(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 347 428**

(51) Int. Cl.:

C07F 9/10 (2006.01) ***A61K 39/39*** (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) ***C07F 9/09*** (2006.01)
C07F 9/655 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04009656 .2**
(96) Fecha de presentación : **01.02.2000**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1439184**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2004**

(54) Título: **Compuestos coadyuvantes inmunológicos.**

(30) Prioridad: **01.02.1999 US 118131 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2010

(73) Titular/es: **EISAI R&D MANAGEMENT Co., Ltd.**
6-10, Koishikawa 4-chome
Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, JP

(72) Inventor/es: **Hawkins, Lynn D.;**
Ishizaka, Sally T.;
Lewis, Michael;
McGuinness, Pamela;
Nault, Anneliese;
Rose, Jeffrey y
Rossignol, Daniel P.

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Compuestos coadyuvantes inmunológicos.

Las vacunas han demostrado ser métodos satisfactorios muy aceptables para prevenir enfermedades infecciosas. Son baratas y no inducen resistencia del patógeno objetivo a los antibióticos ni afectan a la flora normal presente en el hospedante. En muchos casos, tal como cuando se induce inmunidad antivírica, las vacunas pueden prevenir una enfermedad para la cual no hay disponibles tratamientos curativos o de mejora disponibles.

Las vacunas funcionan provocando al sistema inmunitario para que monte una respuesta frente a un agente, o antígeno, típicamente un organismo infeccioso o una parte del mismo, que es introducida en el cuerpo en una forma no infecciosa o no patógena. Una vez que se ha "cebado" o sensibilizado al sistema inmunitario frente al organismo, la posterior exposición del sistema inmunitario a este organismo como un patógeno infeccioso da como resultado una respuesta inmunitaria rápida y fuerte que destruye el patógeno antes de que pueda multiplicarse e infectar suficientes células en el organismo hospedante para causar síntomas de enfermedad.

El agente, o antígeno, usado para cebar el sistema inmunitario puede ser el organismo entero en un estado menos infeccioso, conocido como un organismo atenuado, o en algunos casos, componentes del organismo tales como hidratos de carbono, proteínas o péptidos que representan diferentes componentes estructurales del organismo.

En muchos casos, es necesario potenciar la respuesta inmunitaria frente a los antígenos presentes en una vacuna con el fin de estimular el sistema inmunitario en un grado suficiente para hacer que una vacuna sea eficaz, es decir, para conferir inmunidad. Muchas proteínas y la mayoría de los antígenos peptídicos e hidratos de carbono administrados solos, no provocan una respuesta de anticuerpos suficiente para conferir inmunidad. Es necesario que dichos antígenos sean presentados al sistema inmunitario de forma de que sean reconocidos como extraños y provoquen una respuesta inmunitaria. Para este fin, se han ideado aditivos (adyuvantes) que inmovilizan los antígenos y estimulan la respuesta inmunitaria.

El adyuvante mejor conocido, el adyuvante completo de Freund, consiste en una mezcla de micobacterias en una emulsión de aceite/agua. El adyuvante de Freund funciona de dos formas: primero potenciando la inmunidad mediada por células y humoral, y segundo bloqueando la dispersión rápida de la exposición al antígeno (el "efecto depósito"). Sin embargo, debido a las frecuentes reacciones inmunológicas y fisiológicas tóxicas a este material, el adyuvante de Freund no se puede usar en seres humanos.

Otra molécula que se ha mostrado que tiene actividad inmunoestimuladora o de adyuvante es la endotoxina, también conocida como lipopolisacárido (LPS). El LPS estimula al sistema inmunitario provocando una respuesta inmunitaria "innata" - una respuesta que ha evolucionado para permitir que un organismo reconozca la endotoxina (y la bacteria invasora de la cual es un componente) sin necesidad de haber sido expuesto al organismo previamente. Aunque el LPS es demasiado tóxico para ser un adyuvante viable, se están ensayando moléculas que están estructuralmente relacionadas con la endotoxina, tales como el monofosforil-lípido A ("MPL") como adyuvantes en ensayos clínicos. Sin embargo, actualmente el único adyuvante aprobado por la FDA para usar en seres humanos son las sales de aluminio (Alum) que se usan para "depositar" antígenos por precipitación de los antígenos. El Alum también estimula la respuesta inmunitaria frente a los antígenos.

Por lo tanto, se reconoce en la técnica la necesidad de compuestos que se puedan coadministrar con antígenos con el fin de estimular el sistema inmunitario para generar una respuesta de anticuerpos más fuerte frente al antígeno que la que se vería si el antígeno se inyectara solo o con Alum.

La presente invención se dirige a compuestos nuevos que funcionan como adyuvantes inmunológicos cuando se coadministran con antígenos tales como vacunas para enfermedades bacterianas y víricas.

La figura 1 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo *in vitro* de la inducción de la liberación de citoquinas por los compuestos 100 ó 186 de la invención y del 184.

La figura 2 es una gráfica que muestra la estimulación de la expresión de la fosfatasa alcalina a partir de una construcción indicadora inducible con el promotor TNF (TNF-PLAP) en células THP-1 por los compuestos 106 y 126 en ausencia y presencia de suero al 10%.

La figura 3 es una gráfica que muestra la estimulación de la liberación de IL-10 de esplenocitos de ratón normales por los compuestos 104, 106, 124, 126 y 160 de la invención y por el 162.

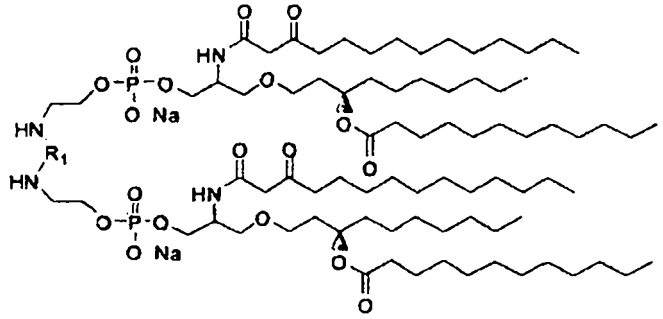
La figura 4 es una gráfica que muestra la estimulación de la liberación de interferón gamma de esplenocitos de ratón normales por los compuestos 104, 106, 124, 126 y 160 de la invención y por el 162.

La figura 5 es una gráfica que ilustra los resultados de los análisis de titulación de suero para determinar las cantidades de anticuerpo que son producidas en respuesta a la hemocianina de la lapa californiana en ausencia y presencia de los compuestos 100, 124 y 126 de la invención.

La figura 6 es una gráfica que ilustra los resultados de los análisis de titulación de suero para determinar las cantidades de anticuerpo producidas en respuesta al toxoide tetánico en ausencia y presencia de los compuestos 100, 126 y 160 de la invención y por el 116 y 184.

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. En las figuras 1 a 6, la referencia a los compuestos fuera del alcance de las reivindicaciones adjuntas se proporciona solo con propósitos ilustrativos.

La presente invención se dirige en parte a nuevos compuestos de fórmula 1

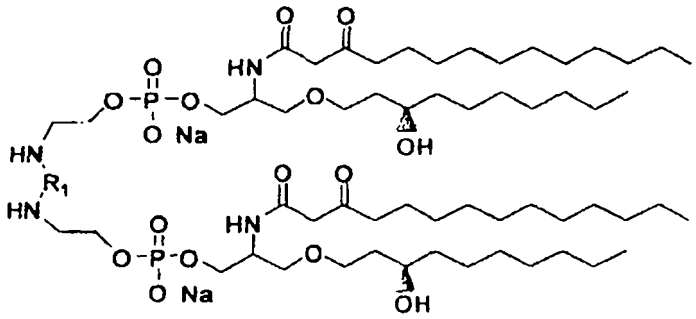


(I)

en la que:

R^1 se selecciona del grupo que consiste en -C(O)-, $-C(O)(CH_2)_2-C(O)$, y $-C(O)(CH_2)_4-C(O)$, preferiblemente en la que R^1 es -C(O)-.

La invención se dirige además a los compuestos de fórmula (II):

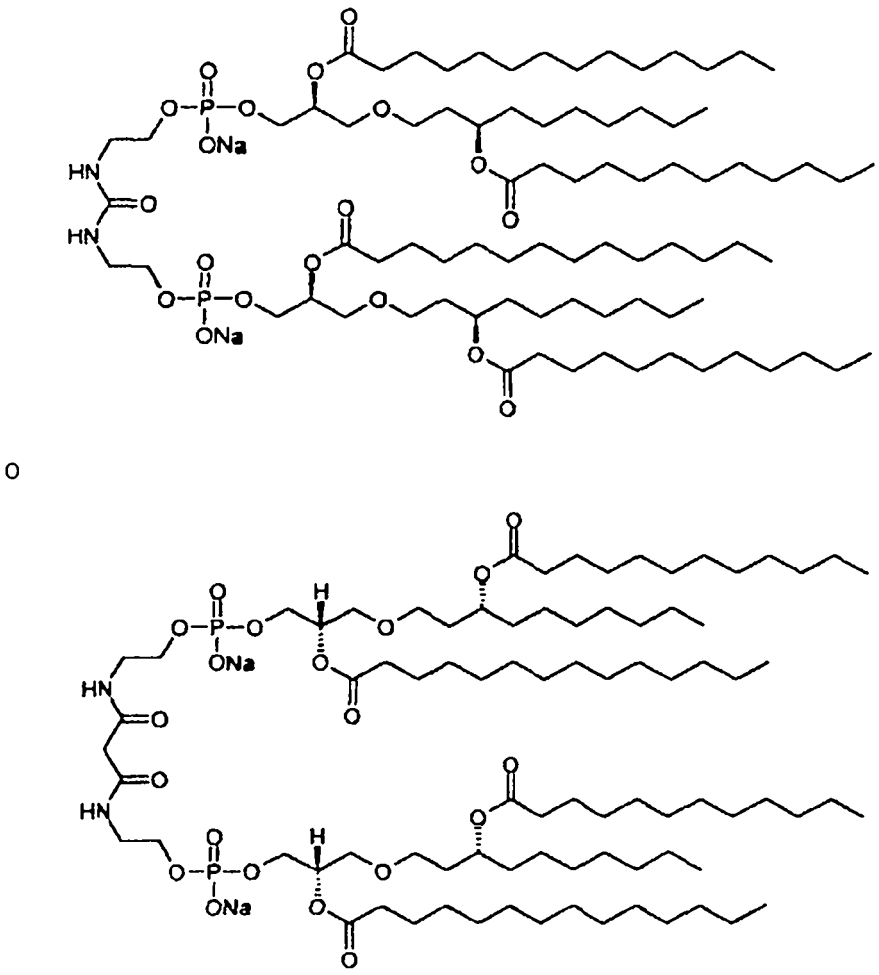


(II)

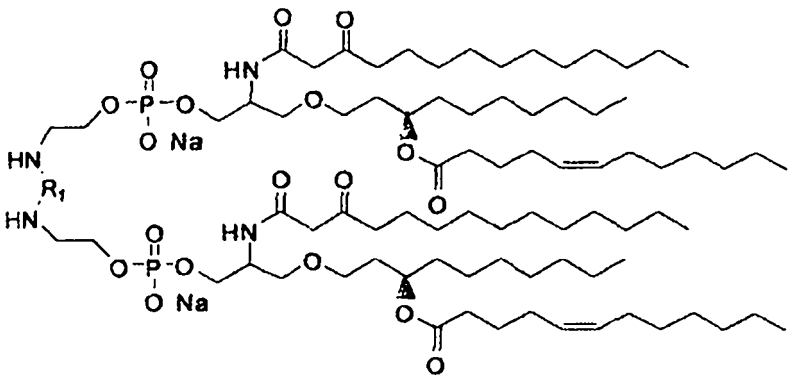
en la que:

R^1 se selecciona del grupo que consiste en -C(O)- y $-C(O)(CH_2)_2-C(O)$.

La invención se dirige además a compuestos de fórmula



La invención se dirige además a compuestos de fórmula (V):

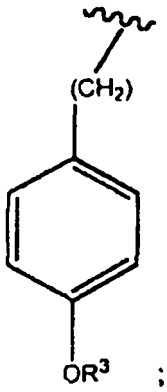


(V)

en la que:

R^1 se selecciona del grupo que consiste en -C(O)-, -C(O)(CH_2)-C(O), -C(O)$(CH_2)_2$-C(O), -C(O)$(CH_2)_4$-C(O), -C(O)$(CH_2)_6$-C(O), -C(O)$(CH_2)_8$-C(O), y -C(O)(CH(R^2))-C(O);

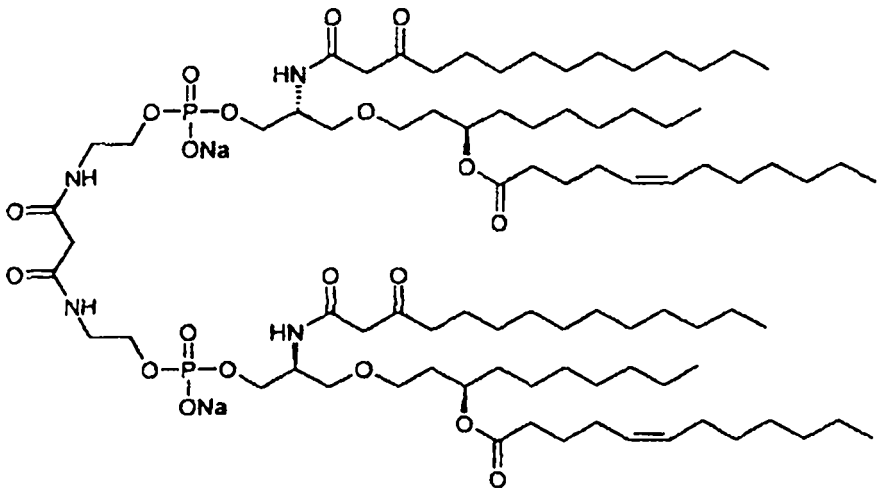
R^2 es



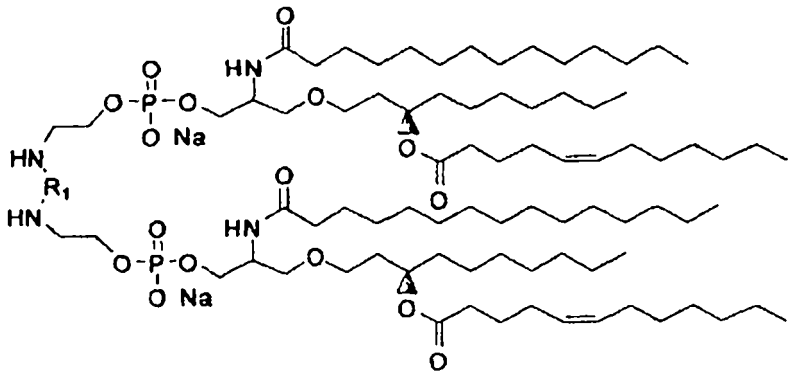
;

R^3 se selecciona del grupo que consiste en -H y $-(CH_2)_2NHBoc$.

El compuesto de fórmula (V) puede ser un compuesto de fórmula:



La invención se dirige además a los compuestos de fórmula (VI):

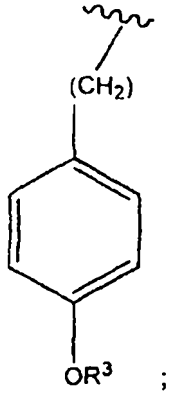


(VI)

en la que:

R^1 se selecciona del grupo que consiste en -C(O)-, $-C(O)(CH_2)$-C(O), $-C(O)(CH(R^2))$-C(O)-;

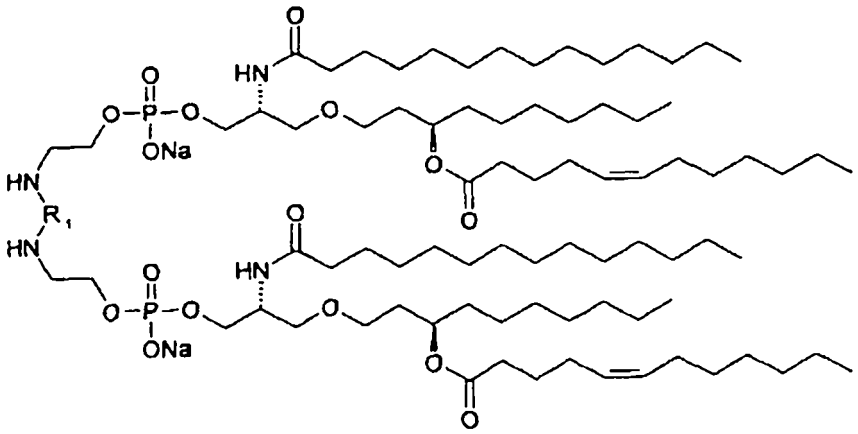
R^2 se selecciona del grupo que consiste en $-(CH_2)_4NHBoc$ y



;

R^3 se selecciona del grupo que consiste en $-(CH_2)_2NHBoc$, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_2NH(CO)(CH_2)_4C(O)OH$.

