ⁽²⁾		
112022		131 ± 10,2 (n=6)	-	
111230			49	
111231			17	
111232		158	155	225

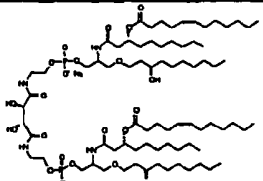
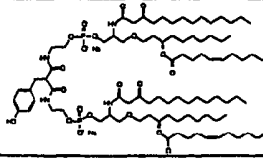
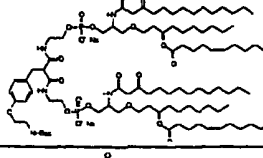
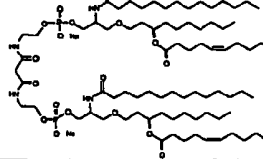
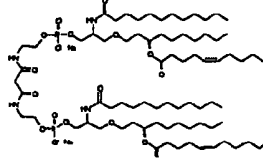
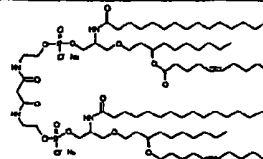
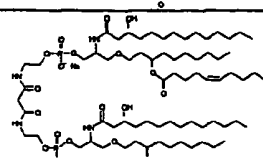
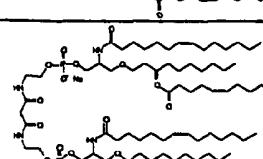
¹ Dette er viktig for å bestemme om serumkomponenter som for eksempel lipopolysakkaridbindende protein er

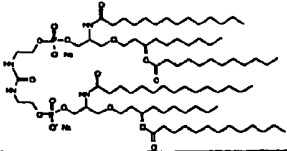
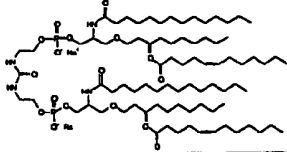
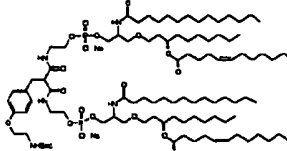
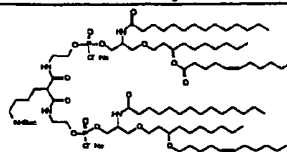
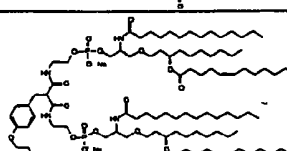
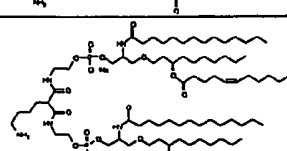
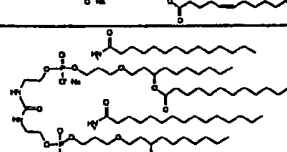
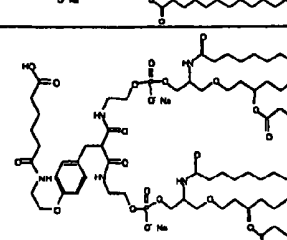
111233			141	
112043		0		
112047		0		
112047		0		
112048		0	24	
112049		0		
112063		0		

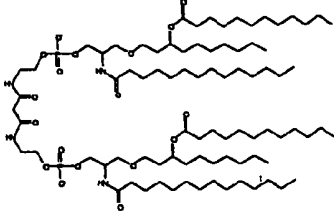
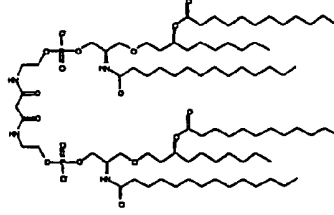
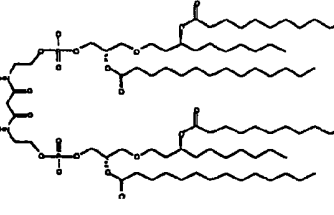
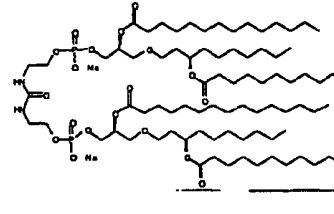
112064		50	
112065		86	
112066		162	330
112071		0	
112072		0	
112091		0	
112092		0	

112093		0		
112098		0		
112049		0		
112100		0		
112859		0		
112860		0		

112861		0		
113634		0		
113635		0		
113643		0		
113644		0		
113651		133 ± 4 (n=4)	215	254
113665				

113666				
118023		63		
019772		69		
118989		159		
118999		105		
119000		60		
119001		113		
118949		138		

119327		165±33 (n=3)		
119328		181± 42 (n=3)		
119329		2 ± 2 (n=2)		
119521		103		
119522		129		
119523		176		
803022		164		
803045		65		

803056		151 ± 42		
803058		149 ± 37 (n=2)		
803059		2		
803592		15		

⁽¹⁾ Respons i hver prøve ble sammenliknet til 10 µM forbindelse 100 intern standard som typisk induserte 2-3 gangers økning i TNF-alfa PLAP uttrykking over basal.

⁽²⁾ Testet ved @5,8 µM.

5

C. Murine splenocyter

Forbindelsers evne til å stimulere cytokin frigivelse fra splenocyter kan bedømmes i en musemodell. Miltceller høstet fra C57BL/6-mus dyrkes i 24 timer i RPMI 1640

- 10 celledyrkingsmedium inneholdende 5 % FBS, 1 mM natriumpyruvat, 2mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin/streptomycin og 50 µM beta-merkaptotanol, ved forskjellige konsentrasjoner av testforbindelse i 20 til 24 timer, hvorefter celledyrkingssupernatanten testes på nærvær av cytokiner.

Miltceller høstet fra mus ble dyrket i 24 timer med testforbindelse og supernatanten ble testet på frigivelse av cytokiner. Som vist i figurene 3 og 4, blir frigivelse av cytokiner som IL-10 og interferon-gamma fra splenocyter stimulert av forbindelser slik som 104, 106, 124, 126, 160 og 162.

5

Disse analyser anvendte en heterogen populasjon av celler avledet fra milten. Dette gjør det mulig at cytokininduksjon kan bevirkes både ved direkte virkninger av testforbindelser på celler og ved mer indirekte stimulering av cytokine "kaskader" der frigivelse av cytokin av en type celle kan indusere frigivelse av andre cytokiner i andre celler tilstede i de samme media.

10 Det er mulig at dette cytokin "miljø" er ansvarlig for en del av disse robuste immunresponser.

Eksempel 8: *In vivo* induksjon av antistoffrespons

Den mest kritiske test av adjuvansaktivitet er bestemmelsen om tilsetningen av en forbindelse til et antigenpreparat øker immunresponsen ved å forhøye nivået av antistoffer som genereres til dette antigen når forbindelsen tilføres et levende dyr.

15

Initiale forsøk involverte injeksjonen av mus (Balb/c) med forbindelser ifølge oppfinnelsen pluss et peptid konjugert til en bærer som for eksempel albuskjell hemocyanin. Peptidet valgt for disse undersøkelser er et peptid (P18) som tilsvarer aminosyrene 308-322 av V3-sløyfen av HIV IIIB gp120 protein. P18 21aa-peptidet, tilsvarende aminosyrene 308-322 av V3-søyfen i HIV IIIB gp120 proteinet, er blitt rapportert å være immunogenisk. Dette peptid med glysin/alanin/glysin spacer rester pluss en aminoterminal cysteinrest ble syntetisert ved hjelp av Genosys (Woodlands TX). Peptidsekvensen er som følger:

20

CGAGIRIQRGPGRAFTIGKG der de understrekede aminosyrene representerer den native sekvens. Peptidet ble isolert til mer enn 80 % renhet ved bruk av HPLC av leverandøren.

25

Dette peptid ble koblet via cysteinresten til bovint serum albumin (BSA) og albuskjell hemocyanin (KLH) ved bruk av maleimidaktivert konjugasjon (Pierce Immunochemical; cat#77107). Det KLH-konjugerte peptid ble anvendt som immunogenet og BSA-konjugatet som det "screening" mål-antigen for P18 spesifikke antistoffer. Den indikerte mengde av KLH-P18-konjugat ble rutinemessig anvendt sammen med 300 µg testforbindelse, alun eller PBS ble injisert med 2 eller 3 ukers mellomrom (som indikert), inn i Balb/c-hannmus (Charles River Laboratories) omtrent 6-8 uker gamle (18-25 g). Alle injeksjoner var subkutane på baksiden av halsen med 200 µl av en blanding av antigen pluss adjuvansmiddel i PBS tilført hver annen uke (3 uker for polysakkarider eller influensa) for totalt tre injeksjoner. Mus ble blodtappet en eller to uker etter andre og tredje injeksjon. Blodprøver er betegnet når de er tatt (dvs. sekundær blodtapping er en uke etter den andre proteininjeksjon eller to uker etter de andre polysakkaridinjeksjoner, tertiær blodtapping er etter den tredje injeksjon av antigen/adjuvansmiddel. Blod ble samlet etter kutt i halevenen og dråper samlet i

35

Becton Dickinson mikrotainer-type serum separatorør. Serum ble separert fra de røde celler ved mikrosentrifugering og testet ved hjelp av ELISA for antigenspesifikke IgG-nivåer.

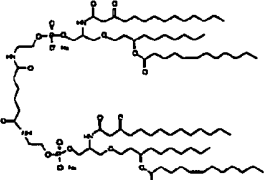
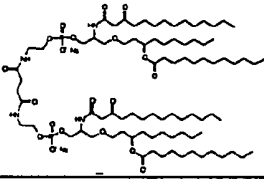
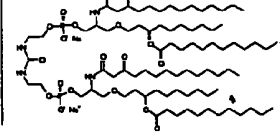
Immunrespons til peptidet kan testes ved enzymtilknyttet immunosorbent analyse (ELISA)

- 5 som kan kvantitere nivåer av serumantistoff som binder til P!(-peptid, konjugert til et ytterligere ikke-kryssreagerende protein som for eksempel bovint serum albumin (P18-BSA) og som er påført en ELISA-plate.

Som vist i figur 5 og tabellene 2 og 3, viste mus injisert med de forskjellige forbindelser

- 10 sammen med KLH-P18 antigen større respons (høyere nivåer av antistoff) enn de som ble injisert med bare P18-KLH-peptidkonjugatet.

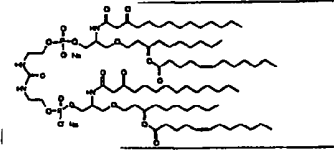
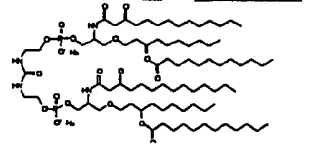
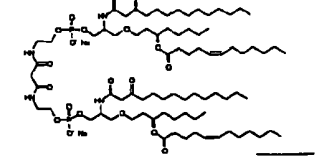
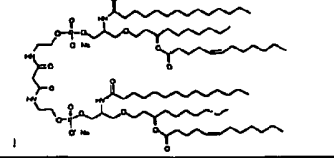
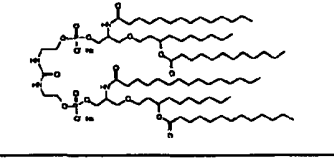
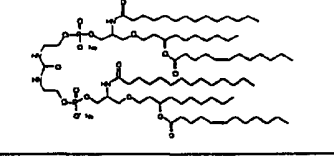
Tabell 2. Stimulering av antistoffgenerering til P18-peptid ved forbindelser

ER#	Forbindelse	Gjennomsnittlig serum anti-P18 IgG konsentrasjon ¹ (gangers økning i forhold til uten adjuvansmiddel)
112022		6,7
112065		19,4
112066		39,2

¹ Konsentrasjon av IgG analysert ved den tertiære blodtapping.