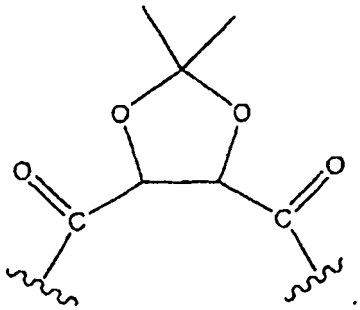
La invención se dirige además a compuestos de fórmula (VI):



(VI)

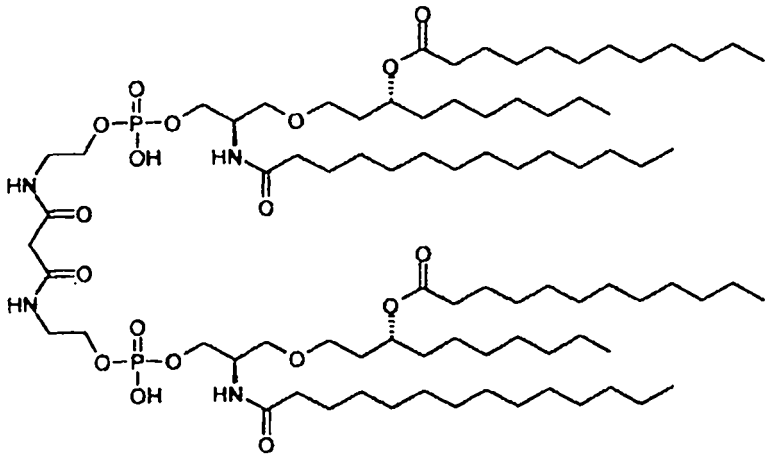
en la que:

R^1 es

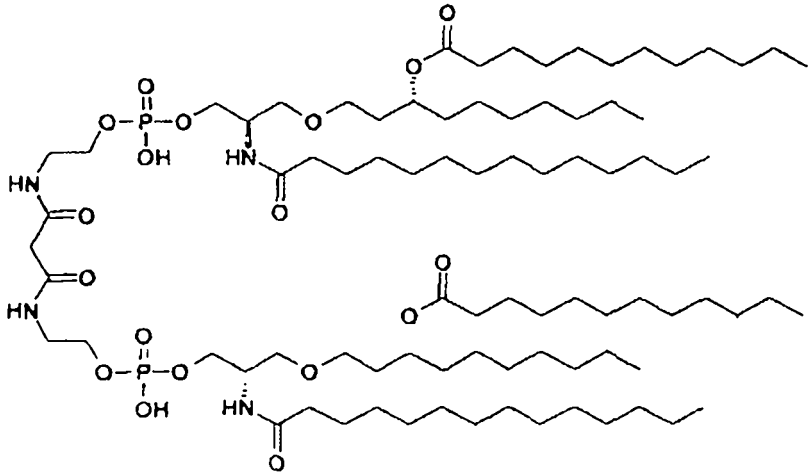


.

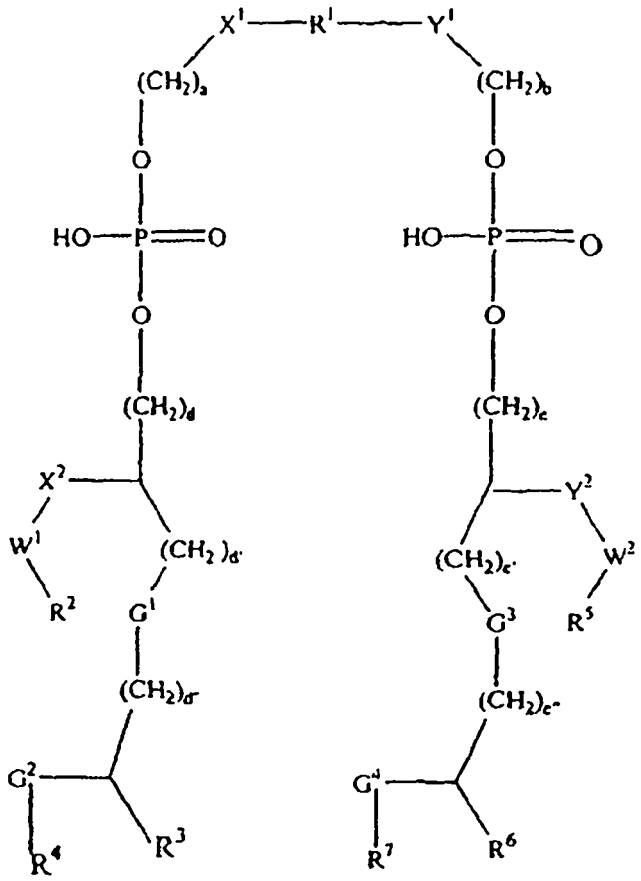
La invención se dirige además a un compuesto seleccionado del grupo ilustrado a continuación:



y



Estos compuestos entran en la siguiente definición general:



en la que:

R^1 se selecciona del grupo que consiste en

(a) C(O);

(b) C(O)-alquil(C_{1-14})-C(O), en el que dicho alquilo C_{1-14} está opcionalmente sustituido con hidroxi, alcoxi C_{1-5}, alquilendioxi C_{1-5}, alquil(C_{1-5})amino, o alquil(C_{1-5})-arilo, en el que dicho resto arilo de dicho alquil(C_{1-5})-arilo está opcionalmente sustituido con alcoxi C_{1-5}, alquil(C_{1-5})amino, alcoxi(C_{1-5})-amino, alquil(C_{1-5})-amino-alcoxi(C_{1-5}), -O-alquil(C_{1-5})-amino-alcoxi(C_{1-5}), -O-alquil(C_{1-5})-amino-C(O)–alquil(C_{1-5})C(O)OH, -O-alquil(C_{1-5})amino-C(O)-alquil (C_{1-5})-C(O)-alquilo(C_{1-5});

a y b son 2;

d, d', d", e, e' y e" son independientemente un número entero de 1 a 4;

X^1 e Y^1 son NH;

X^2 e Y^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en nada, oxígeno, NH y N(C(O)-alquilo($C_{1\cdot4}$)), y N (alquilo(C_{1-4}))$_2$;

W^1 y W^2 son carbonilo;

R^2 y R^5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en:

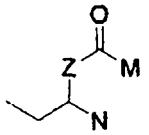
(a) alquilo de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20} que está opcionalmente sustituido con oxo, hidroxi o alcoxi,

(b) alquenilo o dialquenilo de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20} que está opcionalmente sustituido con oxo, hidroxi o alcoxi;

(c) alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20} que está opcionalmente sustituido con oxo, hidroxi o alcoxi;

(d) -NH-alquilo de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20}, en el que dicho grupo alquilo está opcionalmente sustituido con oxo, hidroxi o alcoxi; y

(e)



en el que Z se selecciona del grupo que consiste en O y NH, y M y N se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alcoxi, aciloxi, alquilamino y acilamino de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20}; R^3 y R^6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo o alquenilo de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20} opcionalmente sustituido con oxo o fluoro;

R^4 y R^7 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C(O)-alquilo o alquenilo de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20}; alquilo de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20}; alcoxi de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20}; alquenilo de cadena lineal o cadena ramificada de C_2 a C_{20}; en los que dichos grupos alquilo, alquenilo o alcoxi pueden estar independientemente y opcionalmente sustituidos con hidroxi, fluoro o alcoxi de C_1 a C_5;

G^1, G^2, G^3 y G^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en oxígeno, metileno, amino, tiol, -NHC(O)- y -N(C(O)-alquilo(C_{1-4}))-;

o G^2R^4 o G^4R^7 juntos pueden ser un átomo de hidrógeno o hidroxilo;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

También se describen composiciones inmunoestimuladoras nuevas que incluyen un antígeno y una formulación de adyuvante inmunológica de la invención como se ha descrito antes.

También se describen métodos para la inmunización de un animal por coadministración de un compuesto de la invención o una formulación adyuvante de la invención con un antígeno frente al que se va a inmunizar el animal.

Definiciones

Carbonilo, como se usa en esta memoria, es un resto (C=O).

Dicarbonilo, como se usa en esta memoria, es un resto con la estructura (C=O)-alquil-(C=O) o (C=O)-aril-(C=O), que está unido a una molécula por los átomos de carbono de ambos restos carbonilo terminales.

Oxo, como se usa en esta memoria, es un grupo =O.

Éster de alquilo, como se usa en esta memoria, es un resto con la estructura O-(C=O)-alquilo, que está unido a una molécula por el oxígeno que no tiene doble enlace del grupo éster.

Éster de alquenilo, como se usa en esta memoria, es un resto con la estructura O-(C=O)-cadena de carbono, en el que la cadena de carbono contiene un doble enlace carbono-carbono, que está unido a una molécula por el oxígeno que no tiene doble enlace del grupo éster.

El término “alquileno” significa un grupo hidrocarburo alquilo bivalente de cadena lineal o ramificada. El término “alquenileno” significa un grupo hidrocarburo bivalente de cadena lineal o ramificada que tiene un solo doble enlace carbono-carbono.

El término “dialquenileno” significa un grupo hidrocarburo bivalente insaturado de cadena lineal o cadena ramificada que tiene dos dobles enlaces carbono-carbono.

El término “arileno” se refiere a un grupo aromático bivalente.

La abreviatura “Boc” como se usa en esta memoria, significa t-butiloxicarbonilo.

Métodos sintéticos generales

1. *Síntesis de compuestos diamida*

En general, un 2-amino-1,3-dihidroxipropano o (±)-serinol se transforma en el compuesto 2-azido por reacción con trifluorometanosulfonilazida seguido de protección en forma del per-acetato para la fácil manipulación. El compuesto resultante se desacetila, seguido de reacción con un alcohol primario activado de forma adecuada de un resto diol. El resto de alcohol primario del producto de esta reacción después se protege, p. ej., usando TBDPSCl, seguido de reacción con fosgeno y después alcohol alílico, para dar un diol completamente protegido. El diol protegido después se trata para escindir el grupo protector del alcohol primario. El alcohol no protegido se hace reaccionar con un reactivo de fosforilación funcionalizado de forma adecuada de fórmula (11) como se indica en los ejemplos, para formar un compuesto de éster de fosfato. El resto azido del producto se reduce, y después se hace reaccionar con un acil-ácido activado para formar una amida. La amina terminal protegida en el fosfato funcionalizado se desprotege, y posteriormente se hace reaccionar con un fosgeno o un ácido dicarboxílico en presencia de un agente deshidratante, tal como EDC. Los grupos fosfato del compuesto resultante después se desprotegen, dando una amida racémica.

2. *Síntesis de los compuestos diamida quirales de tipo 1*

En general, el éster de un aminoácido quiral con la estructura deseada se protege con un éster bencimidato. El compuesto protegido se hace reaccionar con un agente de reducción, p. ej., DIBAL o similar, para reducir el resto ácido del aminoácido a un alcohol. El compuesto alcohol resultante se hace reaccionar con un alcohol primario de un resto diol activado de forma adecuada, seguido de la escisión del grupo protector bencimidato, dando un aminodiol. Después, el diol se hace reaccionar con un cloruro de ácido adecuado para dar una diol-amida.

Después, la diol-amida se hace reaccionar con un reactivo de fosforilación funcionalizado de forma adecuada en el grupo hidroxi primario libre. El compuesto resultante se esterifica en el grupo alcohol secundario con un resto acilo adecuado. Después, el grupo N-BOC se escinde del grupo amino introducido por el reactivo de fosforilación (11), dando un compuesto éster de fosfato con una amina primaria libre. Después, este producto se hace reaccionar con fosgeno o un ácido dicarboxílico en presencia de un agente deshidratante, para dar un producto diamida. Los grupos fosfato protegidos del producto diamida después se desprotegen, normalmente con paladio(0) y fenilsilano.

3. *Síntesis de los compuestos diamida quirales de tipo 2*

Los compuestos diamida quirales de tipo 2 se sintetizan esencialmente como se ha descrito para los compuestos diamida quirales de tipo 1, hasta el punto justo después de la escisión del grupo protector del grupo amina primaria del compuesto éster de fosfato. En este punto, un ácido dicarboxílico que tiene uno de los restos ácido protegido se hace reaccionar con el grupo amina primaria, para dar una monoamida. Después, el grupo protector en el otro ácido carboxílico se escinde, proporcionando un ácido carboxílico libre que después se puede hacer reaccionar con una amina primaria de un sistema de fosfato alternativo, adecuadamente sustituido, en presencia de un agente de deshidratación para dar una diamida de tipo 2, la cual después se puede tratar para desproteger el grupo o grupos fosfato para dar un compuesto deseado de la invención.

En el caso especial de los compuestos de urea quirales de tipo 2 de la invención, el grupo amino primario del grupo N-BOC-amino del éster de fosfato se desprotege y después se hace reaccionar con cloroformiato de triclorometilo o similar, con el fin de formar un compuesto de isocianato. Después, el isocianato se hace reaccionar con una amina primaria de un sistema de fosfato alternativo adecuadamente sustituido, para dar un producto de urea de tipo 2. Este producto después se puede tratar para desproteger el grupo o grupos fosfato.

4. *Análogos de glicerol-diamida*

Estos compuestos de la invención tienen un resto éster unido al carbono que es beta respecto al grupo fosfato, en lugar de un grupo amida.

En general, estos compuestos se preparan por eterificación de un glicerol quiral protegido con un alcohol primario activado de un resto diol, seguido de esterificación del resto alcohol secundario y posterior desprotección del resto glicerol, para dar un nuevo diol. Después, el grupo hidroxi primario del diol se protege, y el grupo hidroxilo secundario se condensa con un resto acilo para dar un diéster. El hidroxilo primario se desprotege, seguido de esterificación con un agente de fosforilación, del cual a continuación se ilustra el compuesto (11). Después de la desprotección del grupo amina introducido por el agente de fosforilación, el producto se hace reaccionar con fosgeno o un ácido dicarboxílico usando un agente de deshidratación tal como EDC. La posterior desprotección de los grupos fosfato da compuestos de la invención.

En la síntesis descrita antes en general, el sustituyente en R^1 de los compuestos de la invención se pueden variar fácilmente usando diferentes compuestos ácido dicarboxílico. Dichos ácidos se pueden acoplar al grupo amina del éster fosfato intermedio del esquema de reacción descrito antes, usando un agente deshidratante tal como EDC, o por activación del ácido dicarboxílico sintetizando, p. ej., el correspondiente cloruro de diácido.

Los sustituyentes representados por las variables R^2 y R^3 en la fórmula I anterior, se pueden variar fácilmente usando un ácido activado adecuado o cloruro de ácido en la reacción de amidación o esterificación del heteroátomo representado por X o Y en la fórmula I.

Los sustituyentes representados por las variables R^3 y R^6 de la fórmula I anterior, se pueden variar usando un producto intermedio que contiene el número deseado de átomos de carbono, que también contiene un grupo funcional en carbono activado, p. ej., un halógeno o sulfonato (OSO_2CH_3, OSO_2CF_3, $OSO_2CH_3C_6H_4$-p-CH_3), que se puede hacer reaccionar con los materiales de partida azido-diol, amino-alcohol o glicerol.

Los sustituyentes representados por las variables R^4 y R^7 en la fórmula I anterior, se pueden variar usando un ácido activado adecuado o cloruro de ácido en la esterificación del grupo hidroxilo secundario usado en los esquemas de reacción descritos antes.

Los valores de a y b en los compuestos de fórmula I, se pueden variar usando el amino-alcohol protegido con N-Boc adecuado cuando se sintetiza el reactivo de fosforilación, ilustrado por el compuesto (11) a continuación. Los valores de las variables d y e en los compuestos de fórmula I se pueden modificar usando los materiales de partida 2-aminodiol o 2-hidroxidiol adecuados.

Formulación y administración de adyuvante y vacuna

Se pueden preparar formulaciones adyuvantes que comprenden compuestos adyuvantes de la invención, así como vacunas y otras formulaciones inmunoestimuladoras que comprenden los compuestos adyuvantes de la invención. También se describen métodos para la estimulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno particular.

Los animales hospedantes a los que se administran de forma conveniente las formulaciones adyuvantes y de vacuna que contienen adyuvante, incluyen mamíferos humanos así como no humanos, peces, reptiles, etc.

Típicamente, se usa un antígeno mezclado con los compuestos adyuvantes de la invención. En algunas aplicaciones puede ser útil usar un antígeno unido covalentemente a un resto amino, carboxilo, hidroxilo y/o fosfato de los compuestos adyuvantes de la invención. La formulación específica de las composiciones terapéuticamente eficaces se pude, por lo tanto, llevar a cabo de cualquier forma adecuada con la que hacer al adyuvante biodisponible, seguro y eficaz en el sujeto en el que se administra la formulación.