- 15 Gjennomsnittlig IgG for serum fra 5 mus injisert med 300 µg forbindelse og 5 µg KLH-P18 konjugat antigen som beskrevet i avsnittet om metoder. Antigenspesifikke ELISA ble utført som beskrevet i avsnittet om metoder med Costar EIA/RIA-plater belagt med 50 µl av 5 µg/ml BSA-P18-konjugat i PBS.

Tabell 3. Stimulering av antistoffgenerering til P18-peptid ved forbindelser

Forbindelse #	Forbindelse	Gjennomsnittlig serum anti-P18 IgG konsentrasjon ¹ (gangers økning i forhold til uten adjuvansmiddel)
111232		7,6
112066		13,4*
113651		10,5*
118989		4,35*
119327		16,5*
119328		26,8*

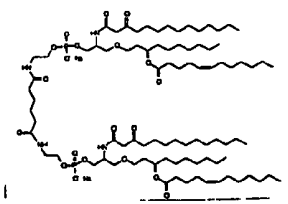
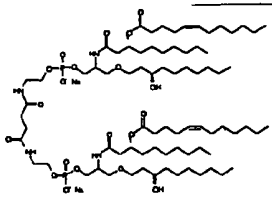
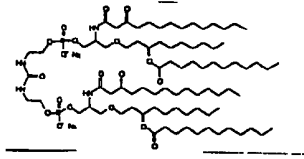
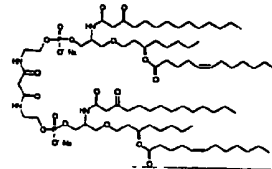
¹ Konsentrasjon av IgG analysert ved den tertiære blodtapping. Gjennomsnittlig IgG for serum fra 5 mus som var injisert med 300 µg forbindelse og antigen (følger) som beskrevet i avsnittet om metoder. Antigenspesifikke ELISA ble utført som beskrevet i avsnittet om metoder med Costar EIA/RIA-plater belagt med 50 µl av 5 µg/ml

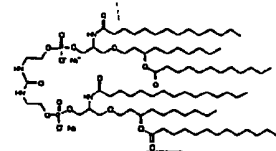
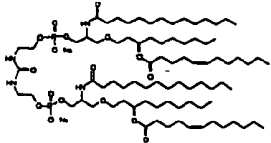
- 5 BSA-P18 konjugat i PBS. Som sammenlikning økte tilsetning av alun IgG- nivåer 7,4 ganger i forhold til PBS/antigen alene. Anvendt antigen: primært: 1 µg KLH-konjugert P18-peptid. 2° og 3° vedlikeholdsdose: 0,5 µg KLH-konjugert P18-peptid. *p<0,05 ved hjelp av Student's to-halede t-test (ulik varians) sammenliknet med PBS + antigengruppen.

Adjuvansaktivitet er også blitt oppnådd med forbindelser ifølge oppfinnelsen når disse testes med andre antigener. Forbindelser som 100, 116, 126, 160, 184 og 186 kan stimulere antigenspesifikk antistoffproduksjon med opptil 26,8 ganger (tabell 4) til influenza X-31-antigen. Økninger i respons sees også når tetanustoksoidet (figur 6) og meningokokkalt C polysakkarid (tabell 5) anvendes som eksponeringsantigener. I prøvene ble det anvendt 1 µg meningokokkalt C PS eller 1,5 µg tetanustoksoid eller 5µg influenza X-31 (SPAFAS laboratories). Tetanustoksoid fra Accurate Chemical (cat#sstettox) ble anvendt som eksponeringsantigen, mens det rensede toksoidet fra List Biologicals (cat#191) ble anvendt som målantigen for ELISA-analysen.

10

Tabell 4. Stimulering av antistoffgenerering til Influenza X31 ved forbindelser

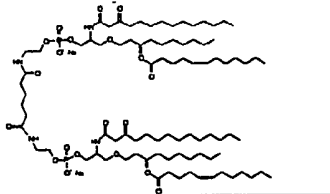
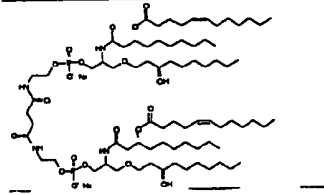
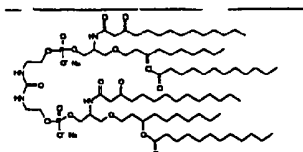
ER#	Forbindelse	Gjennomsnittlig serum anti-influenza X31 IgG konsentrasjon ¹ (gangers økning i forhold til uten adjuvansmiddel)
112022		1,7
112048		5,4
112066		2,3
113651		1

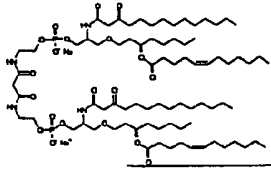
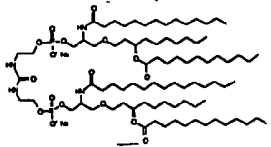
119327		7,85
119328		26,8

¹ Konsentrasjon av IgG analysert ved den tertiære blodtapping.

Gjennomsnittlig IgG for serum fra 5 mus injisert med 30 µg forbindelse og 5 µg antigen som beskrevet i avsnittet om metoder. Antigenspesifikke ELISA ble utført som beskrevet i avsnittet om metoder med Costar EIA/RIA-plater belagt med 50 µl av 10 µg/ml influenza X-31-antigen i 0,5 M natriumbikarbonat-buffer pH 9,6. Som sammenlikning økte tilsetning av alun IgG-nivåer 3,5 ganger i forhold til PBS/antigen alene.

Tabell 5. Stimulering av antistoffgenerering til menningokokkalt polysakkarid ved forbindelser

ER#	Forbindelse	Gjennomsnittlig serum anti-menningokokkal PS IgG konsentrasjon ¹ (gangers økning i forhold til uten adjuvansmiddel)
112032		8,3
112048		1,8
112066		12,9

113651		18,3
119327		15,8

¹Konsentrasjon av IgG analysert ved den sekundære blodtapping.

Gjennomsnittlig IgG for serum fra 5 mus injisert med 300 µg forbindelse og 1 µg antigen som beskrevet i avsnittet om metoder. Antigenspesifikke ELISA ble utført som beskrevet i avsnittet om metoder med Costar

- 5 EIA/RIA-plater belagt med 50 µl av 5 µg/ml menningokokkalt PS i PBS pluss metylert humant serumalbumin som beskrevet av Gheesling et al., J. Clin Microbiol. 32; 1475-82 (1994). Som sammenlikning økte tilsetning av alun IgG nivåene 2,3 ganger i forhold til PBS/antigen alene.

- 10 Influenza virus X-31 ble innkjøpt fra SPAFAS (Storrs, CT) og var inaktivert og bekreftet å være inaktivt [Payne et al., Vaccine 16; 92-98 (1998)] av leverandøren.

Menningokokkalt C polysakkarid (PS) ble levert av Pasteur Merrieur Connaught (Swiftwater PA). Metylert, humant albumin kan oppnås ifølge metodene beskrevet av Gheesling et al., J. Clin Microbiol. 32; 1475-82 (1994).

15

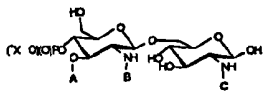
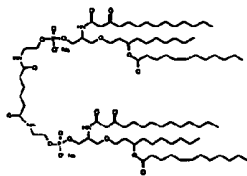
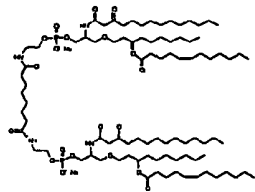
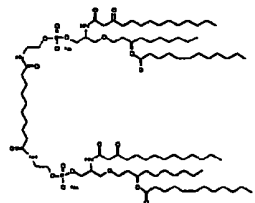
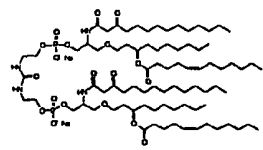
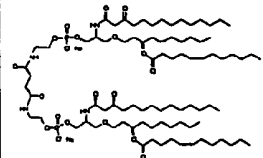
For fremstillingen av antigen/adjuvansmiddelblandingene ble frysetørkede testforbindelser rekonstituert til 2 mg/ml med fosfatbufret saltoppløsning (PBS; cat # P-3813; Sigma Chemical Co, St Louis MO) og ultralydbehandlet i et avkjølt vannbad i 2 minutter.

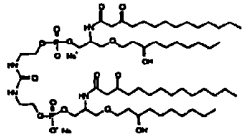
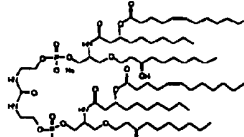
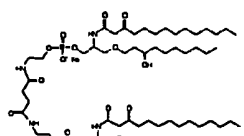
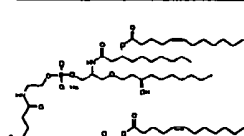
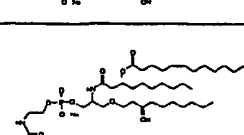
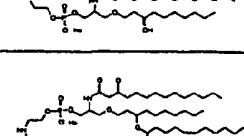
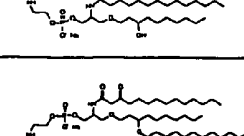
- 20 Monofosforyllipid A, MPL, (Ribi Immunochemical) ble rekonstituert til 2 mg/ml med sterilt vann for injeksjon, inkubert ved 50 °C i 15 minutter og deretter ultralydbehandlet som ovenfor. "Imject" alun, innkjøpt fra Pierce Immunochemical, ble anvendt ifølge produsentens retningslinjer og omfattet omtrent 20-30 % av injeksjonsvolumet. Indikerte mengder av antigen, fortynnet i PBS, ble blandet med forbindelsene, MPL eller alun slik at den endelige konsentrasjon av forbindelsen eller MPL var 300 µg (med mindre annet er angitt) i det 200 µl
- 25 injeksjonsvolum. Blandingene ble inkubert ved romtemperatur i 40 minutter med kontinuerlig risting før injeksjon.