Se pueden preparar formulaciones adyuvantes terapéuticas que pueden comprender, por ejemplo, (i) al menos un antígeno o vacuna terapéuticamente eficaz; y (ii) al menos un compuesto adyuvante de acuerdo con la invención.

Dicha composición terapéutica puede comprender, por ejemplo, al menos un agente antígeno seleccionado del grupo que consiste en:

(A) virus, bacterias, micoplasmas, hongos y protozoos vivos, matados con calor o atenuados químicamente;

(B) fragmentos, extractos, subunidades, metabolitos y construcciones recombinantes de (A);

(C) fragmentos, subunidades, metabolitos y construcciones recombinantes de proteínas y glicoproteínas de mamífero;

(D) antígenos específicos de tumor; y

(E) vacunas de ácidos nucleicos.

Por consiguiente, la composición terapéutica puede usar cualquier antígeno o componente de vacuna adecuado en combinación con un compuesto adyuvante de la invención, p. ej., un agente antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígenos de organismos patógenos y no patógenos, virus y hongos, en combinación con un compuesto adyuvante de la invención.

Como ejemplo adicional, dichas composiciones terapéuticas pueden comprender de forma adecuada proteínas, péptidos, antígenos y vacunas que son farmacológicamente activas para estados patológicos y afecciones tales como la viruela, fiebre amarilla, moquillo, cólera, viruela aviar, escarlatina, difteria, tétanos, tosferina, gripe, rabia, paperas; sarampión, fiebre aftosa y poliomelitis. En la formulación de vacuna resultante, que comprende (i) un antígeno y (ii) al menos un compuesto adyuvante de la invención, el antígeno y el compuesto adyuvante están cada uno presentes en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria cuando la formulación se administra a un animal hospedante, embrión u óvulo vacunado con la misma.

Los compuestos de la invención se pueden unir covalentemente a antígenos de vacuna, por ejemplo, por un resto amino, carbonilo, hidroxilo o fosfato. En vista de esta descripción, el experto en la técnica entenderá los métodos de unión de las composiciones adyuvantes de la invención a antígenos de vacunas. Las composiciones adyuvantes se pueden unir a vacunas por cualquiera de los métodos descritos por 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 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. Kamitakahara, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37:1524-1528; W. Dullenkopf *et al*., *Chem. Eur. J.,* 1999, 5:2432-2438.

Las formulaciones de vacuna resultantes, que incluyen (i) un antígeno, y (ii) un compuesto adyuvante, se usan convenientemente para inducir una respuesta inmunológica en una animal, administrando a dicho animal la formulación de vacuna, en una cantidad suficiente para producir una respuesta de anticuerpo en dicho animal.

Los modos de administración pueden comprender el uso de cualquier medio y/o método adecuado para suministrar el adyuvante, vacuna que contiene adyuvante, o adyuvante y/o antígeno a uno o más sitios del cuerpo del animal hospedante, en los que el adyuvante y los antígenos asociados son inmunoestimulantes eficaces. Los modos de suministro pueden incluir, sin limitación, métodos de administración parenteral, tales como inyección subcutánea (SC), administración transcutánea, intranasal (IN), oftálmica, transdérmica, intramuscular (IM), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP), intravaginal, pulmonar y rectal, así como la administración no parenteral, p. ej., oral.

La tasa de dosis y las formas de dosificación adecuadas para las composiciones de adyuvante y vacuna de la presente invención las pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica sin excesiva experimentación, usando técnicas de determinación de titulación de anticuerpos convencionales y protocolos de bioeficacia/biocompatibilidad convencionales, y dependen del antígeno particular o agente terapéutico usado con el adyuvante, el efecto terapéutico deseado y el intervalo de tiempo de bioactividad deseado.

El adyuvante de la presente invención se puede administrar convenientemente al animal hospedante con cualesquiera otros agentes farmacológica o fisiológicamente adecuados, p. ej., sustancias antígenas y/o biológicamente activas.

Las formulaciones de la invención pueden incluir componentes adicionales tales como disolución salina, aceite, escualeno, dispersiones de aceite en agua, liposomas, y otros adyuvantes tales como QS-21, péptidos de muramilo, adyuvante incompleto de Freund, y similares.

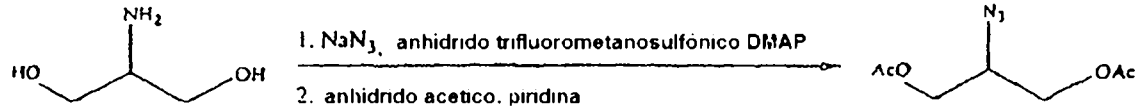
En los siguientes ejemplos sintéticos y biológicos la referencia a los compuestos indicados por un símbolo * se proporciona solo con propósitos de ilustración.

Ejemplos sintéticos

Todos los productos de reacción en los métodos sintéticos descritos a continuación dieron espectros de RMN y perfiles de cromatografía en capa fina en gel de sílice satisfactorios. Toda la cromatografía se llevó a cabo en gel de sílice y la elución se siguió por cromatografía en capa fina. Todas las reacciones completadas se determinaron por análisis cromatográficos en capa fina. Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente salvo que se especifique lo contrario. Todos los disolventes de las reacciones eran anhidros salvo que se indique lo contrario. El tratamiento típico para las reacciones químicas descritas a continuación incluye lavados acuosos, secado sobre sulfato sódico anhidro y eliminación del disolvente a presión reducida.

Ejemplo 1

Succinato-1

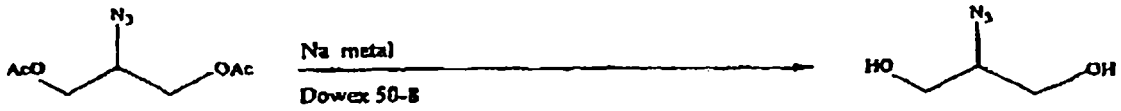


1 2

A una disolución de azida sódica (107,67 g) en 250 ml de agua, se añadieron 300 ml de cloruro de metileno. La mezcla se enfrió a 0ºC y se añadió gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico (57 ml) a una velocidad de 0,32 ml/minuto. La mezcla se agitó durante 6 horas adicionales a 0ºC y se almacenó a -20ºC durante 72 horas. La mezcla se calentó a 10ºC seguido de extracción con cloruro de metileno en un embudo de separación de Teflon©. Las capas orgánicas combinadas se secaron (sulfato magnésico). La suspensión anterior se filtró lentamente a una disolución agitada de (±)-2-amino-1,3~ dihodroxipropano (1) (9,89 g) en metanol (200 ml) y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP, 54 g) a 10ºC. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 17 horas a temperatura ambiente.

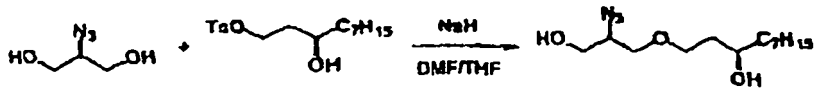
El disolvente se separó a presión reducida y el residuo se disolvió en piridina (200 ml) y se enfrió a 0ºC. Se añadió gota a gota anhídrido acético (50 ml) y la mezcla se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Se añadió

anhídrido acético (20 ml) adicional y después de 4 horas la mezcla se vertió sobre hielo y se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 16 g del diacetato (2) en forma de un aceite.



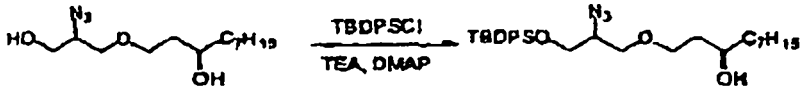
2 3

El diacetato (2) (16 g) se disolvió en metanol (150 ml) y se añadió lentamente sodio metal (2,0 g). La mezcla se agitó durante 90 minutos y se añadió resina Dowex® 50-8 hasta que el pH fue inferior o igual a 7. La mezcla se filtró y le siguió la concentración del filtrado y cromatografía para dar 6,73 g del diol (3).



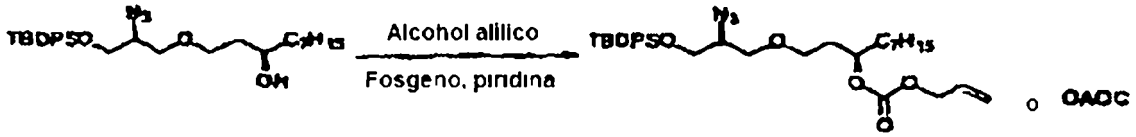
3 4 5

A una suspensión de hidruro sódico (1,24 g de una dispersión en aceite al 60% lavada 3 veces con hexanos y secada en atmósfera de nitrógeno) en dimetilformamida (DMF, 200 ml) se añadió gota a gota el azido-diol (3) (6,73 g) en THF (100 ml), seguido de la adición gota a gota de 3-*R*-hidroxi-1-*O*-tosil-1-decanol (4) (tosilato, 9,44 g) en THF (100 ml). La mezcla se agitó durante 16 horas, se diluyó con metanol (200 ml), se agitó con Amberlite® 125 H^+ durante 25 minutos y se concentró hasta sequedad. La cromatografía dio 4,37 g del compuesto (5).



5 6

A una disolución del diol (5) (5,32 g) en cloruro de metileno (30 ml) se añadió trietilamina (TEA, 6 ml) y DMAP (trazas), seguido de cloruro de t-butildifenilsililo (THDPSCI, 5 ml) y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 3,6 g del alcohol secundario (6) en forma de un aceite.



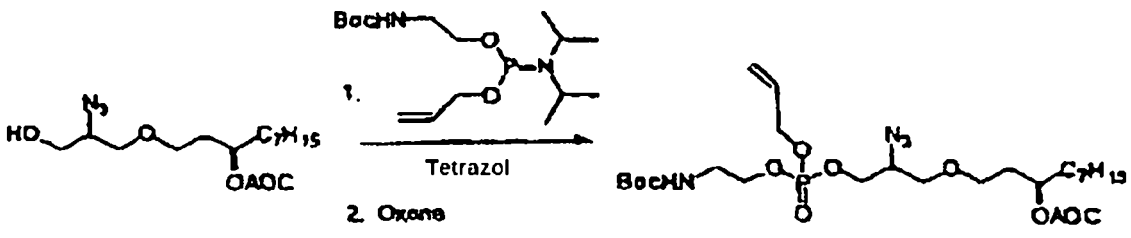
6 7

A una disolución del alcohol secundario (6) (2,95 g) en tolueno (30 ml) se añadió piridina (1,8 ml) seguido de la adición lenta de fosgeno (4,5 ml de una disolución 1,93 M en tolueno) a 0ºC. Después de agitar a 0ºC durante 20 minutos, se añadió gota a gota alcohol alílico (3,1 ml). Después de una agitación adicional durante 60 minutos a temperatura ambiente, la reacción se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 3,24 g del alcohol protegido (7) en forma de un aceite.



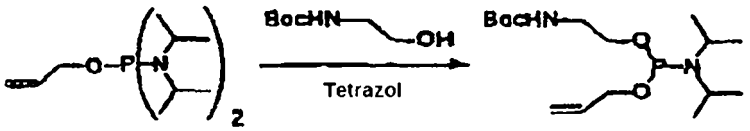
7 8

A una disolución del alcohol protegido (7) (1,29 g) en cloruro de metileno (3 ml) se añadió ácido fluorhídrico (HF, 4 ml) en acetonitrilo (12 ml). La mezcla se agitó durante la noche y se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 150 mg del alcohol (8) en forma de un aceite.



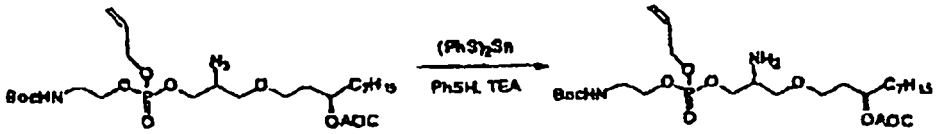
8 9

A una disolución del alcohol (8) (150 mg) en cloruro de metileno (0,6 ml) se añadió tetrazol (74 mg) y el reactivo de fosforilación (11) (175 mg). Después de 30 minutos, se añadió Oxone (323 mg) en una disolución enfriada de THF (0,5 ml)-agua (0,5 ml) a la mezcla de reacción enfriada. Después de 3 horas, la reacción se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 242 mg del compuesto (9) en forma de un aceite.



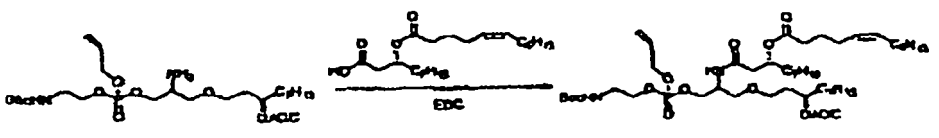
10 11

Para preparar el reactivo de fosforilación 11, a una disolución de diisopropilamina destilada (9,0 ml) en cloruro de metileno se añadió tetrazol (4,51 g) a temperatura ambiente seguido de agitación durante 1,5 horas. Se añadió gota a gota fosforodiamidita de alilo (10) (20,5 ml) a una velocidad de 6,5 ml/hora seguido de agitación durante 3 horas adicionales. Se añadió gota a gota N-Boc-2-aminoetanol (1036 g) en cloruro de metileno (50 ml) a la mezcla de reacción anterior, a una velocidad de 8,4 ml/hora y después se agitó durante 18 horas adicionales. La suspensión blanca se filtró a través de Celite 545 con 2 lavados de 20 ml con cloruro de metileno. El filtrado se concentró seguido de la suspensión y filtración del residuo con hexanos (200 ml). El filtrado de hexanos resultante se concentró hasta sequedad y se destiló azeotrópicamente con 2 porciones de 10 ml de tolueno para proporcionar el producto bruto (11) (21,54 g) en forma de un aceite.



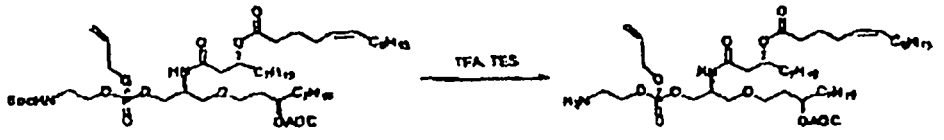
9 12

A una suspensión de ditiofenolestaño (1,3 g) en cloruro de metileno (7,8 ml) se añadió tiofenol (400 μl) seguido de TEA (543 μl). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se detuvo la agitación y se dejó que el residuo se depositara en el fondo del matraz. Se añadió 1,0 ml de la disolución anterior a una disolución de la azida (9) (242 mg) en cloruro de metileno (0,5 ml) y se dejó agitar durante 30 minutos. La inactivación con NaOH 0,1 N seguido del tratamiento habitual dio 193,1 mg de la amina (12) en forma de un aceite.



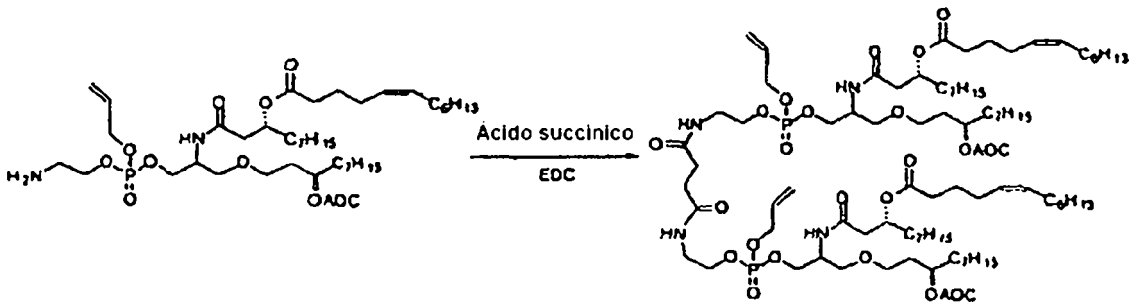
12 13

A una disolución secada de la amina (12) (193 mg) y el acil-ácido (que se puede preparar de acuerdo con Christ *et al*., patente de EE.UU. nº 5.530.113) (132 mg) en cloruro de metileno se añadió hidrocloruro de 1-(3-dimetilamino-propil)-3-etilcarbodiimida (EDC, 93 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 90 minutos, la reacción se inactivó y se procesó de la forma habitual para proporcionar 232 mg del fosfato protegido (13) en forma de un aceite.



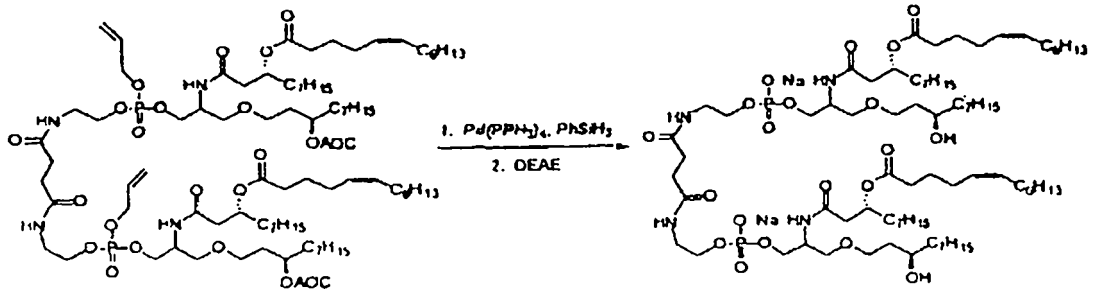
13 14

A una disolución del fosfato protegido (13) (232 mg) en cloruro de metileno (1 ml) se añadió trietilsilano (TES, 120 μl) y ácido trifluoroacético (TFA, 1,2 ml) y después se agitó durante 30 minutos. El TFA se separó a presión reducida y después se destiló azeotrópicamente con 3 porciones de 5 ml de tolueno. Se añadieron 20 ml de cloruro de metileno y la mezcla se trató de la forma habitual para dar 174 mg de la amina libre (14) en forma de un aceite.



14 15

A una disolución secada de la amina libre (14) (174 mg) en cloruro de metileno (0,5 ml) se añadieron ácido succínico (12,1 mg) y EDC (59 mg). Después de 1 hora, la reacción se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 143,1 mg del difosfato bloqueado (15) en forma de un aceite.

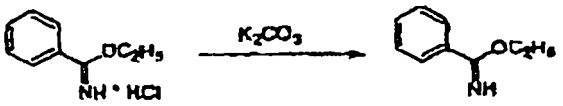


15 16

A una disolución del difosfato bloqueado (15) (177,9 mg) en cloroformo desgasificado (1,7 ml) en una caja seca, se añadió primero fenilsilano ($PhSiH_3$, 50 μl) y después tetrakis-trifenilfosfina-paladio(0) (Pd(PPH3)4, 70 mg). Después de 1 hora, la reacción se retiró de la caja y se añadió cloroformo:metanol:agua, 2:3:1, y la mezcla se agitó durante 1 hora. Después se vertió sobre una columna de cromatografía de dietilamino-etilcelulosa (DEAE). La elución de la columna con un gradiente lineal de 0,0 M a 0,1 M, de acetato amónico en cloroformo:metanol:agua 2:3:1, extracción de las fracciones deseadas con un volumen igual de cloroformo, concentración hasta sequedad y la adición de NaOH 0,1 N (175 μl) seguido de liofilización, dieron 136,2 mg del compuesto (16) en forma de un sólido blanco.

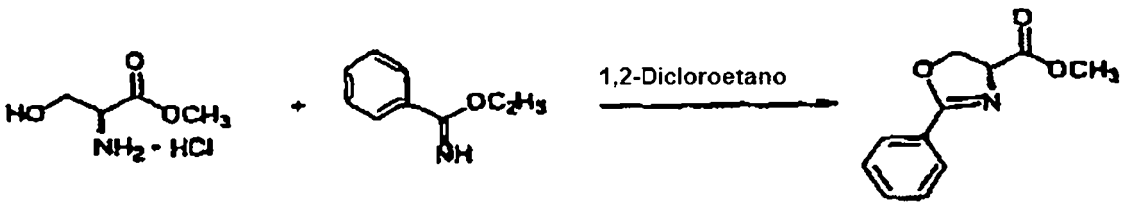
Ejemplo 2

Malonato quiral - Tipo 1



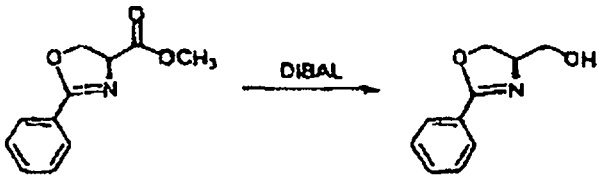
17 18

A una disolución enfriada de carbonato potásico (165 g) en agua (575 ml) se añadió cloruro de metileno (200 ml) seguido de hidrocloruro de bencimidato de etilo (17) (100 g), después de lo cual la mezcla se agitó durante 8 minutos. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con cloruro de metileno. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron y el disolvente se separó a presión reducida para dar 83 g del compuesto (18).



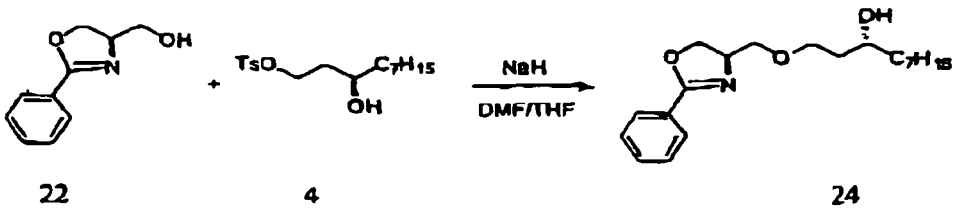
19 18 21

A una disolución de hidrocloruro del éster de metilo de L-serina (19) (41,6 g) en 1,2-dicloroetano (450 ml) se añadió bencimidato de etilo (18) (36 g). La mezcla se calentó a reflujo durante 20 horas, se enfrió, se filtró a través de tierra de diatomeas y se concentró hasta sequedad para dar 56 g del éster de etilo (21) en forma de un sólido blanco.



21 22

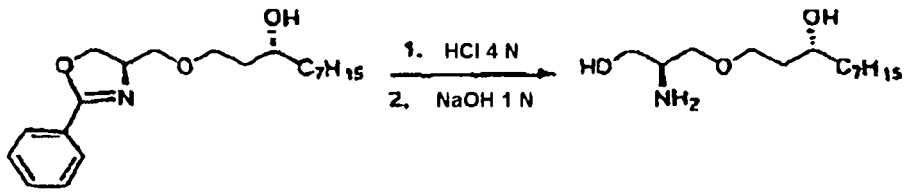
A una disolución enfriada con hielo del éster de etilo (21) (56 g) en THF (500 ml) se añadió gota a gota hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL, 545 ml de una disolución 1 M en hexano). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche y después se vertió con cuidado en una disolución de sal de Rochelle (500 g en 1,0 litro de agua). La mezcla se agitó durante 1 hora y se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 25,5 g del alcohol (22) en forma de un sólido blanco.



22 4 24

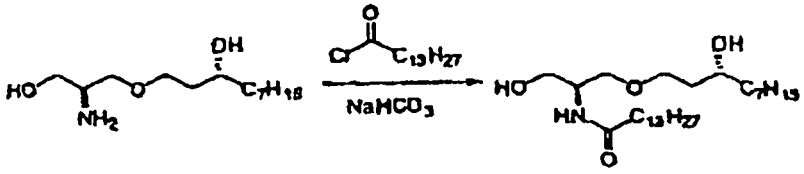
A una suspensión de hidruro de sodio lavado (5,3 g de una dispersión en aceite al 60%) en DMF (200 ml) se añadió el alcohol (22) (24 g) en 250 ml de THF. Después de 30 minutos, se añadió el tosilato (4) en 250 ml de THF a lo largo

de 2,5 horas y se agitó durante la noche. La mezcla se enfrió en hielo, se añadió metanol, se separó el disolvente a presión reducida y se cromatografió para dar 4,32 g del alcohol (24) en forma de un aceite.



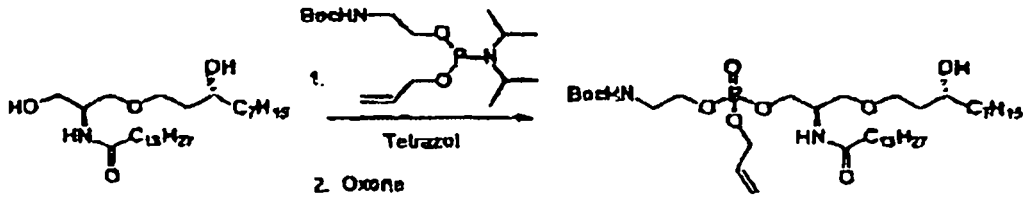
24 25

El alcohol (24) (4,3 g) se disolvió en ácido clorhídrico acuoso 4 N y se calentó a reflujo durante 20 horas. La mezcla se enfrió, se filtró, se extrajo con éter, se hizo básica con hidróxido sódico y se extrajo dos veces con cloroformo. Las capas de cloroformo combinadas se secaron y el disolvente se separó para dar 2,88 g del diol (25) en forma de un aceite.



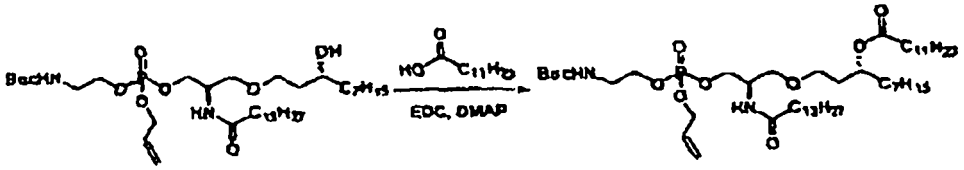
25 26

El diol (15) (2,88 g) se disolvió en disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (45 ml) y THF (25 ml) y se dejó agitar durante 5 minutos. Se añadió gota a gota cloruro de miristoilo (3,4 ml) a lo largo de un periodo de 25 min, después del cual la mezcla de reacción se dejó agitar durante 1 h adicional. La reacción se trató de la forma habitual y se cromatografió para dar 3,07 g del alcohol (26) en forma de un aceite.



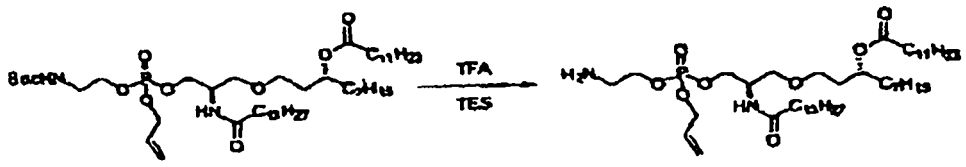
26 27

A una disolución del alcohol (26) (1,78 g) en cloruro de metileno (140 ml) se añadió tetrazol (683 mg), seguido del reactivo de fosforilación (11) (1,6 ml). Después de 30 minutos, la mezcla se enfrió en hielo, y se añadió THF (105 ml) seguido de una disolución de Oxone (3 g en 90 ml de agua). Después de 5 minutos, se quitó el baño de hielo y la mezcla se agitó durante 30 minutos. La reacción se trató de la forma habitual y se cromatografió para dar 2,99 g del alcohol (27) en forma de un aceite.



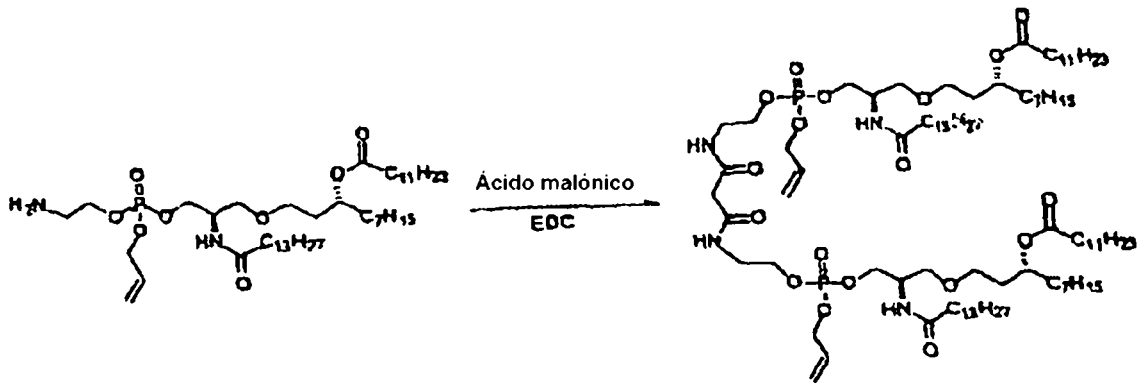
27 28

A una disolución del alcohol (27) (3,9 g) en cloruro de metileno (126 ml) se añadió EDC (10,8 g), DMAP (66 mg) y ácido dodecílico (1,62 g) y se agitó durante la noche. Se añadieron ácido (1,6 g), EDC (1 g) y DMAP (0,5 g) adicionales. Después de 3 horas, la reacción se trató de la forma habitual y se cromatografió para dar 2,07 g de la amina protegida con *N*-BOC (28).



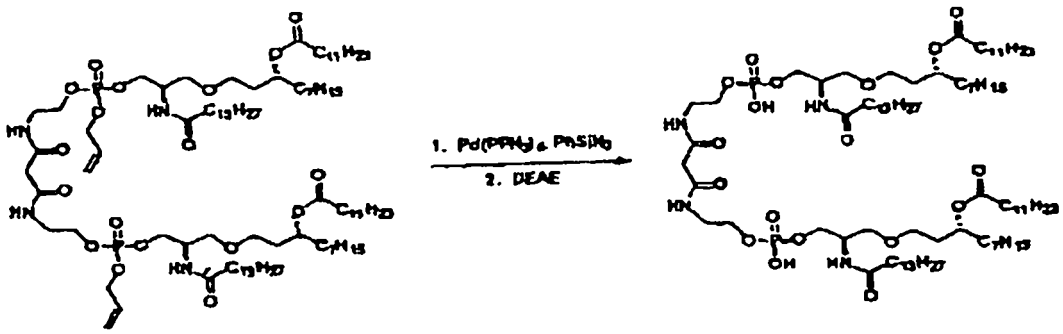
28 29

A una disolución de la amina protegida con N-BOC (28) (1873 mg) en cloruro de metileno (1,5 ml) se añadieron TES (240 μl) y TFA (300 μl) y la mezcla se agitó durante 45 minutos. Se añadió tolueno y el disolvente se separó a presión reducida. El residuo se disolvió en cloruro de metileno y se trató de la forma habitual para dar 154 mg de la amina (29) en forma de un aceite.



29 30

A una disolución enfriada con hielo de la amina (29) (75,6 mg) y ácido malónico (4,8 mg) en cloruro de metileno (0,5 ml) se añadió EDC (27 mg), seguido de la retirada del baño de enfriamiento. Después de 1 hora, se añadieron cantidades en trazas de DMAP. Después de 2,5 horas, la mezcla se cromatografió directamente para dar 54,1 mg del producto dímero (30).

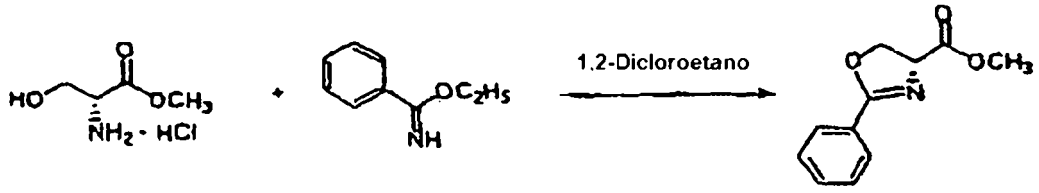


30 31

A una disolución del dímero (30) (54 mg) en cloroformo desgasificado (2 ml) se añadió $PhSiH_3$ (14 μl) y Pd (PPh_3) (18 mg), y después se quitó el baño de enfriamiento. Después de 1 hora, la reacción se inactivó con cloroformo:metanol:agua (23:1) y se vertió en una columna de cromatografía de DEAE-celulosa para dar un semisólido. El sólido se disolvió en agua estéril y se añadió hidróxido sódico acuoso 0,1 N (306 μl) y la mezcla se liofilizó para dar un sólido blanco (31) (25 mg).

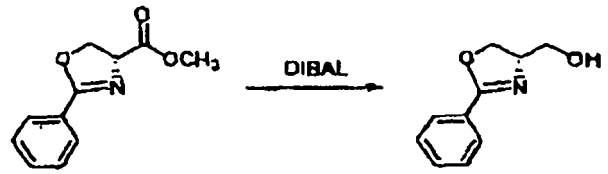
Ejemplo 3

Malonato quiral - Tipo 2



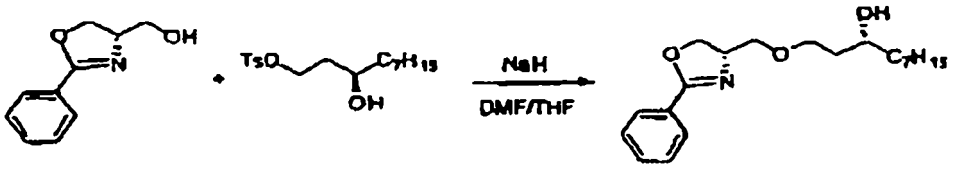
32 20 33

A una disolución de hidrocloruro del éster de metilo de D-serina (32) (25 g) en dicloroetano (270 ml) se añadió bencimidato de etilo (20) (24 g). Después de 20 horas a reflujo, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de tierra de diatomeas y el disolvente se separó a presión reducida para dar 34 g del éster de metilo (33) en forma de un sólido blanco.