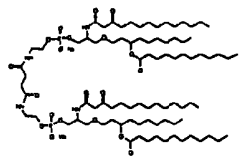
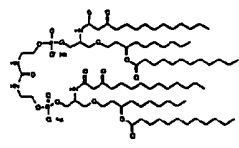
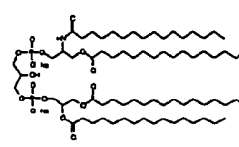
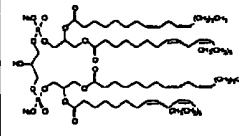
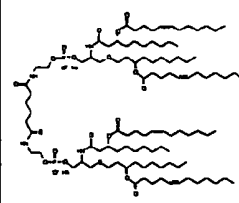
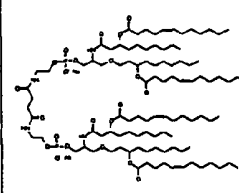
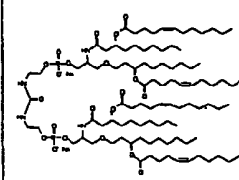
- 30 Antigenspesifikke IgG-nivåer ble overvåket ved hjelp av direkte ELISA hvor antigen ble passivt påført 96-brønners Costar EIA/RIA-plater. Plater ble belagt med 50 µl/brønn av det indikerte antigen og inkubert over natten (ON) ved 4 °C og vasket 3x med PBS + 0,05 %

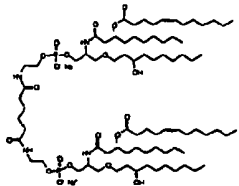
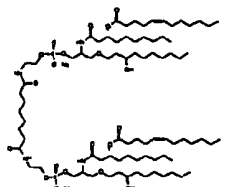
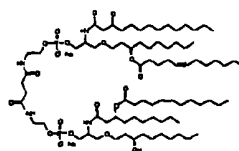
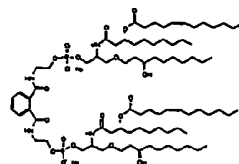
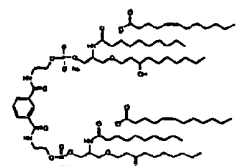
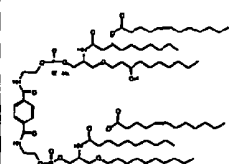
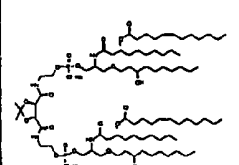
- "tween" 20 (PBS-t) i en automatisert platevasker. Plater ble så blokkert med 200 µl/brønn med 0,5 % gelatin i PBS i 1 time ved romtemperatur (RT) og vasket 3x med PBS-t. Musesera ble fortynnet i PBS-t pluss 0,3 % BSA og 100 µl av varierende fortynningsmidler ble tilsatt, i duplikat til de antigenbelagte brønner (eller BSA-belagte brønner som en kontroll) og
- 5 inkubert ved RT i 1 time og på nytt vasket 3x med PBS-t. Biotinylert geit anti-muse IgG (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham AL, cat # 1031-08) ble fortynnet 1:5 000 i PBS-t og 100 µl/brønn ble påført og inkubert ved RT i 1 time, vasket 3x med PBS-t og etterfulgt av tilsetning av 1:10 000 streptavidin-pepperrotperoksidasekonjugat (Southern Biotechnology Associates Inc.) i PBS-t i 30 minutter ved RT og på nytt vasket 3x med PBS-t.
 - 10 Brønner ble så inkubert i 100 µl TMB-substrat (Kirkegaard and Perry Labs) i 5 minutter. Fargeutvikling ble stanset med tilsetning av et like volum av 1 M fosforsyre og absorbens ble avlest ved 450 nm på en "Titertek Multiscan"-plateleser med Deltasoft programvare analysepakke.
 - 15 For relativ kvantitering av antigenspesifikke IgG-nivåer ble kurver sammenliknet med hverandre ved å bestemme den fortynning som var nødvendig for å oppnå en bestemt mengde av antistoffgenerert farge. I noen tilfeller ble en total IgG-analyse ved bruk av et anti-FAb-spesifikt reagens for å innfange kjente mengder rensed IgG (innkjøpt fra Southern Biotech.) som en IgG standardkurve gjennomført i konjunksjon med det direkte ELISA på BSA-P18-
 - 20 konjugatet. Anti-FAb-reagenset orienterer det rensede IgG på en måte liknende hvorledes et antistoff ville binde til et antigen gjennom FAb-regionen. Dette tillater påvisning av bundet antistoff ved hjelp av de samme reagenser som anvendes for å måle antigenspesifikk innfangning av antistoffer. De samme reagensoppløsninger anvendt for påvisning av antistoffene bundet til BSA-P18-konjugat, nemlig biotinylert anti-IgG (Fc-spesifikk) etterfulgt
 - 25 med HRP-streptavidin, ble samtidig anvendt til den anti-FAb totale IgG kvantitative analyse og den antispesifikke analyse. Følgelig er signalet fra bindingen av den rensede IgG kurve ekvivalent til signalet generert til like mengder av IgG bundet i anti-mål antigen analysen. Mengden av antistoff i serumet blir så interpolert fra den rensede IgG-standard ved bruk av en 4-parameterkurvetilpasning (DeltaSoft 3 programpakke).

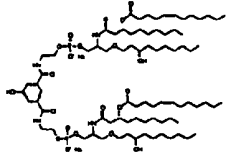
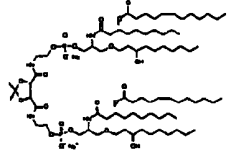
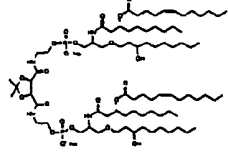
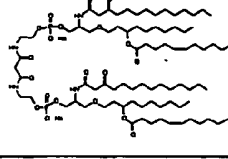
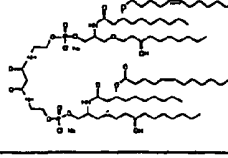
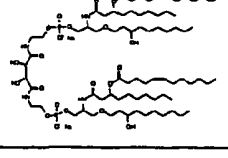
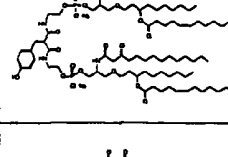
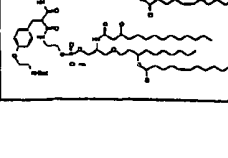
Tabell 6. WB ED₅₀ vs. % LPS ved 10ng/ml

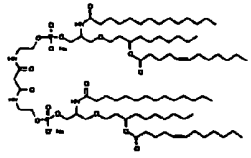
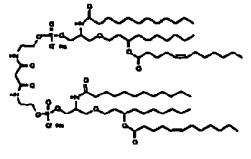
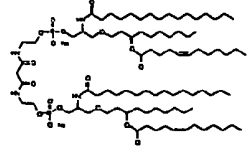
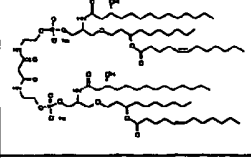
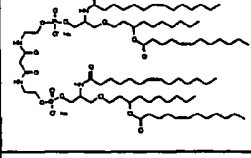
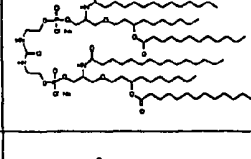
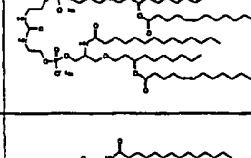
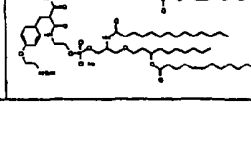
ER#	Struktur	WB ED ₅₀ vs LPS@ 10ng/ml
MPL Standard		>> 10 µm
112022		0.696 µm
111230		
111231		0.29 µm
111232		
111233		

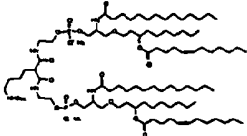
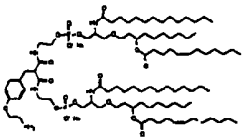
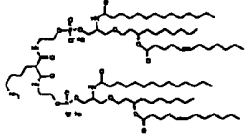
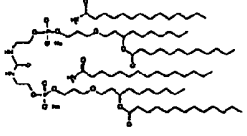
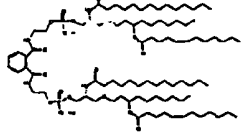
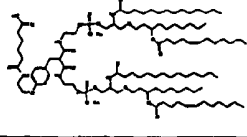
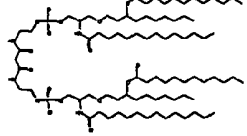
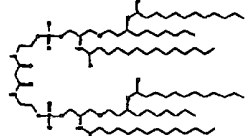
112043		
112044		
112047		
112048		>> 10 μ M
112049		
112063		
112064		

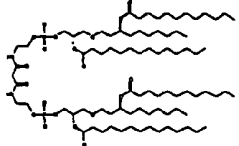
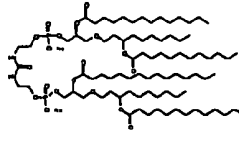
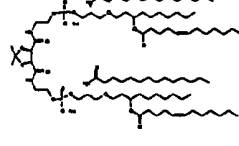
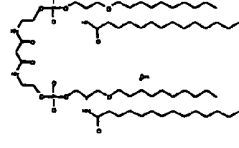
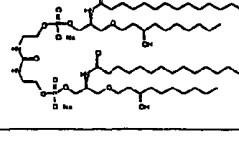
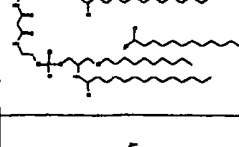
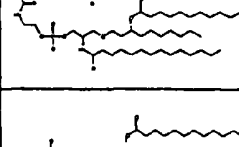
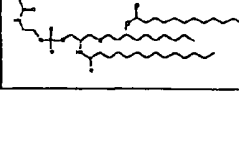
112065		0.25 μM
112066		0.04 μM
112071		
112072		
112091		
112092		
112093		

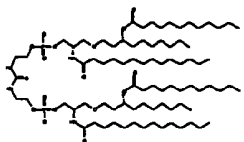
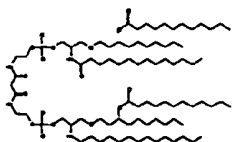
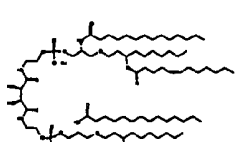
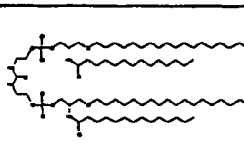
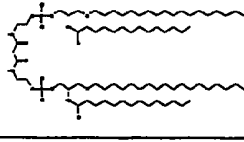
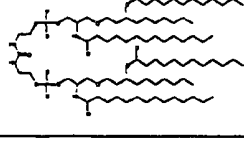
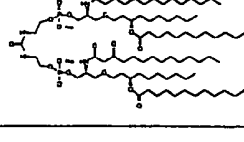
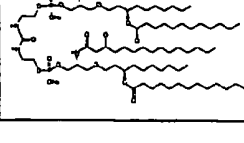
112098		
112099		
112100		
112859		
112860		
112861		
113634		

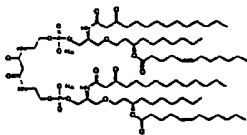
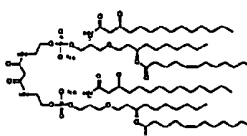
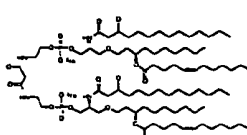
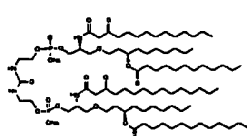
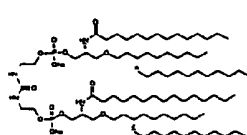
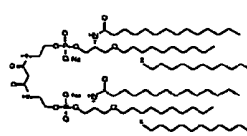
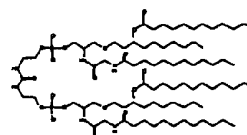
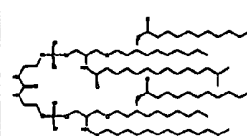
113635		
113643		
113644		
113651		0.70 μ M
113665		
113666		
118023		
019772		

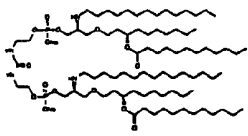
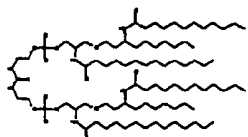
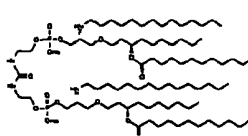
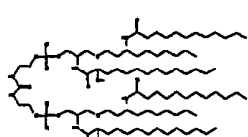
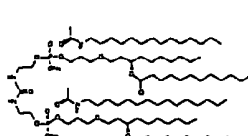
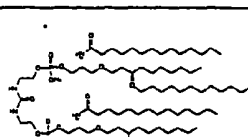
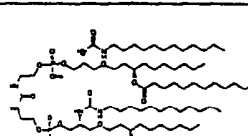
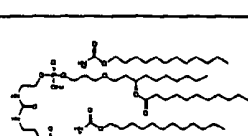
118989		0.1 μM
118999		
119000		
119001		1.23 μM
118949		
119327		0.015 μM
119328		$\gg 10 \mu\text{M}$
119329		

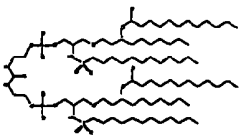
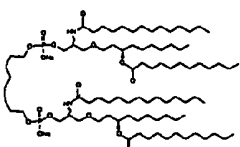
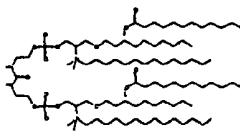
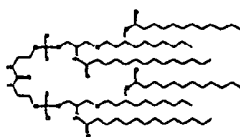
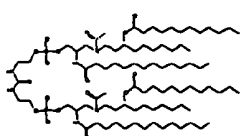
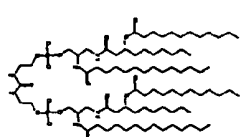
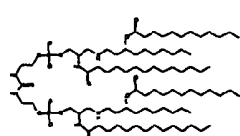
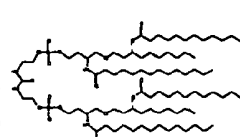
119521		
119522		
119523		
803022		0.06 μM
803028		
803045		
803056		
803058		0.022 μM

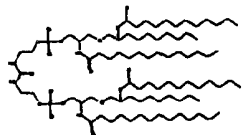
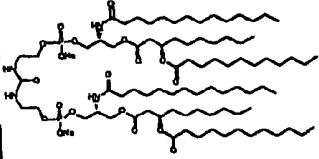
803059		0.89 μ M
803592		
803596		
803597		
803598		
803599		
803613		
803731		> 10 μ M

803732		0.85 μM
803733		0.70 μM
803751		
803783		
803784		
803789		0.10 μM
804053		1.34 μM
804057		0.008 μM

804058		0.03 μM
804059		> 10 μM
804061		2.5 μM
804097		0.3 μM
804121		0.46 μM
804130		0.66 μM
804221		2.2 μM
804222		0.008 μM

804252		400 nM (576-021) + EtOH
804253		> 10 μ M
804281		0.45 μ M
804313		0.014 μ M
804339		1.06 μ M
804372		0.4 μ M
804442		0.007 μ M
804503		0.35 μ M

804558		0.16 μM
804596		> 10 μM
804674		1.2 μM
804678		0.018 μM
804679		0.53 μM
804680		0.015 μM
804732		<0.001 μM
804764		0.015 μM

804772		0.008 μM
804947		$\gg 10 \mu\text{M}$

Tabell 7 nedenfor inneholder forbindelsesnummeret som referert heri til det tilsvarende ER-nummer.

Tabell 7. Korrespondering av forbindelsesnummeret til ER-nummere.

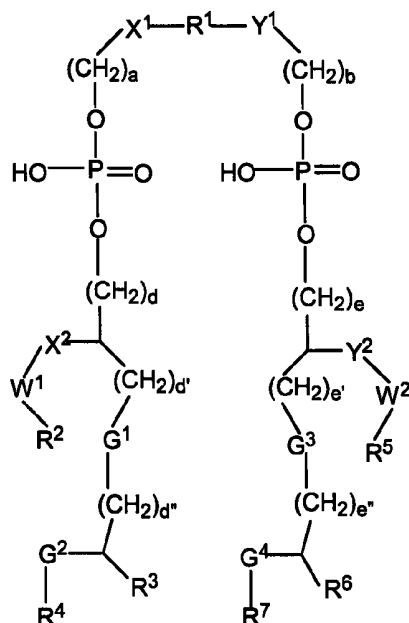
Forbindelse nr.	ER nr.	Forbindelse nr.	ER nr.
16	112048	152	113634
31	803058	154	113635
48	803733	156	113643
50	803022	158	113644
62	803789	160	113651
72	803592	164	113665
100	112022	166	113666
102	111230	168	118023
104	111231	170	019772
106	111232	172	118989
108	111233	176	118999
110	112043	178	119000
112	112047	180	119001
114	112047	182	118949
116	112048	184	119327
118	112049	186	119328
120	112063	188	119329
122	112064	190	119521
124	112065	192	119522
126	112066	194	119523
128	112071	196	803022
130	112072	198	803045
132	112091	200	803056

134	112092	202	803058
136	112093	204	803059
138	112098	206	803592
140	112099		
142	112100		
146	112859		
148	112860		
150	112861		

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse med formel I



5

hvor:

R1 er valgt fra gruppen bestående af

(a) C(O);

- 10 (b) C(O)-C₁₋₁₄ alkyl-C(O), hvori C₁₋₁₄ alkyl eventuelt er substitueret med hydroksy, C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkenylendioksy, C₁₋₅ alkylamino, eller C₁₋₅ alkylaryl, hvori aryl delen af C₁₋₅ alkylaryl eventuelt er substitueret med C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkylamino, C₁₋₅ alkoksyamino, C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl C(O)OH, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl-C(O)-C₁₋₅ alkyl;

- 15 (c) C₂ til C₁₅ rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substitueret med hydroksy eller alkoksy; og

(d) -C(O)-C₆₋₁₂ arylen-C(O)- hvori arylen eventuelt er substitueret med hydroksy, halogen, nitro eller amino;

a og b er uafhængig 0, 1, 2, 3 eller 4;

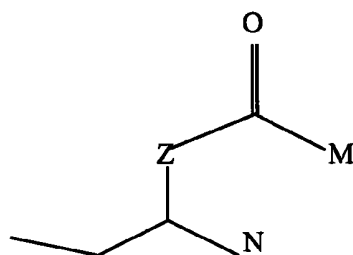
- 20 d, d', d'', e, e' og e'' er uafhængig et helt tal fra 1 til 4;

X¹, X², Y¹ og Y² er uafhængig valgt fra gruppen bestående af null, oxygen, NH og N(C(O)C₁₋₄ alkyl), og N(C₁₋₄ alkyl)₂;

W^1 og W^2 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av karbonyl, metylen, sulfon og sulfoksid;

R^2 og R^5 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av:

- (a) C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksey eller alkoksy;
- (b) C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkenyl eller dialkenyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksey eller alkoksy;
- (c) C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkoksy som eventuelt er substituert med okso, hydroksey eller alkoksy;
- (d) $-NH-C_2$ til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl, hvori alkylgruppen eventuelt er substituert med okso, hydroksey eller alkoksy; og
- (e)



hvor Z er valgt fra gruppen bestående av O og NH , og M og N er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl, alkenyl, alkoksy, acyloksy, alkylamino og acylamino;

R^3 og R^6 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl eller eventuelt substituert med okso eller fluor;

R^4 og R^7 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av $C(O)C_2$ til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl; C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl; C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkoksy; C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkenyl; hvori alkyl-, alkenyl- eller alkoksygruppene uavhengig og eventuelt kan være substituert med hydroksey, fluor eller C_1 til C_5 alkoksy;

G^1 , G^2 , G^3 og G^4 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av oksygen, metylen, amino, tiol, $-NHC(O)-$, og $-N(C(O)C_{1-4} \text{ alkyl})$;

eller G^2R^4 eller G^4R^7 kan sammen være et hydrogenatom eller hydrokseyl;

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

2.

Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at R^1 er valgt fra gruppen bestående av $C(O)$ og $C(O)-C_{1-14} \text{ alkyl}-C(O)$.

3.

Forbindelse ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at R^1 er C(O)-
C₁₋₁₄ alkyl-C(O).

5 4.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at a og b er 2.

5.

10 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at X^1 og Y^1
begge er NH.

6.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at d og e er 1.

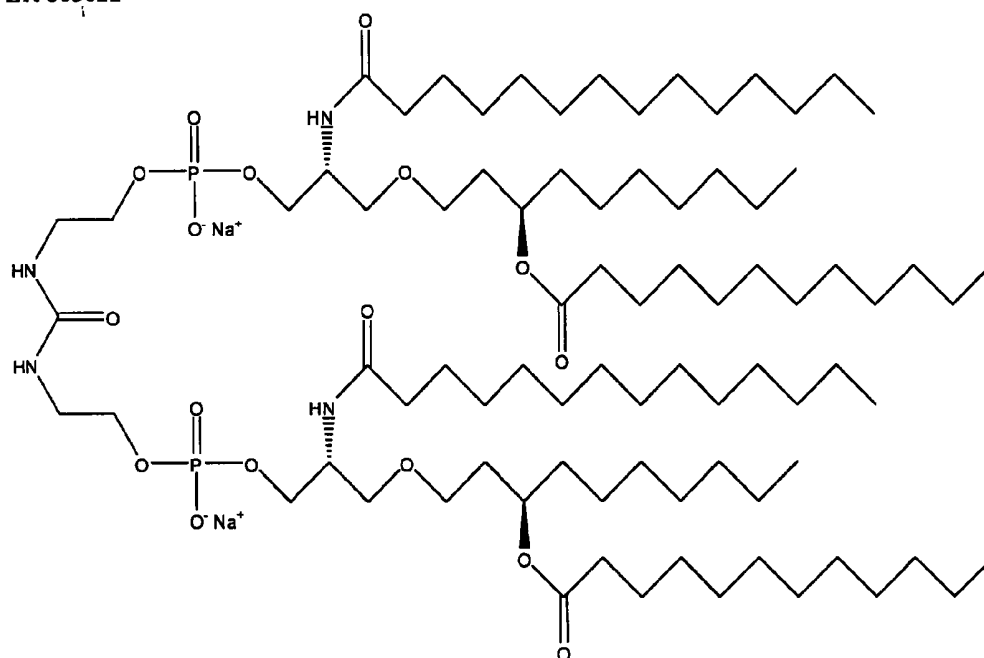
15 7.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at G^2R^4 og
 G^4R^7 begge er hydroksy.