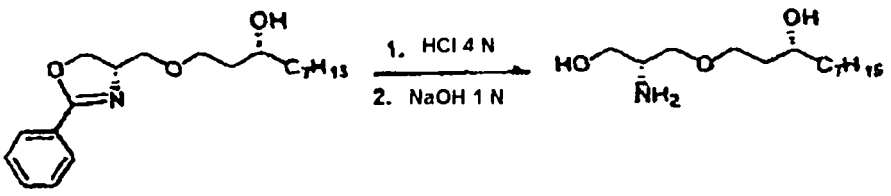
33 36

A una disolución enfriada con hielo del éster de metilo (33) (34 g) en THF (300 ml) se añadió gota a gota una disolución de DIBAL en hexano (1,0 M, 322 ml). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche y después se vertió con cuidado en una disolución acuosa de sal de Rochelle. Después, la mezcla se agitó durante 1 hora y se trató. La cromatografía dio 18,6 g del alcohol (36) en forma de un sólido blanco.



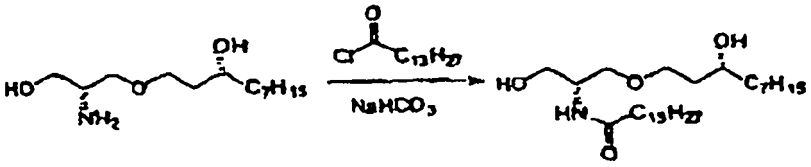
36 23 37

A una suspensión de hidruro sódico lavado (4 g de una suspensión en aceite al 60%) en DMF (100 ml) se añadió una disolución del alcohol (36) (8,6 g) en THF (40 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora y se añadió una disolución del tosilato (23) (17,5 g) en THF (40 ml). La mezcla se agitó durante la noche y después se añadió tosilato (23) adicional (5 g) y se agitó durante otras 4 horas. Se añadió metanol a la mezcla de reacción enfriada, se separó el disolvente a presión reducida y el residuo se cromatografió para dar 1,03 del alcohol (37) en forma de un sólido.



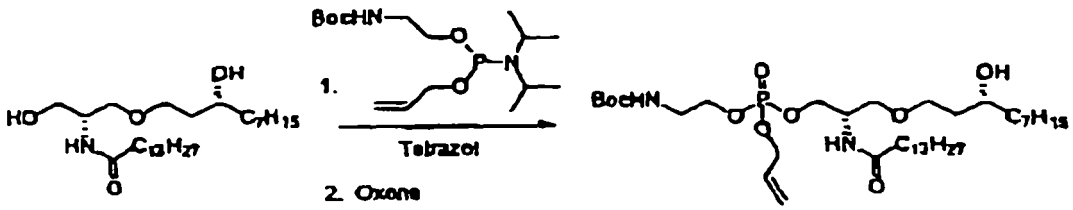
37 39

El alcohol (37) (1,03 g) se disolvió en ácido clorhídrico acuoso 4 N (25 ml) y la mezcla se calentó a 100ºC durante 20 horas. Se añadió ácido clorhídrico adicional (5 ml) y se continuó calentando a reflujo durante 6 horas. La mezcla se enfrió, se lavó con éter dietílico, se hizo básica con hidróxido sódico acuoso 1 N y se extrajo (3x) con cloroformo. Las capas de cloroformo combinadas se secaron y el disolvente se separó a presión reducida para dar 553 mg del amino-diol (39).



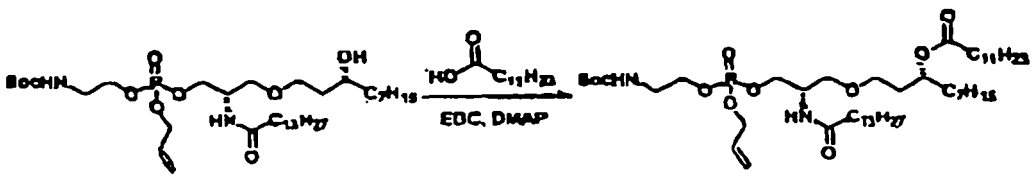
39 41

A una disolución del amino-diol (39) (553 mg) en THF (3 ml) se añadió disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (6 ml) seguido de cloruro de miristoilo (628 μl). Después de 50 minutos, la reacción se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 389 mg del amida-diol (41) en forma de un aceite.



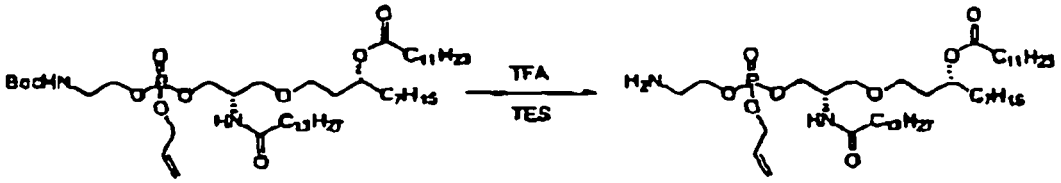
41 42

A una disolución del amida-diol (41) (531 mg) en cloruro de metileno (40 ml) se añadió tetrazol (203 mg) y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Después, se añadió el reactivo de fosforilación (11) (482 mg). Después de 20 minutos, se añadió reactivo de fosforilación (11) adicional (100 mg) y después de 20 minutos adicionales, se añadieron 100 mg más. Después de 20 minutos adicionales, se añadieron 50 mg más. Después de 20 minutos, la mezcla se vertió en una disolución fría de THF (30 ml)/Oxone (1,07 g)/agua (30 ml). La mezcla se agitó a 0ºC durante 5 minutos, y después 20 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual la reacción se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 852 mg del fosfato-alcohol (42) en forma de un aceite.



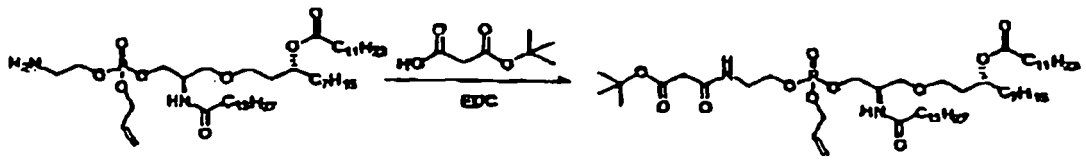
42 43

A una disolución del fosfato-alcohol (42) (3,9 g) en cloruro de metileno (126 ml) se añadió EDC (10,8 g), DMAP (66 mg) y ácido dodecílico (1,62 g). La mezcla de reacción se agitó durante la noche. Se añadieron ácido (1,6 g), EDC (1 g) y DMAP (0,5 g) adicionales. Después de 3 horas, la reacción se trató de la forma habitual y se cromatografió para dar 2,07 g de la amina protegida (43).



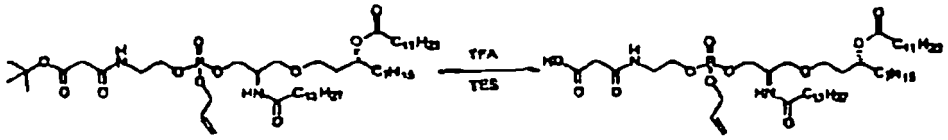
43 44

A una disolución de la amina protegida (43) (194 mg) en cloruro de metileno (1,5 ml) se añadieron TES (240 μl) y TFA (300 μl). La mezcla se agitó durante 20 minutos y se añadieron TES (50 μl) y TFA (50 μl) adicionales. Después de 1 hora, se añadió tolueno y el disolvente se separó a presión reducida y después la mezcla se trató de la forma habitual. El producto de amina libre bruto (44) se usó inmediatamente en la siguiente reacción.



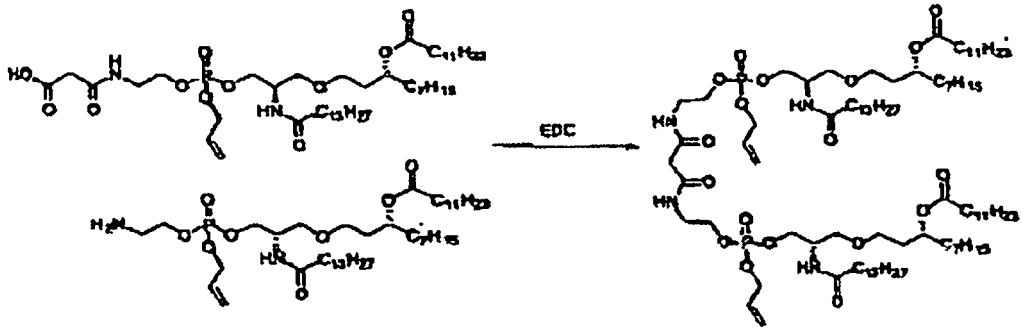
29 45

A una disolución enfriada con hielo de la amina libre (29) (43,5 mg) en cloruro de metileno (250 μl) se añadió malonato de mono-t-butilo (8,3 μl), EDC (12,4 mg) y cantidades en trazas de DMAP. Se retiró el baño de hielo y después de 2 horas, la reacción se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 44 mg de la amida (45).



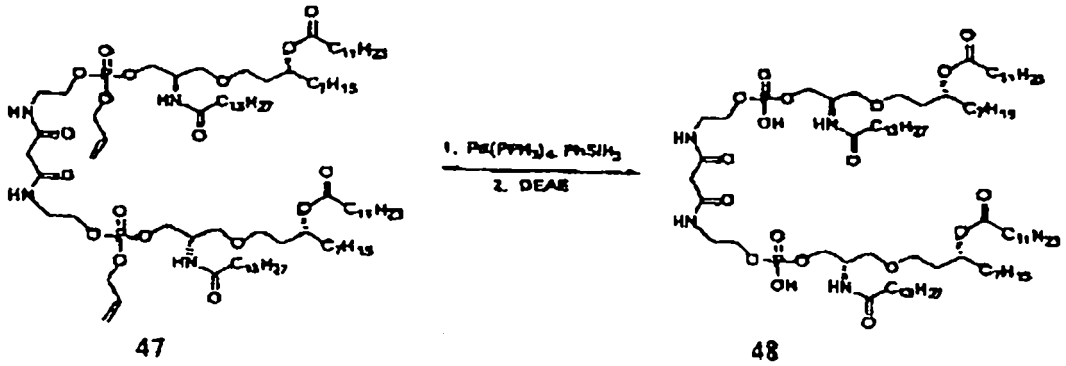
45 46

A una disolución de la amida (45) (44 mg) en cloruro de metileno (0,5 ml) se añadieron TES (90 μl) y TFA (100 μl). Después de 2 horas, se añadió tolueno y el disolvente se separó a presión reducida. La mezcla se trató de la forma habitual para dar 44,2 mg del ácido libre (46).



44 + 46 47

A una disolución enfriada con hielo del ácido libre (46) (41 mg) y la amina libre (44) (263 mg) en cloruro de metileno (500 μl) se añadió EDC (13 mg) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se añadieron EDC (5 mg) y DMAP (2 mg) adicionales, y después de 1 hora la reacción se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 32,7 mg del compuesto acoplado 47 en forma de un aceite.

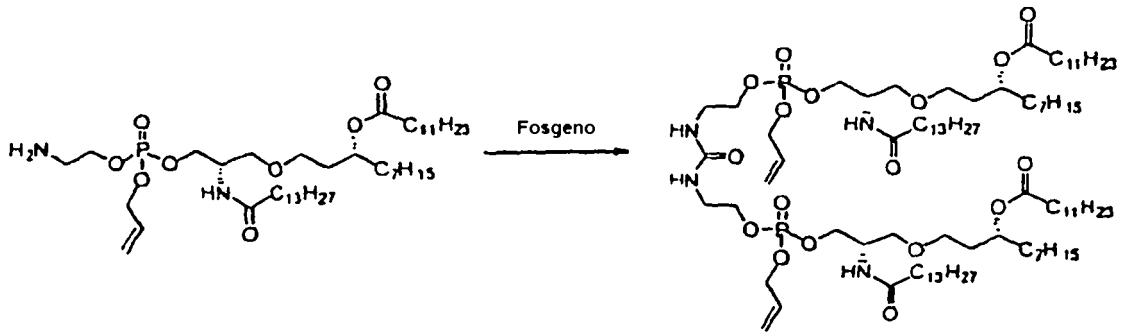


47 48

A una disolución del compuesto acoplado (47) (32,7 mg) en cloroformo desgasificado (1,5 ml) en una caja seca se añadieron $PhSiH_3$ (8,5 μl) y $Pd(PPH_3)_4$ (11 mg). La mezcla se retiró de la caja y se enfrió en hielo. Después de 5 minutos, se quitó el baño de hielo y después de 1 hora se añadió cloroformo:metanol:agua (2:3:1) y la mezcla se agitó durante 15 minutos y se almacenó en el frigorífico durante la noche. La mezcla después se vertió en una columna de cromatografía de DEAE. La cromatografía dio 13,9 mg de un compuesto (48) en forma de un polvo blanco después del tratamiento con NaOH 0,1 N seguido de liofilización.

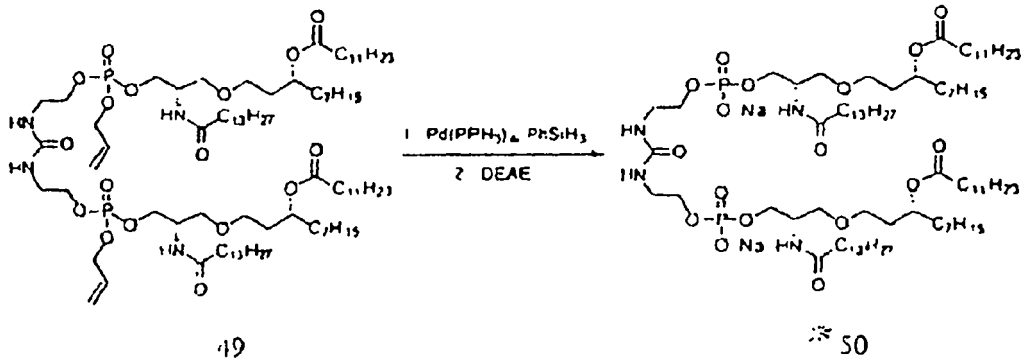
Ejemplo 4

Urea quiral - Tipo 1



44 49

A una disolución de la amina (44) (46,1 mg) en tolueno se añadió disolución saturada de bicarbonato sódico (0,5 ml) seguido de fosgeno (15 μl de una disolución 1,93 M en tolueno). Después de 30 minutos, se añadió fosgeno adicional (10 μl). Después de 2 horas, se añadió fosgeno adicional (5 μl). La reacción se inactivó con bicarbonato sódico acuoso y se trató de la forma habitual para dar 29,6 mg de la urea (49) con los fosfatos protegidos.



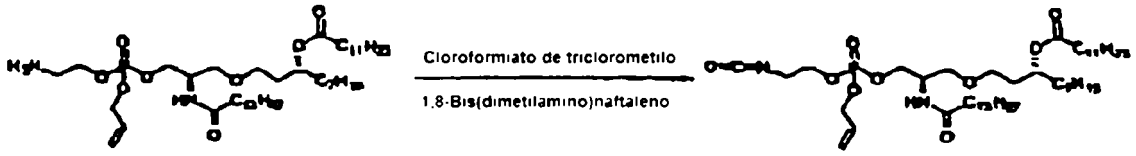
49 50

A una disolución de la urea con los fosfatos protegidos (49) (29,6 mg) en cloroformo desgasificado (1,5 ml) en una caja seca, se añadió $PhSiH_3$ (8 μl). El recipiente de reacción se retiró de la caja seca y se puso sobre hielo. Se añadió $Pd(PPh_3)_4$ (10 mg) y después de 5 minutos se quitó el baño de hielo. Después de 1 hora, la reacción se inactivó

por adición de cloroformo:metanol:agua. La mezcla se agitó durante 15 minutos y se almacenó durante la noche en el frigorífico. Se cromatografió en DEAE para dar 24,1 mg del producto (50) en forma de un polvo blanco después de tratamiento con NaOH 0,1 N seguido de liofilización.

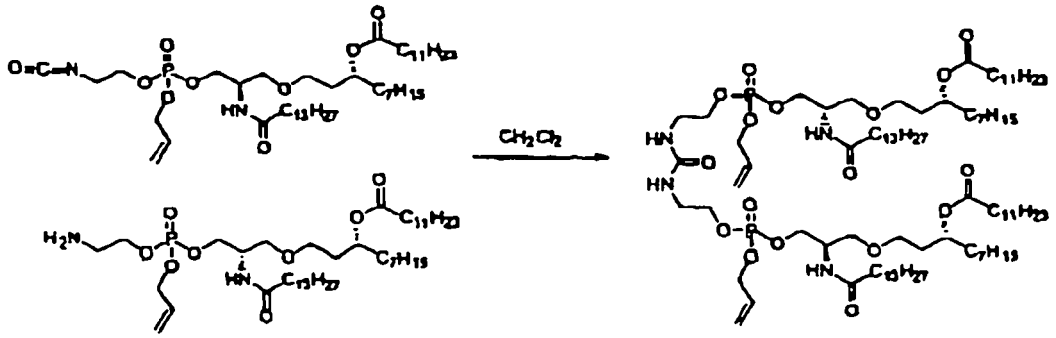
Ejemplo 5

Urea quiral - Tipo 2



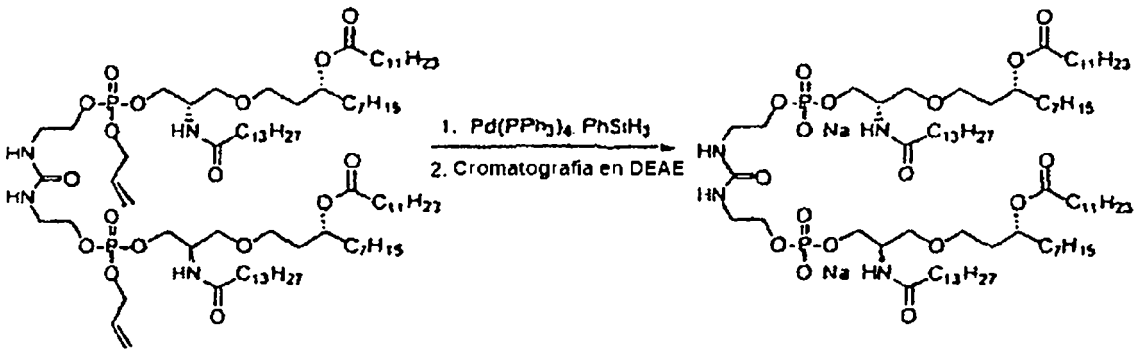
29 51

A una disolución enfriada con hielo de cloroformiato de triclorometilo (2,6 μl) en cloruro de metileno (200 μl) se añadió una disolución de la amina libre (29) (35 mg) y 1,8-bis-(dimetilamino)naftaleno en cloruro de metileno (200 μl). Después de 5 minutos, se quitó el baño de hielo. Después de 15 minutos, se añadió cloruro de metileno adicional y la mezcla se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 9,4 mg del isocianato (51) en forma de un aceite.



51 + 44 61

A una disolución del isocianato (51) (9,4 mg) en cloruro de metileno (0,2 ml) se añadió una disolución de la amina (44) (10,3 mg) en cloruro de metileno. Después de 15 minutos, la reacción se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 5,5 mg del compuesto acoplado (61) en forma de un aceite.

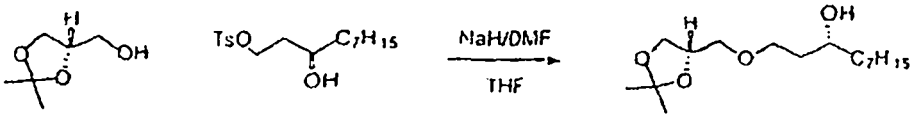


61 62

A una disolución del compuesto acoplado (61) (25,2 mg) en cloroformo desgasificado (0,5 ml) en una caja seca, se añadió $PhSiH_3$ (6,6 μl) y $Pd(PPH_3)_4$ (8,8 mg). La mezcla se retiró de la caja seca y se enfrió en hielo. Después de 5 minutos, se quitó el baño de hielo y después de 1 hora se añadió cloroformo:metanol:agua (2:3:1) y la mezcla se agitó durante 15 minutos y se almacenó en el frigorífico durante la noche. Después la mezcla se vertió en una columna de cromatografía de DEAE. La cromatografía dio 7,5 mg del compuesto (62) en forma de un polvo blanco después de tratamiento con NaOH 0,1 N seguido de liofilización.

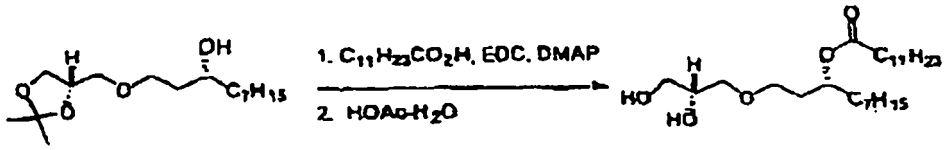
Ejemplo 6

Análogo de glicerol quiral de Tipo 1



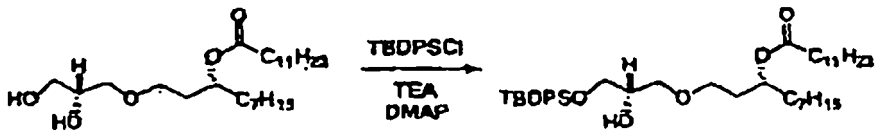
63 4 65

A una suspensión agitada de hidruro sódico (145,5 mg, dispersión al 60% en aceite lavada con hexanos) en DMF (12 ml) se añadió gota a gota el (S)-(+)-alcohol (63) (0,41 ml) en 8 ml de THF a lo largo de un periodo de 1 hora. La mezcla se agitó durante 30 minutos adicionales seguido de la adición gota a gota del tosilato (4) (0,789 g) en 10 ml de THF a lo largo de un periodo de 10 minutos. La mezcla de reacción resultante se agitó durante la noche. El tratamiento habitual dio 0,56 mg del aducto deseado (65).



65 66

Una disolución de ácido láurico (1,40 g), EDC (1,35 g), DMAP (0,04 g) y el aducto del alcohol (65) (0,564 g) en 4 ml de cloruro de metileno se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente. Se añadieron salmuera y disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (1:1) y la mezcla se extrajo con cloruro de metileno. La mezcla se trató de la forma habitual y se cromatografió. La fracción deseada se disolvió en 20 ml de ácido acético:agua 4:1 y se agitó durante 15 horas. El disolvente se separó a presión reducida y el residuo se cromatografió para dar 0,77 g de diol semisólido (66).



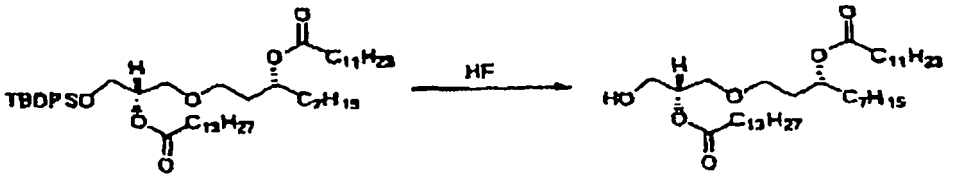
66 67

Una disolución del diol (66) (0,22 g), DMAP (6,3 mg), TEA (100 μl) y TBDPSCI (164 μl) se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Se añadió metanol (2 ml) y cantidades en trazas de ácido clorhídrico acuoso seguido de extracción con cloruro de metileno. La mezcla se trató de la forma habitual. El residuo se cromatografió para dar 0,3 g del alcohol (67) en forma de un aceite.



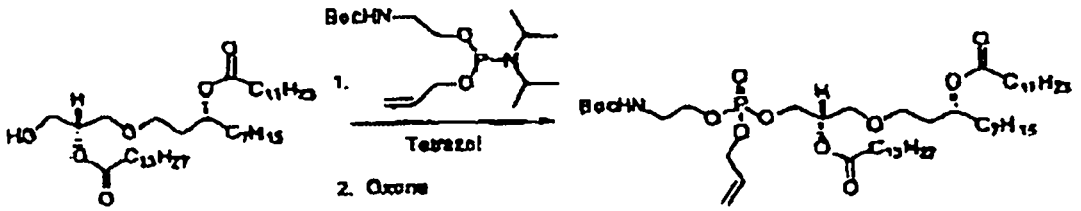
67 68

Una disolución del alcohol (67) (0,3 g), DMAP (5,5 mg), EDC (2,58 mg), ácido mirístico (308 mg) en cloruro de metileno (4 ml) se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente seguido de la adición de salmuera y disolución saturada de bicarbonato sódico. La mezcla se trató de la forma habitual y la cromatografía dio 0,4 g del producto éter protegido con sililo (68).



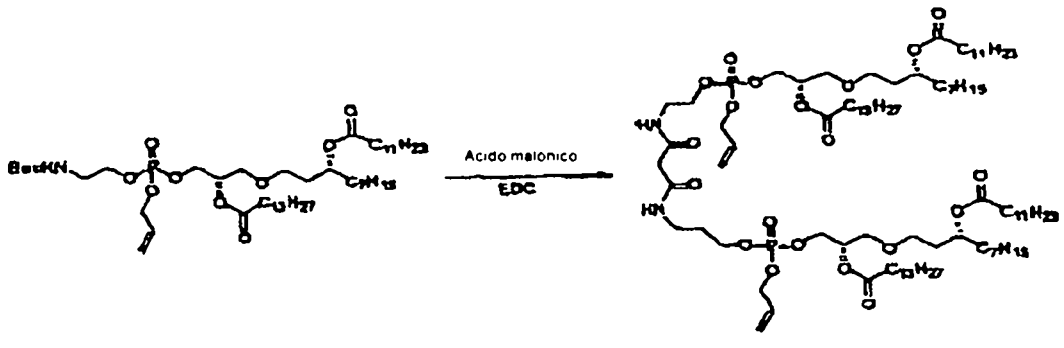
68 69

A una disolución del éter protegido con sililo (68) (195 mg) en acetonitrilo (2,7 ml) se añadió ácido fluorhídrico al 48% (0,756 ml). Después de 30 horas, se añadió disolución saturada de bicarbonato sódico y la mezcla se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 94,7 mg del alcohol libre (69).



69 70

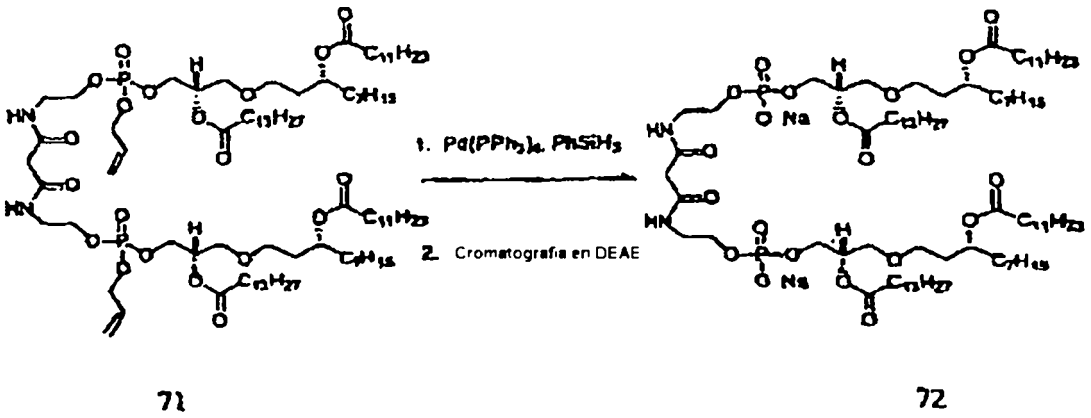
A una disolución del alcohol libre (69) (57 mg) en cloruro de metileno (0,5 ml) se añadió tetrazol (15,6 mg) y reactivo de fosforilación (11) (40 mg) a temperatura ambiente. Después de 4 horas, la mezcla se enfrió a 0ºC seguido de la adición de Oxone (82 mg) en THF (0,5 ml):agua (0,6 ml). La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 80 minutos. La mezcla de reacción final se trató de la forma habitual. La cromatografía dio 72 mg del fosfato protegido (70).



70 71

A una disolución del fosfato protegido (70) (72 mg) en cloruro de metileno (1 ml) se añadieron TES (120 μl) y ácido trifluoroacético (0,6 ml) y después se agitó durante 1 hora. El TFA se separó a presión reducida seguido de destilación azeotrópica con 10 ml de tolueno. Se añadieron 20 ml de cloruro de metileno y la mezcla se trató de la forma habitual para dar 0,52 g de un aceite.

La amina bruta se disolvió en cloruro de metileno (0,7 ml) seguido de la adición de ácido malónico (4,5 mg) y EDC (25,6 mg). La mezcla se agitó durante la noche y se trató de la forma habitual para dar 32,5 mg del producto dímero (71).



71 72

El dímero protegido (71) (32,5 mg) de la reacción precedente se disolvió en cloroformo desgasificado (2 ml) y se añadió $PhSiH_3$ (8,6 μl) en una caja seca. La mezcla se retiró de la caja seca y se añadió $Pd(PPh_3)_4$ (22,6 mg), previamente pesado en la caja seca. Después de 2 horas, la mezcla se cromatografió en DEAE para dar 27,9 mg de sólido blanco (72) después de la adición de hidróxido sódico 1 N (34,2 μl) seguido de liofilización.

*Preparación de ER-804253**



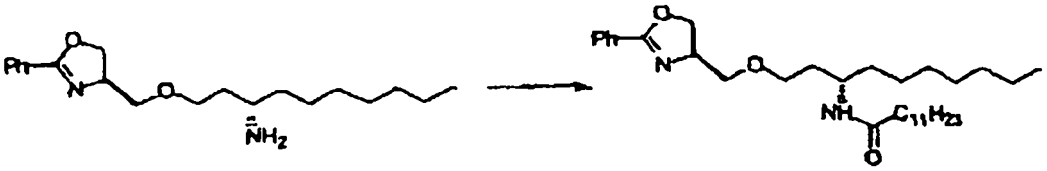
El alcohol (558 mg) se disolvió en cloruro de metileno (5 ml) enfriado a 0ºC y se añadió trietilamina (0,466 ml) en atmósfera de nitrógeno. Después de agitar durante 5 minutos, se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (0,142 ml). La mezcla se agitó durante 5 minutos adicionales a 0ºC y después se calentó a temperatura ambiente. Después de agitar durante 1 hora adicional, la mezcla se trató con disolución saturada de bicarbonato sódico, se extrajo con acetato de etilo y el extracto se lavó con agua, ácido clorhídrico acuoso diluido, agua, salmuera, se secó y el disolvente se separó para dar 630 mg.



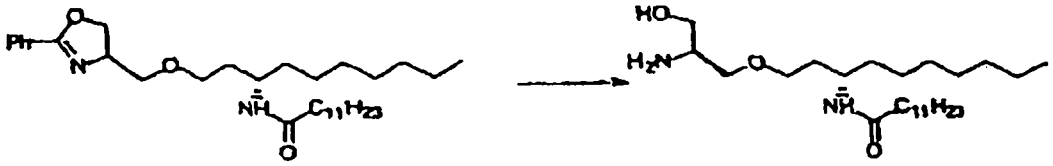
Se disolvieron el mesilato (630 mg) y azida sódica (299 mg) en DMSO (6 ml) y se calentaron a 60ºC durante 90 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente la mezcla de reacción se diluyó con cloruro de metileno, y se lavó con agua y salmuera. Después de extraer los lavados acuosos, los extractos orgánicos combinados se secaron, se concentraron, se purificaron en gel de sílice usando una relación 4:1 de hexanos a acetato de etilo y las fracciones de producto se secaron para dar 420 mg.



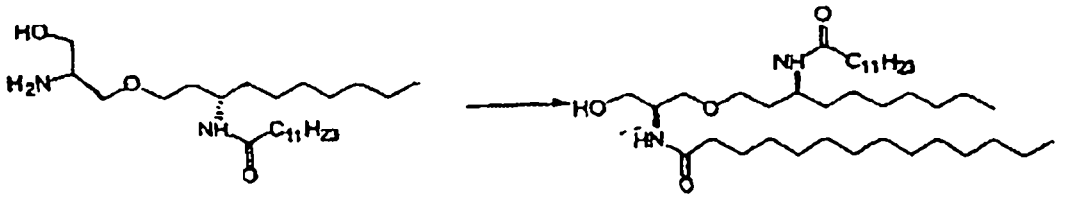
La azida (295 mg) se disolvió en etanol (5 ml) y se añadió catalizador de Lindlar (200 mg). Después de agitar en atmósfera de hidrógeno gaseoso a presión atmosférica, la disolución filtrada se secó para dar 274 mg.



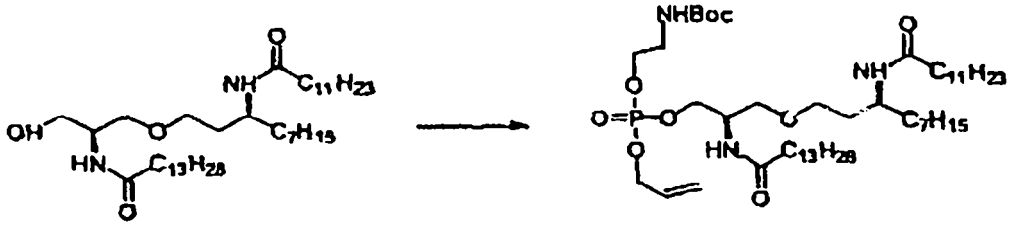
La amina (930 mg) se disolvió en THF (10 ml) y disolución saturada de bicarbonato sódico (22 ml). Después de agitar durante 5 minutos, se añadió gota a gota cloruro de lauroilo (0,712 ml) a lo largo de 20 minutos. La mezcla final se extrajo con cloroformo, y se secó para dar 1,45 g.