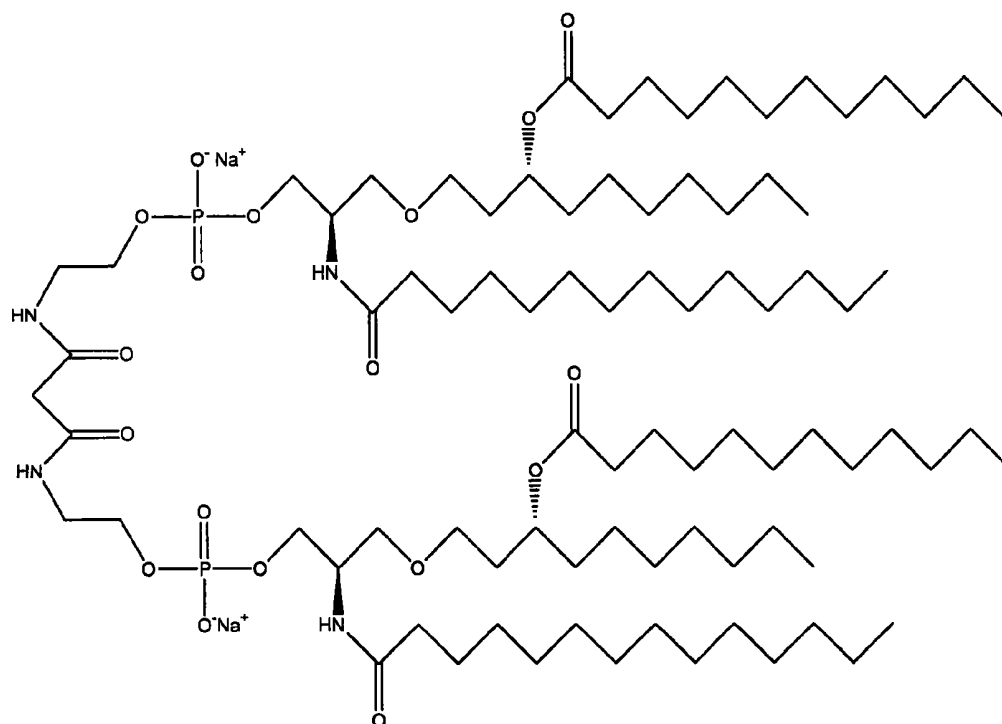
8.

20 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er valgt
fra gruppen bestående av ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057,
ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 og ER804764:

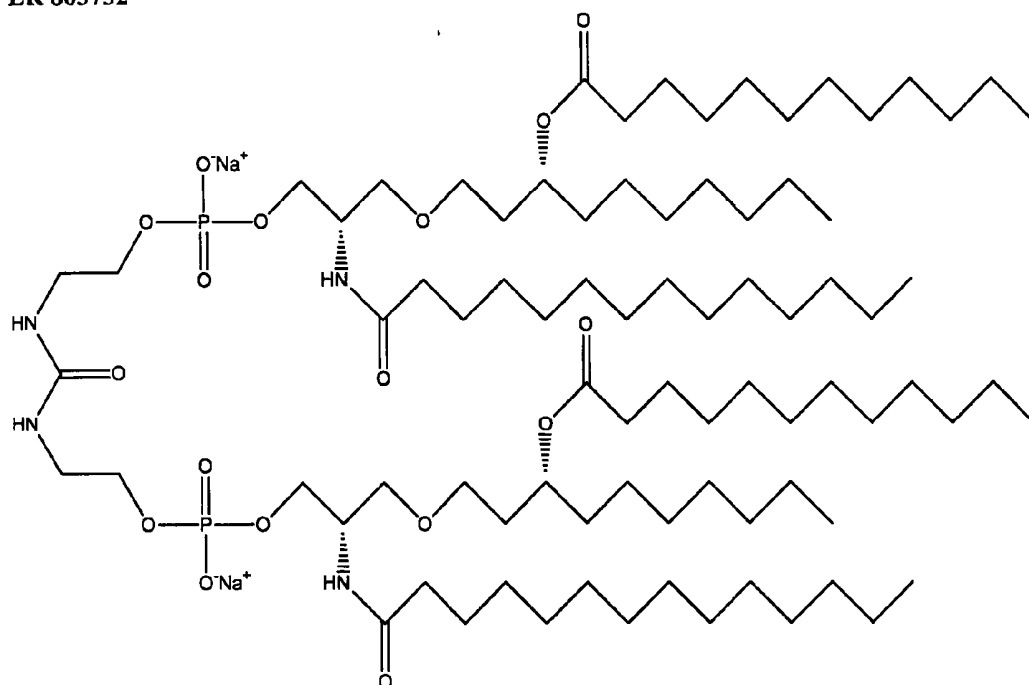
ER 803022



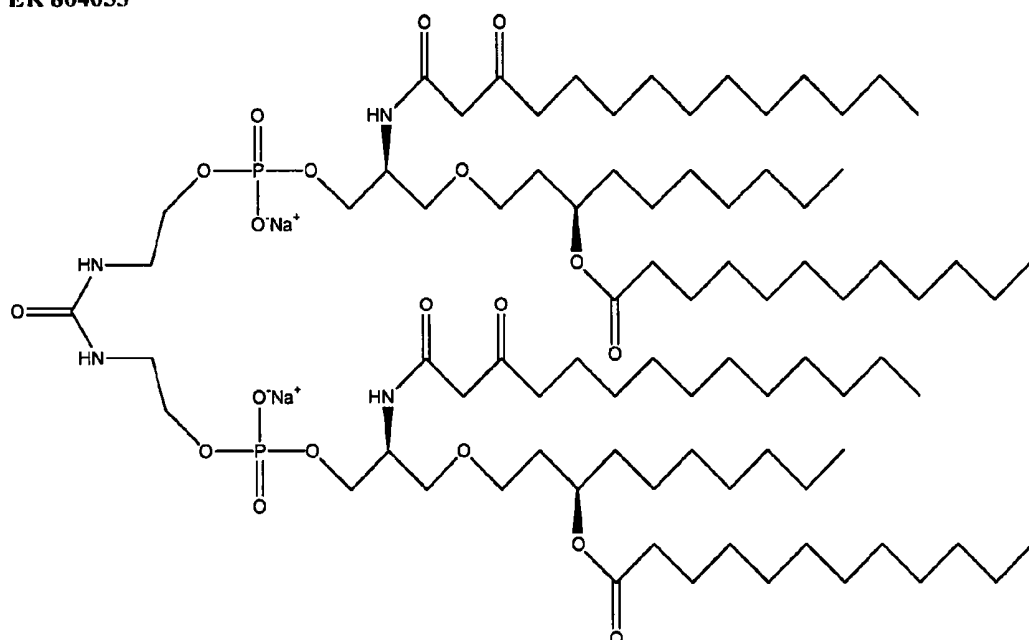
ER 803058



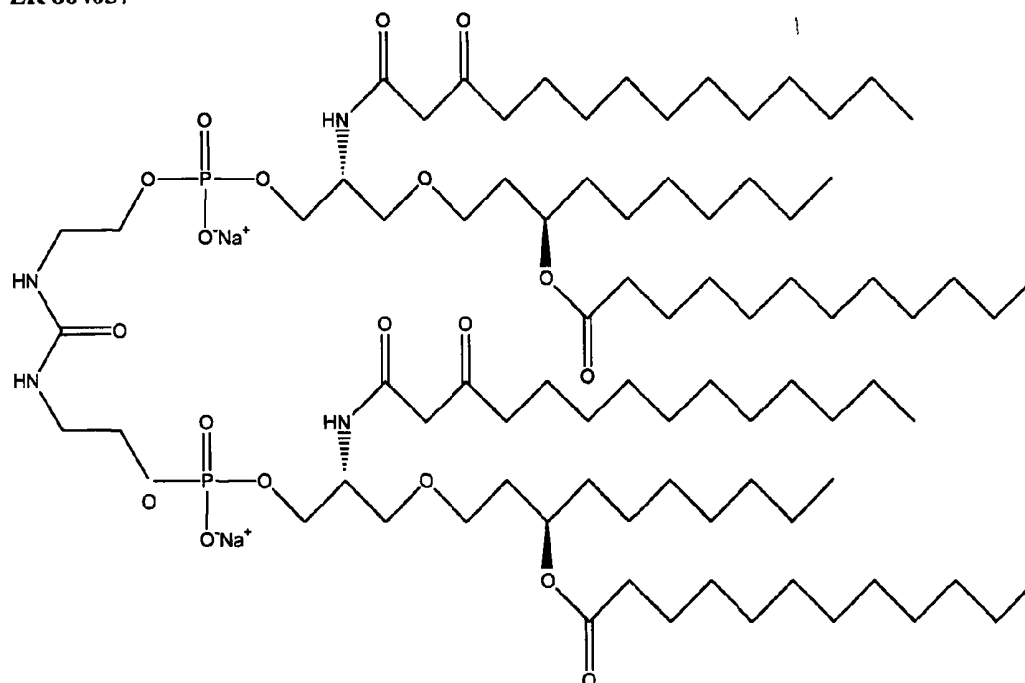
ER 803732



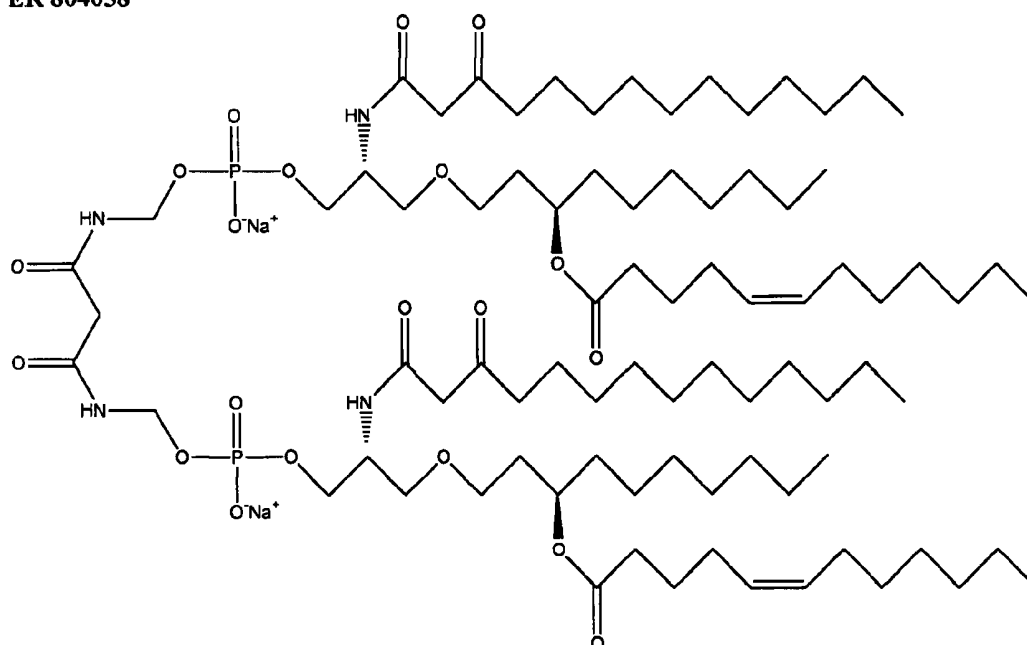
ER 804053



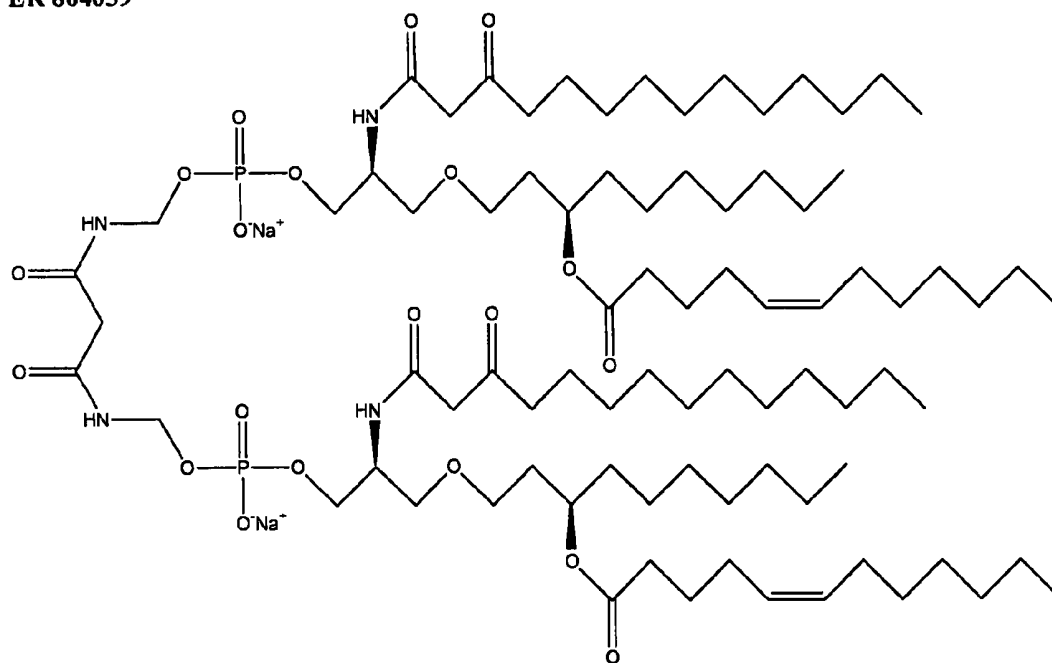
ER 804057



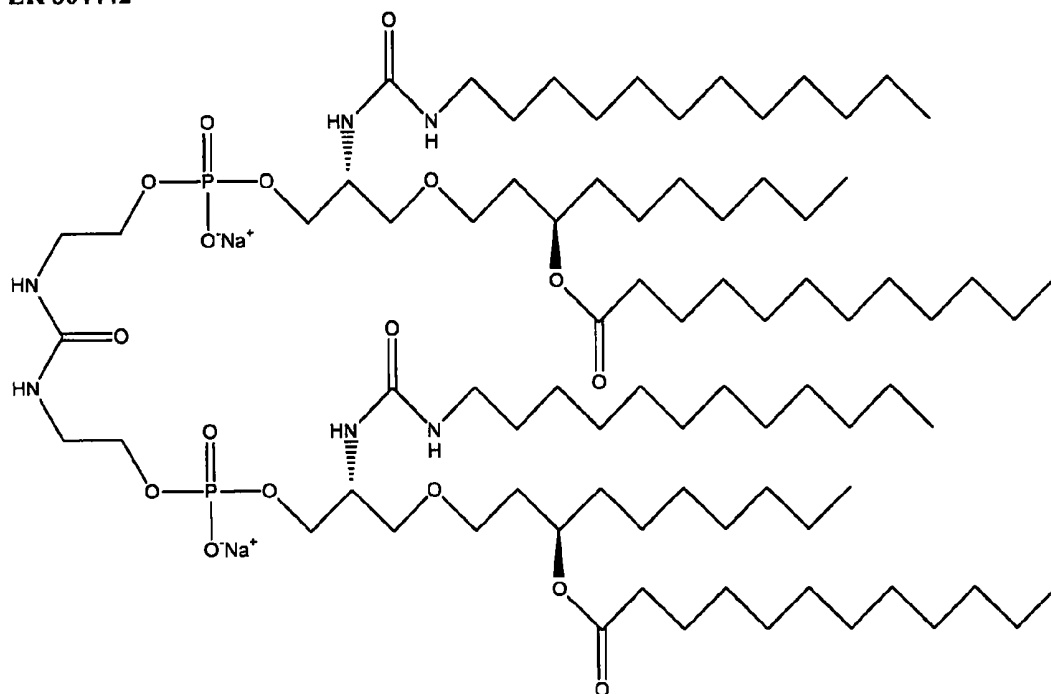
ER 804058



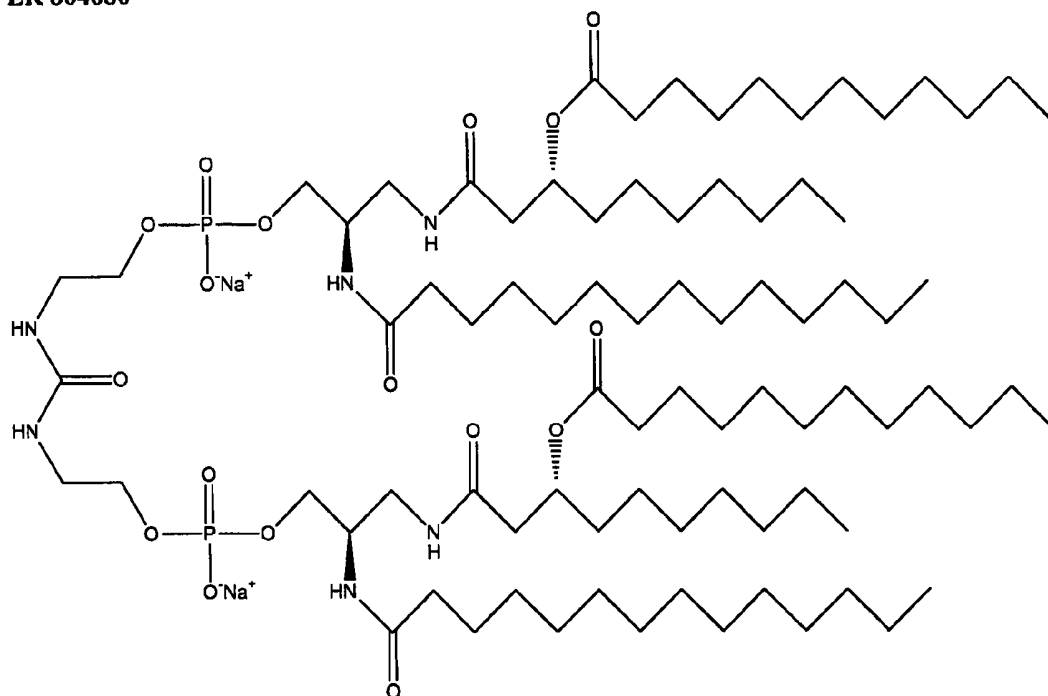
ER 804059



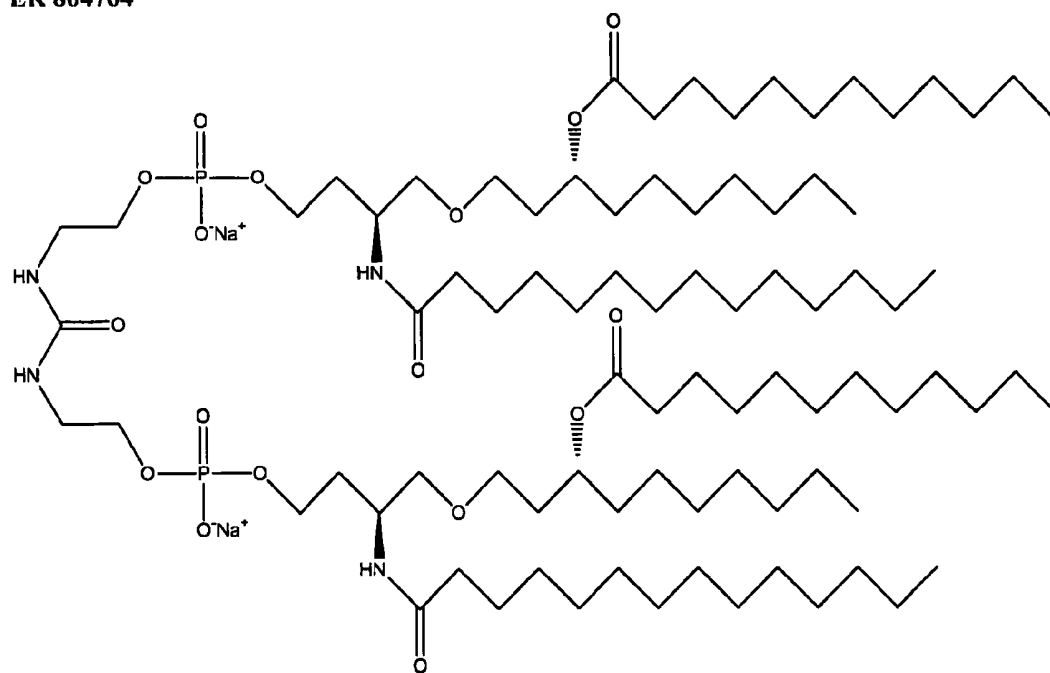
ER 804442



ER 804680

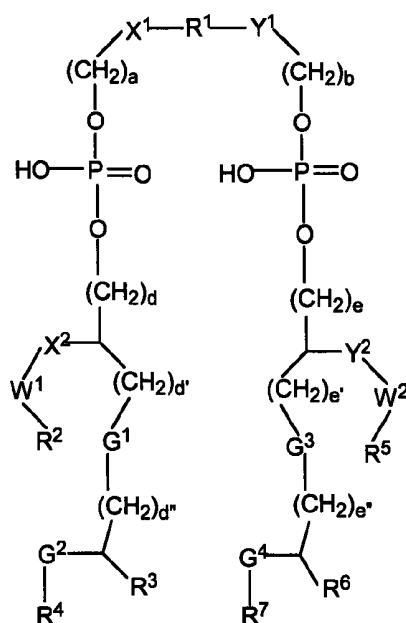


ER 804764



9.