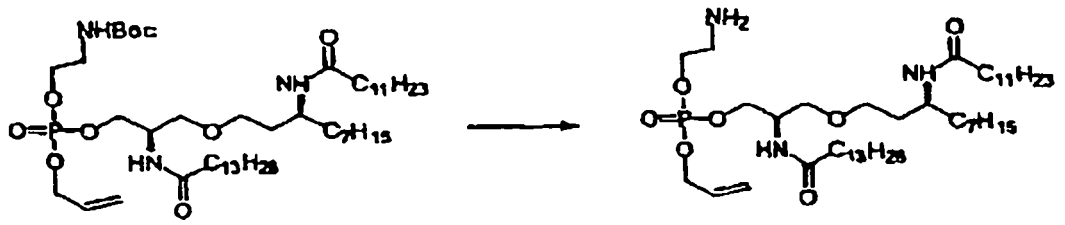
La amida (1,11 g) se disolvió en metanol (14 ml) y se añadió ácido clorhídrico 4 N (8 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora a 50ºC y después se concentró. Se añadieron metanol (16 ml) e hidróxido sódico al 40% (8 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora. Se enfrió, se extrajo con cloruro de metileno y el extracto se lavó con agua, se secó y se separó el disolvente para dar 930 mg.



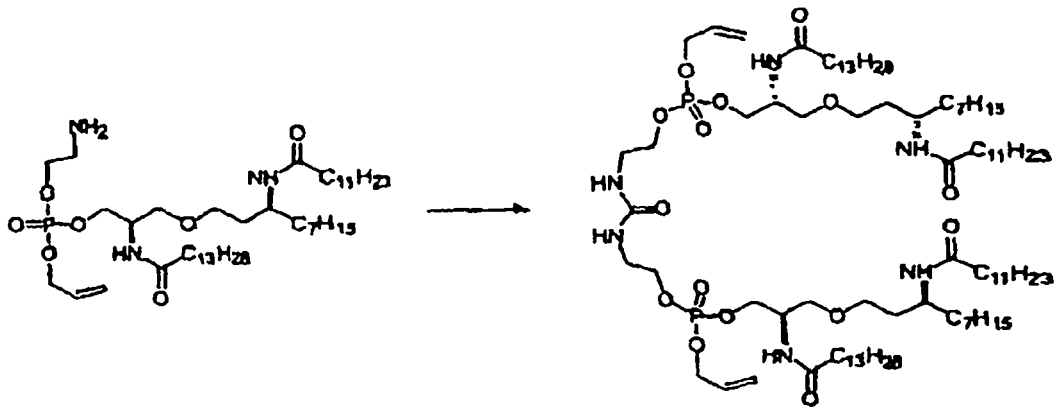
El aminoalcohol se disolvió en THF (6 ml) y se añadió disolución saturada de bicarbonato sódico (13 ml). Después de 5 minutos, la mezcla se enfrió a 0ºC y se añadió cloruro de miristoilo (300 μl). Después de 30 minutos, la mezcla se trató de la forma habitual para dar 430 mg.



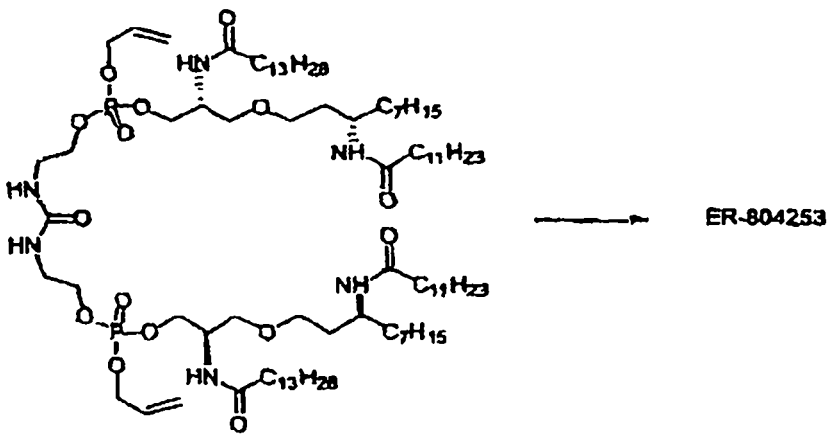
El alcohol (101,7 mg) se disolvió en cloruro de metileno enfriado con hielo y se añadió el reactivo de fosforilación 11 (90 μl) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se añadió Oxone enfriado con hielo (166,3 mg) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. La reacción se inactivó con tiosulfato. La mezcla se trató de la forma habitual y se cromatografió para dar 174 mg (no purificado).



La amina protegida de la reacción anterior se disolvió en cloruro de metileno enfriado con hielo (1 ml), se añadió ácido trifluoroacético y la mezcla se agitó durante 1 hora. El TFA se separó y la mezcla se purificó para dar 106,7 mg.

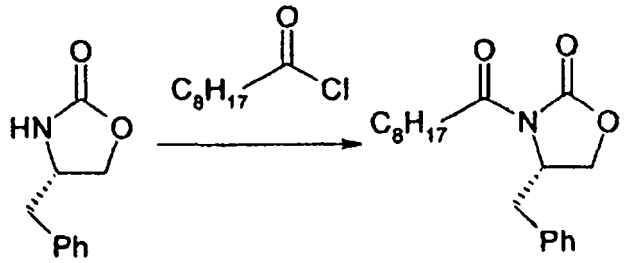


La amina se disolvió en cloruro de metileno (3 ml) y se añadió disolución saturada de bicarbonato sódico (3 ml). La mezcla se enfrió en hielo y se añadió gota a gota fosgeno en tolueno (0,55 equiv.). La mezcla se agitó durante 20 minutos y se trató para dar 112,3 mg.

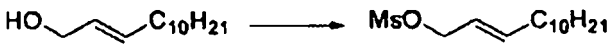


A una disolución del fosfato bloqueado (40,5 mg) en cloroformo enfriado con hielo (2,6 ml) se añadió fenilsilano (10,7 mg) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (28,7 mg) y la mezcla se agitó durante 1 hora. La mezcla se cromatografió en una columna de DEAE para dar 27,7 mg del compuesto ER-804253.

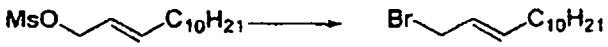
*Preparación de ER-804130**



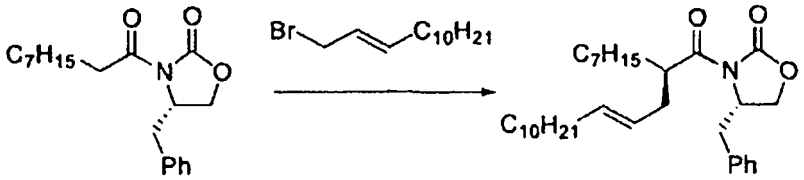
A una disolución de la amida (3 g) en THF (65 ml) a -78ºC se añadió 1 equivalente de butil-litio, seguido de una disolución de cloruro de nonanoilo en THF (6 ml). Se añadió cloruro amónico acuoso y la mezcla se trató de la forma habitual para dar 5,35 g.



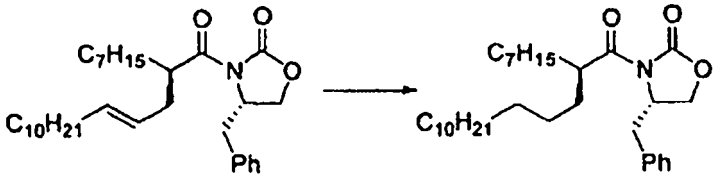
A una disolución del alcohol (5 g) en cloruro de metileno enfriado con hielo (100 ml) se añadieron trietilamina (4,1 ml) y cloruro de mesilo (2,1 ml). La mezcla se agitó durante 4 horas y se trató de la forma habitual para dar 6,99 g.



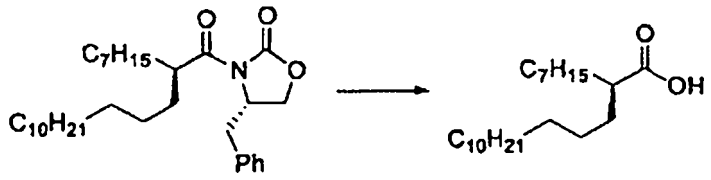
A la disolución del mesilato (6,99 g) en DMF enfriada con hielo (100 ml) se añadió bromuro potásico. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 5 horas. Se trató de la forma habitual para dar 4,63 g de aceite transparente.



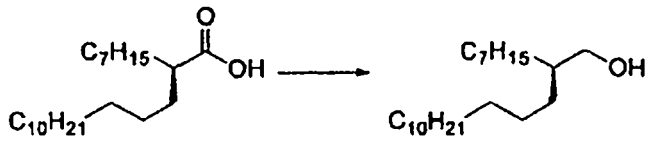
Una disolución de la amida (2,8 g) en THF (15 ml) se añadió a una disolución a -78ºC de bis-trimetilsililamiduro de sodio en THF (15 ml). Después de 1 hora, se añadió el bromuro y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se trató de la forma habitual para dar 1,02 g.



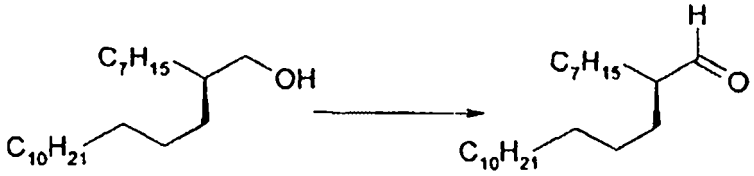
A una disolución de la olefina (1,02 g) en EtOAc se añadió paladio sobre carbón (126 mg) y la mezcla se puso en atmósfera de hidrógeno. Después de 4 horas, la mezcla se trató de la forma habitual para dar 1,0 g.



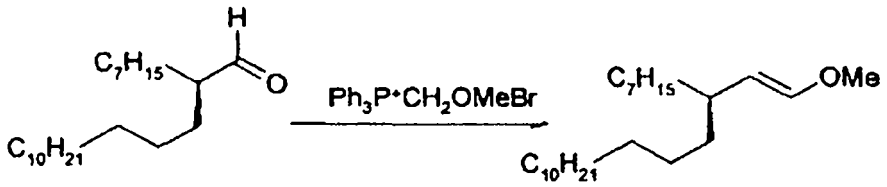
A una disolución de la amida (1,0 g) en THF enfriado con hielo (20 ml) se añadió agua, peróxido de hidrógeno e hidróxido de litio. Al día siguiente, la mezcla se trató de la forma habitual para dar 590 mg de ácido.



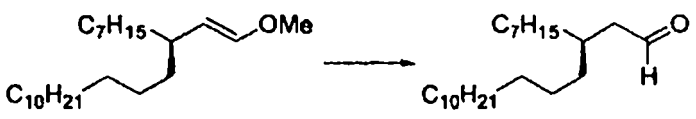
A una disolución del ácido en THF enfriado con hielo (10 ml) se añadió complejo de diborano:THF y la mezcla se dejó calentar lentamente. Después de 7 horas, se añadió con cuidado ácido clorhídrico diluido y la mezcla se trató de la forma habitual. El material bruto se disolvió en éter etílico enfriado con hielo y se añadió disolución de LAH (2 ml, 1 M). Después de 5 minutos, la mezcla se trató de la forma habitual para dar 556 mg del alcohol.



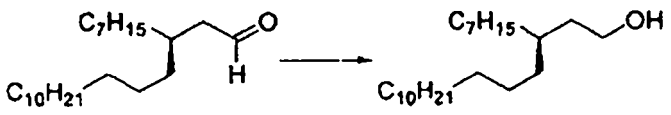
A una disolución a -78ºC de cloruro de oxalilo (2,2 ml) en cloruro de metileno (10 ml) se añadió DMSO (1,1 ml) y después de 2 minutos se añadió el alcohol (556 mg) en cloruro de metileno (5 ml). Después de 20 minutos, se añadió trietilamina (1 ml) y la mezcla se calentó a 0ºC. La mezcla se diluyó con éter dietílico y se trató de la forma habitual para dar 567 mg.



El reactivo de Wittig (679 mg) se suspendió en THF (10 ml) y se añadió disolución de KHMDS (4 ml de 0,5 M). Después de 20 minutos, la mezcla se enfrió a -78ºC y se añadió el aldehído (567 mg) en THF (5 ml). Después de 15 minutos, la mezcla se trató de la forma habitual para dar 342 mg.



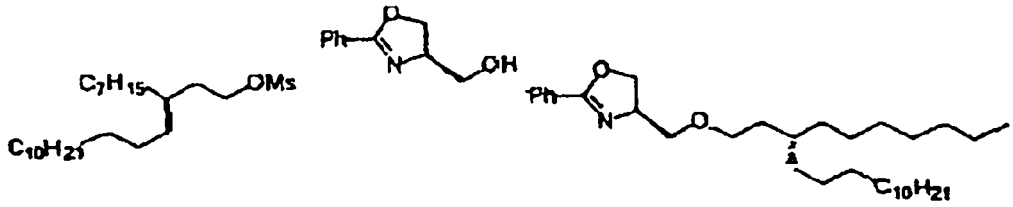
A una disolución del enol-éter (342 mg) en acetonitrilo (3,5 ml) y agua (0,15 ml) se añadió ácido yodhídrico. Después de 4 horas, la mezcla se trató de la forma habitual para dar 325 mg.



A una disolución del aldehído (325 mg) en metanol (10 ml) se añadió borohidruro sódico (38 mg). Después de 3 horas, la reacción se trató de la forma habitual para dar 303 mg del alcohol.



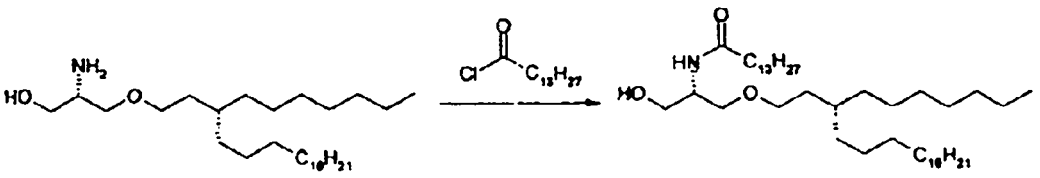
A una disolución enfriada con hielo del alcohol (303 mg) en cloruro de metileno (10 ml) se añadió trietilamina (150 μl) y cloruro de mesilo (76 μl). Después de 4 horas, la reacción se trató de la forma habitual para dar 352 mg.



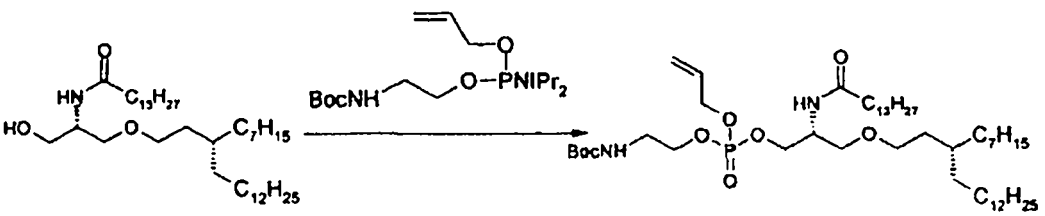
A una disolución de la oxazolina (1 ml) en THF enfriado con hielo (5 ml) se añadió disolución de t-butóxido potásico (2,2 ml de 1 M). Después de 30 minutos, se añadió el mesilato en THF (5 ml) y la mezcla se agitó durante 8 horas. El tratamiento habitual dio 318,5 mg.



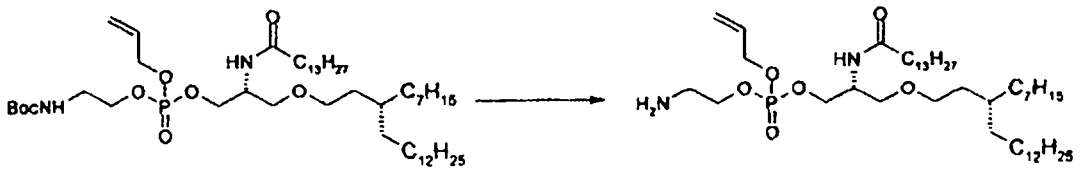
Una disolución de la oxazolina en metanol (8 ml) y ácido clorhídrico (4 ml de 4 M) se calentó a 50ºC durante 90 minutos. Se añadió metanol adicional y se separó el disolvente. El residuo se disolvió en metanol (8 ml) y disolución de hidróxido sódico (4 ml) y se calentó brevemente a 50ºC. La mezcla se enfrió y se extrajo con cloroformo. El tratamiento habitual dio 114 mg.