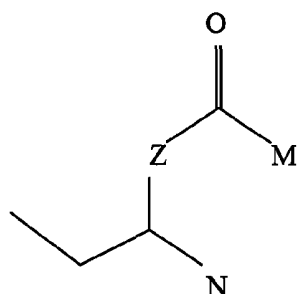
Immunologisk adjuvanssammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d
at den omfatter en forbindelse ved formel I



hvor:

- 5 R^1 er valgt fra gruppen bestående av
(a) C(O);
(b) C(O)-C₁₋₁₄ alkyl-C(O), hvori C₁₋₁₄ alkyl eventuelt er substituert med hydroksy, C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkenylendioksy, C₁₋₅ alkylamino, eller C₁₋₅ alkylaryl, hvori aryl delen av C₁₋₅ alkylaryl eventuelt er substituert med C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkylamino, C₁₋₅ alkoksyamino, C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl C(O)OH, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl-C(O)-C₁₋₅ alkyl;
10 (c) C₂ til C₁₅ rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med hydroksy eller alkoksy; og
(d) -C(O)-C₆₋₁₂ aryl-C(O)- hvori arylen eventuelt er substituert med hydroksy,
15 halogen, nitro eller amino;
a og b er uavhengig 0, 1, 2, 3 eller 4;
d, d', d'', e, e' og e'' er uavhengig et helt tall fra 1 til 4;
X¹, X², Y¹ og Y² er uavhengig valgt fra gruppen bestående av null, oksygen, NH og N(C(O)C₁₋₄ alkyl), og N(C₁₋₄ alkyl)₂;
20 W¹ og W² er uavhengig valgt fra gruppen bestående av karbonyl, metylen, sulfon og sulfoksid;
R² og R⁵ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av:

- (a) C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksey eller alkoksy;
- (b) C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkenyl eller dialkenyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksey eller alkoksy;
- 5 (c) C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkoksy som eventuelt er substituert med okso, hydroksey eller alkoksy;
- (d) -NH-C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl, hvori alkylgruppen eventuelt er substituert med okso, hydroksey eller alkoksy; og
- 10 (e)



hvori Z er valgt fra gruppen bestående av O og NH, og M og N er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl, alkenyl, alkoksy, acyloksy, alkylamino og acylamino;

R³ og R⁶ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl eller eventuelt substituert med okso eller fluor;

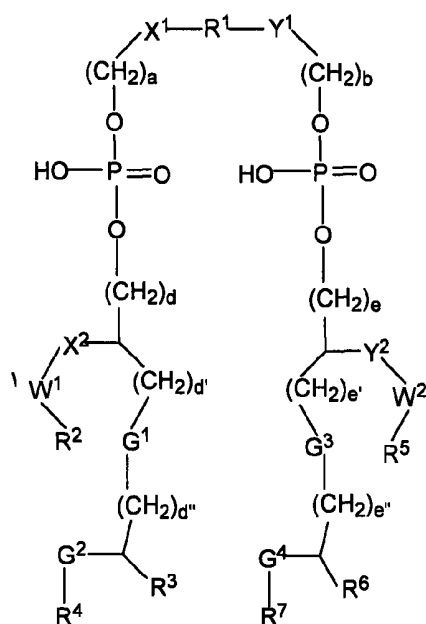
R⁴ og R⁷ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C(O)C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl; C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl; C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkoksy; C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkenyl; hvori alkyl-, alkenyl- eller alkoksygruppene uavhengig og eventuelt kan være substituert med hydroksey, fluor eller C₁ til C₅ alkoksy;

G¹, G², G³ og G⁴ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av oksygen, metylen, amino, tiol, -NHC(O)-, og -N(C(O)C₁₋₄ alkyl);

eller G²R⁴ eller G⁴R⁷ kan sammen være et hydrogenatom eller hydroksyl; eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

10.

Vaksinesammensetning, karakteriseret ved at den omfatter et antigen og en adjuvansforbindelse med formel I



5 hvori:

R^1 er valgt fra gruppen bestående av

(a) C(O);

(b) C(O)-C₁₋₁₄ alkyl-C(O), hvori C₁₋₁₄ alkyl eventuelt er substituert med hydroksy, C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkenylendioksy, C₁₋₅ alkylamino, eller C₁₋₅ alkylaryl, hvori aryl delen av C₁₋₅ alkylaryl eventuelt er substituert med C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkylamino, C₁₋₅ alkoksyamino, C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl C(O)OH, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl-C(O)-C₁₋₅ alkyl;

(c) C₂ til C₁₅ rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med hydroksy eller alkoksy; og

15 (d) -C(O)-C₆₋₁₂ aryl-C(O)- hvori aryl eventuelt er substituert med hydroksy, halogen, nitro eller amino;

a og b er uavhengig 0, 1, 2, 3 eller 4;

d, d', d'', e, e' og e'' er uavhengig et helt tall fra 1 til 4;

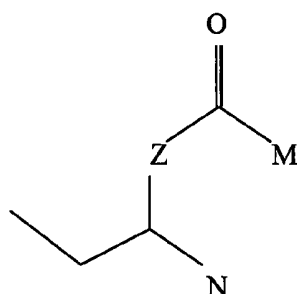
X¹, X², Y¹ og Y² er uavhengig valgt fra gruppen bestående av null, oksygen, NH og

20 N(C(O)C₁₋₄ alkyl), og N(C₁₋₄ alkyl)₂;

W¹ og W² er uavhengig valgt fra gruppen bestående av karbonyl, metylen, sulfon og sulfoksid;

R² og R⁵ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av:

- (a) C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med okso, hydrokso eller alkokso;
- (b) C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkenyl eller dialkenyl som eventuelt er substituert med okso, hydrokso eller alkokso;
- 5 (c) C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkokso som eventuelt er substituert med okso, hydrokso eller alkokso;
- (d) -NH-C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl, hvori alkylgruppen eventuelt er substituert med okso, hydrokso eller alkokso; og
- 10 (e)



hvor Z er valgt fra gruppen bestående av O og NH, og M og N er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl, alkenyl, alkokso, acyloksy, alkylamino og acylamino;

R³ og R⁶ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl eller eventuelt substituert med okso eller fluor;

R⁴ og R⁷ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C(O)C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl; C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkyl; C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkokso; C₂ til C₂₀ rettkjedet eller forgrenet alkenyl; hvori alkyl-, alkenyl- eller alkoksoygruppene uavhengig og eventuelt kan være substituert med hydrokso, fluor eller C₁ til C₅ alkokso;

G¹, G², G³ og G⁴ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av oksygen, metylen, amino, tiol, -NHC(O)-, og -N(C(O)C₁₋₄ alkyl);

eller G²R⁴ eller G⁴R⁷ kan sammen være et hydrogenatom eller hydroksoyl; eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

11.

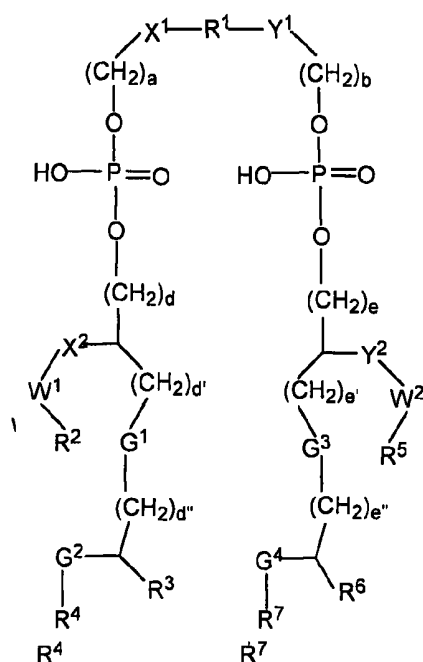
Sammensetning ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d a t adjuvansmiddelet og antigenet er kovalent bundet gjennom en amino-, karbonyl-, hydroksoyl- eller fosfatdel av adjuvansmiddelet.

12.

Sammensetning ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at R^1 er C(O) eller C(O)-C₃₋₁₄ alkyl-C(O), og at adjuvansmiddelet og antigenet er kovalent bundet til en karbonyldel av nevnte C₁ karbonyl i nevnte C(O) eller C(O)-C₃₋₁₄ alkyl-C(O).

5 13.

Anvendelse av en effektiv mengde av et antigen og en effektiv mengde av en adjuvans-forbindelse med formel I



10

hvor:

R^1 er valgt fra gruppen bestående av

(a) C(O);

(b) C(O)-C₁₋₁₄ alkyl-C(O), hvori C₁₋₁₄ alkyl eventuelt er substituert med hydroksy, C₁₋₅

15 alkoksy, C₁₋₅ alkenylendioksy, C₁₋₅ alkylamino, eller C₁₋₅ alkylaryl, hvori aryl delen av C₁₋₅ alkylaryl eventuelt er substituert med C₁₋₅ alkoksy, C₁₋₅ alkylamino, C₁₋₅ alkoksyamino, C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C₁₋₅ alkoksy, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl C(O)OH, -O-C₁₋₅ alkylamino-C(O)-C₁₋₅ alkyl-C(O)-C₁₋₅ alkyl;

(c) C₂ til C₁₅ rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med hydroksy

20 eller alkoksy; og

(d) -C(O)-C₆₋₁₂ aryl-C(O)- hvori aryl eventuelt er substituert med hydroksy, halogen, nitro eller amino;

a og b er uavhengig 0, 1, 2, 3 eller 4;

d, d', d'', e, e' og e'' er uavhengig et helt tall fra 1 til 4;

X^1 , X^2 , Y^1 og Y^2 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av null, oksygen, NH og $N(C(O)C_{1-4} \text{ alkyl})$, og $N(C_{1-4} \text{ alkyl})_2$;

W^1 og W^2 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av karbonyl, metylen, sulfon og sulfoksid;

5 R^2 og R^5 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av:

(a) C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy;

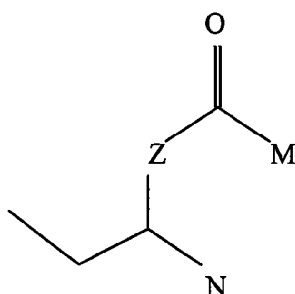
(b) C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkenyl eller dialkenyl som eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy;

10 (c) C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkoksy som eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy;

(d) $-NH-C_2$ til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl, hvori alkylgruppen eventuelt er substituert med okso, hydroksy eller alkoksy; og

(e)

15



20

hvori Z er valgt fra gruppen bestående av O og NH, og M og N er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl, alkenyl, alkoksy, acyloksy, alkylamino og acylamino;

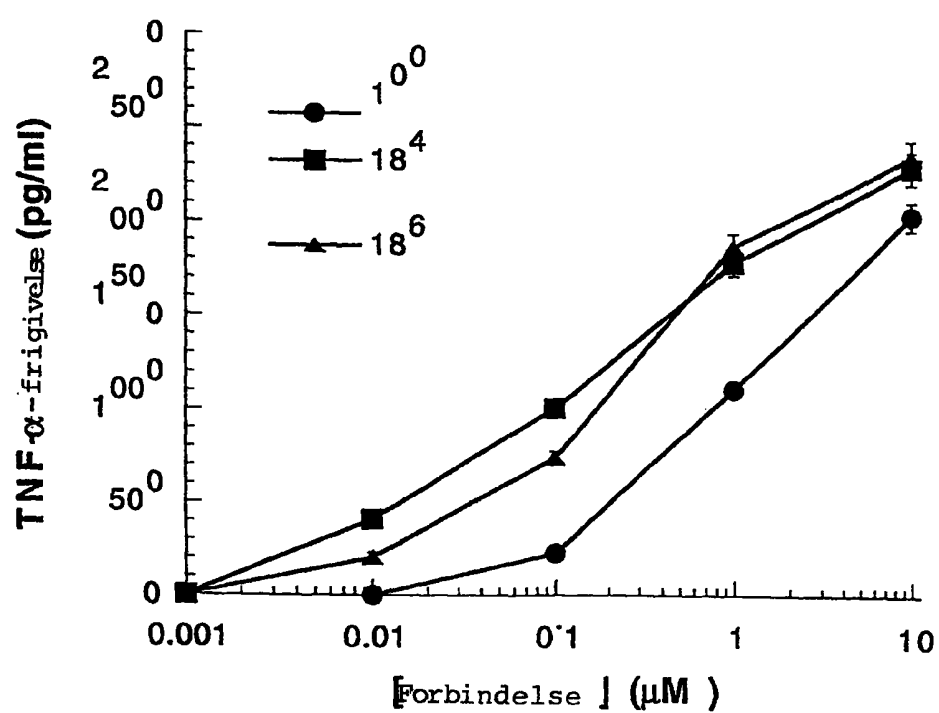
25 R^3 og R^6 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl eller eventuelt substituert med okso eller fluor;

R^4 og R^7 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av $C(O)C_2$ til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl eller alkenyl; C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkyl; C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkoksy; C_2 til C_{20} rettkjedet eller forgrenet alkenyl; hvori alkyl-, alkenyl- eller alkoksygruppene uavhengig og eventuelt kan være substituert med hydroksy, fluor eller C_1 til C_5 alkoksy;

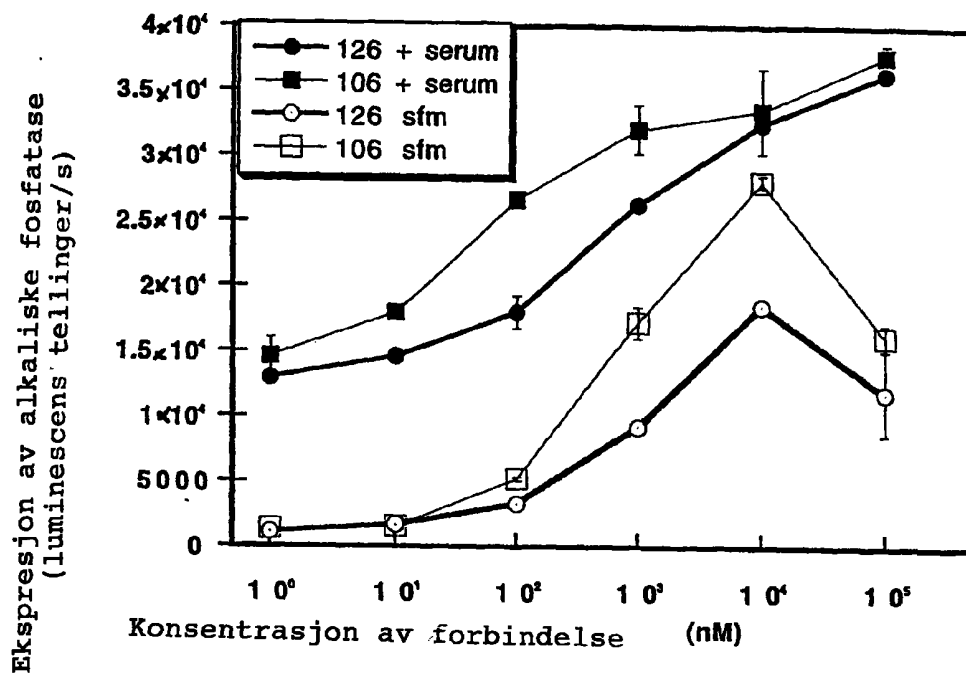
30 G^1 , G^2 , G^3 og G^4 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av oksygen, metylen, amino, tiol, $-NHC(O)-$, og $-N(C(O)C_{1-4} \text{ alkyl})$;
 eller G^2R^4 eller G^4R^7 kan sammen være et hydrogenatom eller hydroksyl;
 35 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav,

for fremstilling av et medikament for å stimulere en immunrespons mot nevnte antigen.

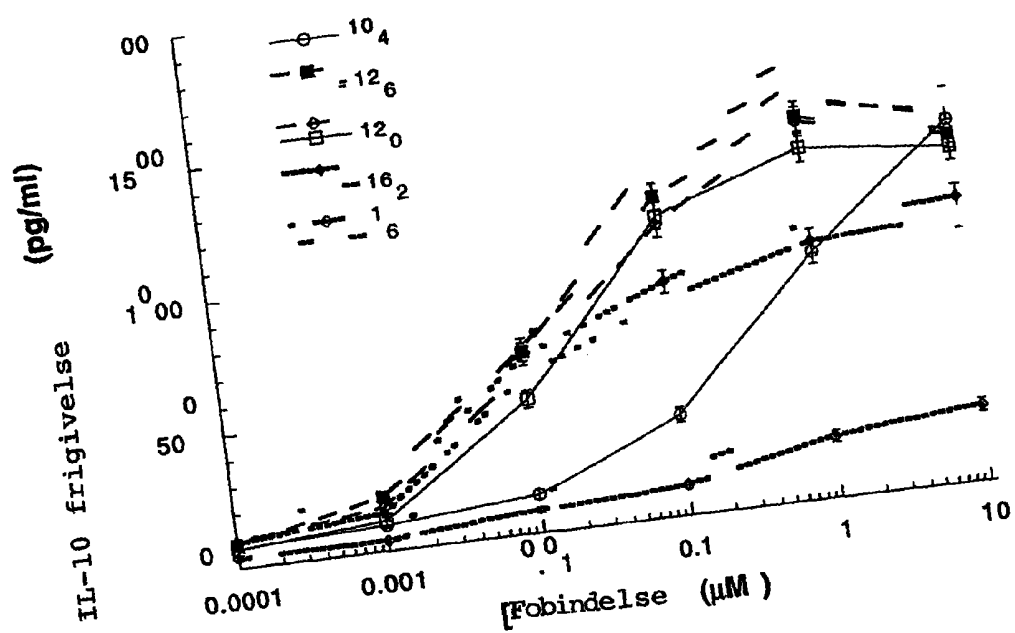
Figur 1.



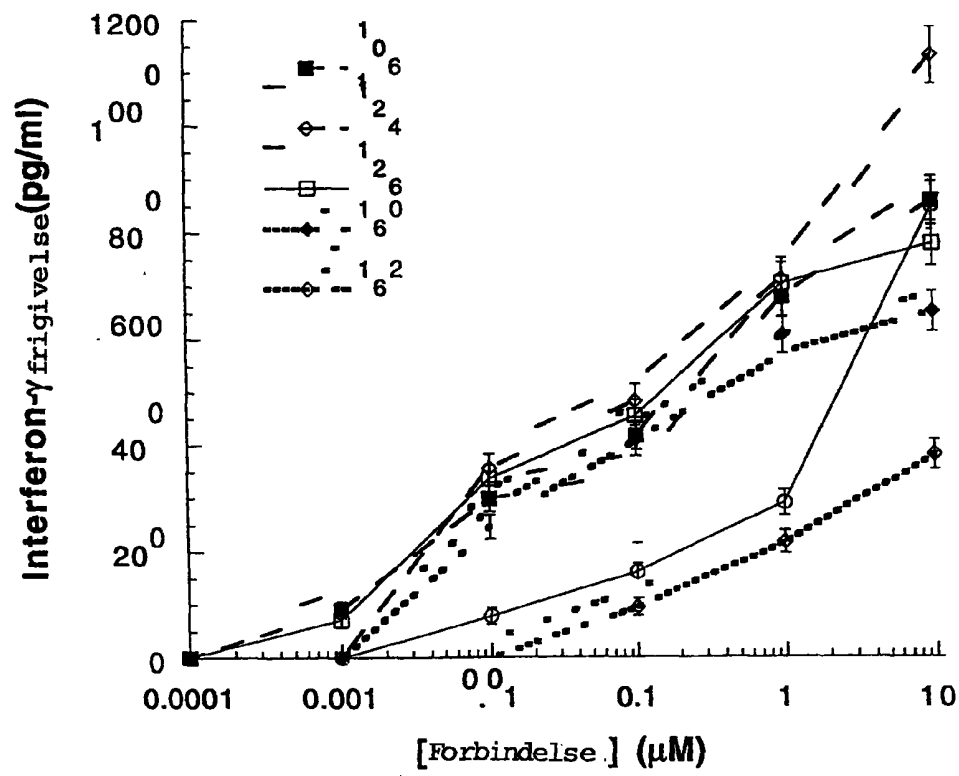
Figur 2.



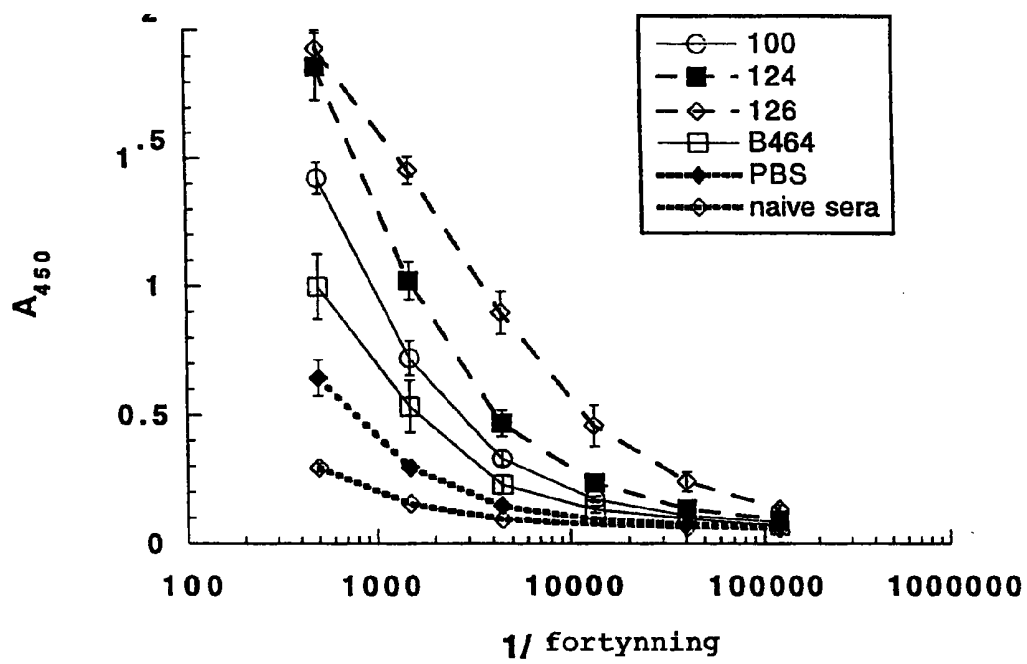
Figur 3.



Figur 4.



Figur 5.



Figur 6.