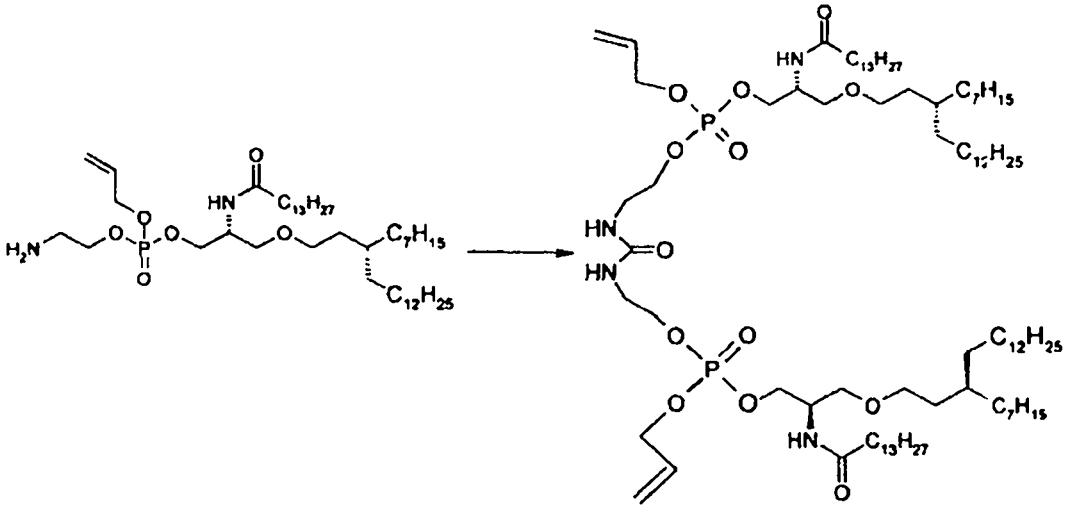
A una disolución de la amina (114 mg) en THF (2 rnl) y disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (2 ml) se añadió cloruro de ácido adicional. Después de 30 minutos, la reacción se trató de la forma habitual para dar 146 mg.



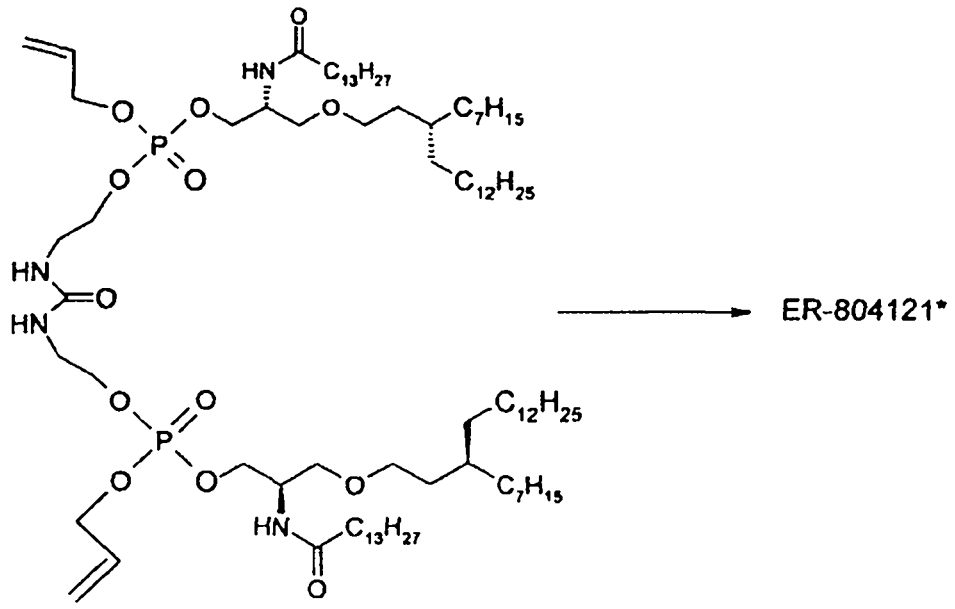
A una disolución de tetrazol (48 mg) y el reactivo de fosforilación (122 mg) en cloruro de metileno enfriado con hielo (2 ml) se añadió el alcohol (146 mg). Se añadió Oxone (230 mg) en agua (1 ml) y THF (2 ml). Después de 90 minutos, se usó tiosulfato para inactivar la reacción. El tratamiento estándar dio 140 mg.



A una disolución del sustrato en cloruro de metileno enfriado con hielo se añadió trietilsilano (370 μl) y ácido trifluoroacético (110 μl). Después de 5 minutos, se separaron los productos volátiles para dar 148 mg.



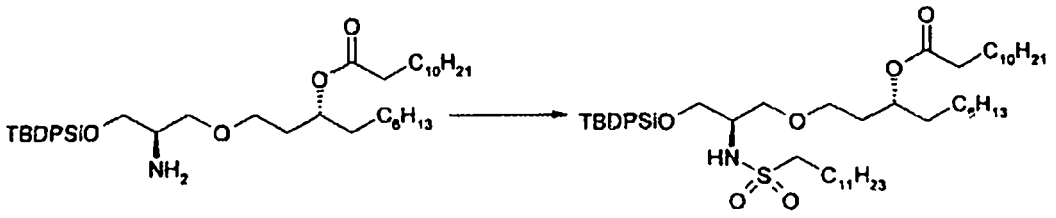
A una disolución de la amina (66,9 mg) en cloruro de metileno enfriado con hielo (0,8 ml) se añadió disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (0,8 ml) y disolución de fosgeno (20 μl de 1,93 M). Después de 1 hora, se añadió fosgeno adicional (10 μl). Después de 30 minutos, el tratamiento habitual dio 47,7 mg.



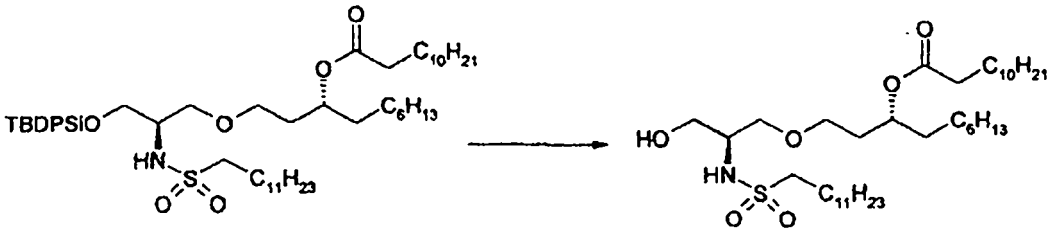
A una disolución de fenilsilano (15 μl), tetrakis(trifenilfsofina)paladio(0) (24,8 mg) en cloroformo enfriado con hielo en una atmósfera inerte, se añadió el sustrato.

Después de 5 minutos, la mezcla se aplicó a una columna de DEAE y se cromatografió para dar 31 mg de ER-804130*.

*Preparación de ER-804558**



A una disolución de la amina (325 mg) en cloruro de metileno, se añadió trietilamina (321 μl) y cloruro de 1-dodecanesulfonilo. Después de 3 horas, el tratamiento habitual dio 384 mg.

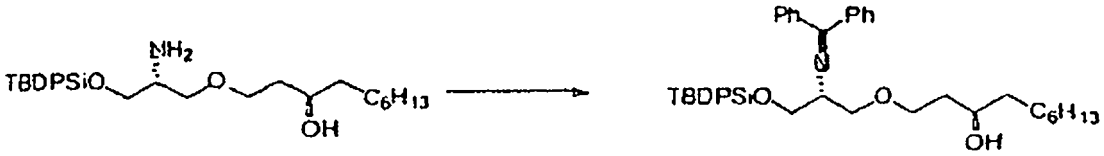


A una disolución del alcohol protegido (384 mg) en THF (4 ml) se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (123 mg) y ácido acético (29 μl). Después de 2 horas, el tratamiento habitual dio 180 mg.

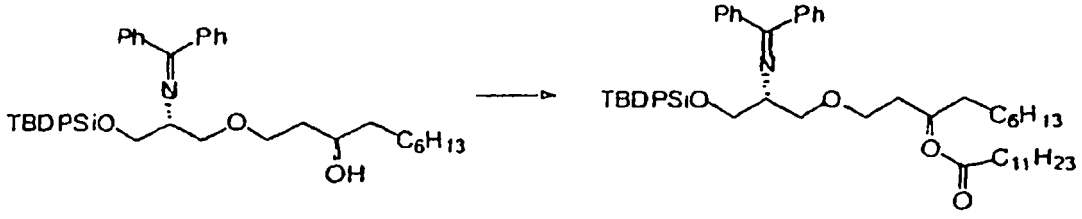
El resto de la síntesis se completó como se ha descrito antes para otros compuestos de la presente invención, es decir, fosforilación, desbloqueo, acoplamiento con fosgeno y desprotección con fenilsilano y paladio.

*Preparación de ER-804442**

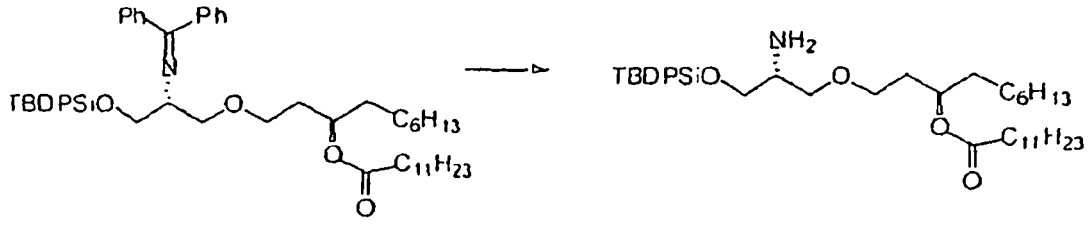
La diolamina se monoprotegió en forma de su éter de t-butildifenilsililo descrito antes.



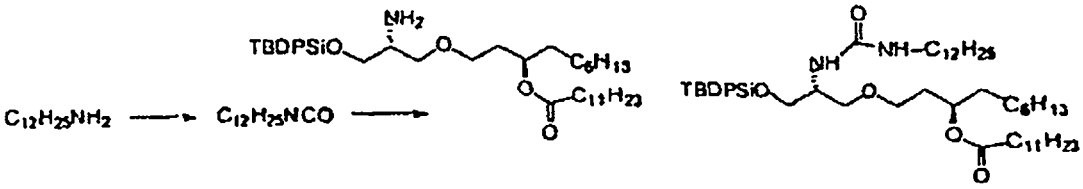
Se mezclaron la amina (2,6 g) y la imina de benzofenona (1,1 ml) y se calentaron a 40ºC durante 4 días para dar después de cromatografía 3,3 g.



A una disolución de la imina (3,3 g) en cloruro de metileno enfriada con hielo, se añadieron ácido láurico (1,5 g), EDC (1,7 g) y DMAP (155 mg). Al día siguiente la reacción se trató de la forma habitual para dar 3,15 g.



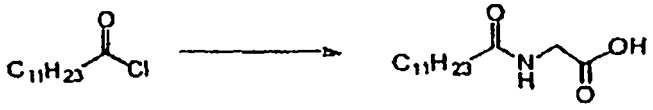
A una disolución de la imina (3,14 g) en éter dietílico se añadió ácido clorhídrico acuoso 1 N. Al día siguiente, la reacción se trató de la forma habitual para dar 2,81 g.



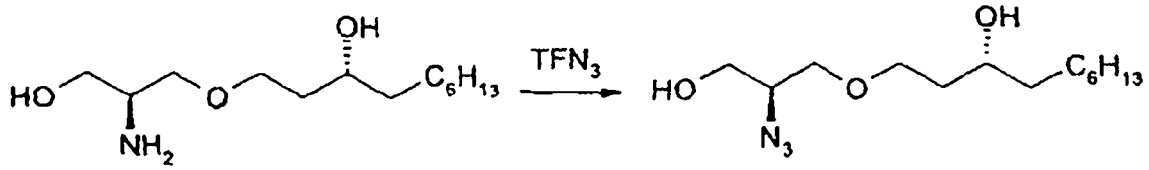
A una disolución de cloroformiato de triclorometilo (12 μl) en cloruro de metileno enfriado con hielo (250 μl) se añadió dodecilamina (18 μl) y diisopropiletilamina (27 μl). Después de 30 minutos, se separó el disolvente. El residuo se disolvió en cloruro de metileno enfriado con hielo, al que se añadió la amina (55,6 mg) y diisopropiletilamina adicional (13 μl). Después de 2 horas, el tratamiento habitual después de cromatografía dio 60,9 mg.

Este producto se desprotegió con fluoruro, se fosforiló, se desprotegió con TFA, se dimerizó con fosgeno y se desbloqueó con fenilsilano y paladio como se ha descrito antes, para dar el compuesto ER-804442.

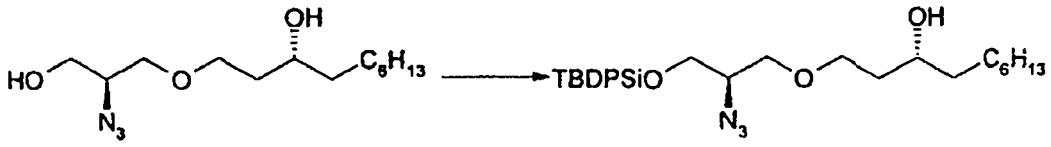
*Preparación de ER-804221**



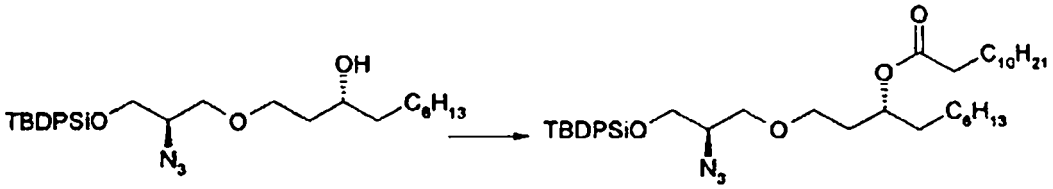
A una disolución enfriada con hielo de glicina (8,26 g) en hidróxido sódico acuoso (4,4 g en 60 ml) se añadió cloruro de lauroilo (21,8 g). Después de 1 hora, se añadió ácido y la mezcla se trató de la forma habitual. La recristalización en acetato de etilo dio 9,7 g.



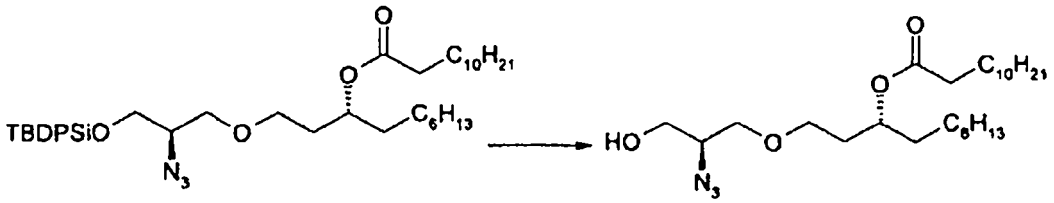
A una disolución enfriada con hielo de la amina (1,4 g) en metanol se añadió azida tríflica (20 mg). Al día siguiente, se añadió azida adicional. Después de 2 horas, la reacción se trató de la forma habitual para dar después de cromatografía 1,14 g.



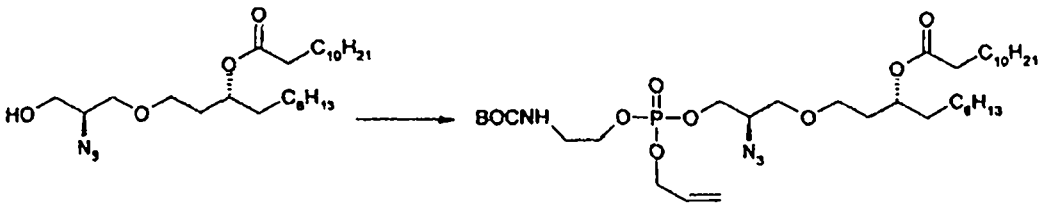
A una disolución del alcohol (1,14 g) en cloruro de metileno se añadió cloruro de t-butil-difenilsililo (1,09 ml), trietilamina (1,8 ml) y DMAP (50 mg). Después de 3 horas, el tratamiento habitual dio 1,4 g.



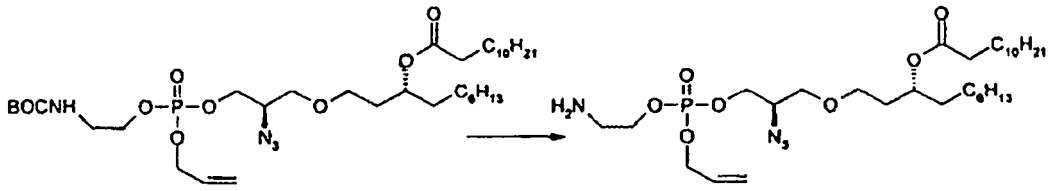
A una disolución del alcohol (1,4 g) en cloruro de metileno enfriado con hielo, se añadió ácido láurico (826 mg), EDC (1,05 g) y DMAP (33 mg). Al día siguiente, el tratamiento habitual dio después de cromatografía 778 mg.



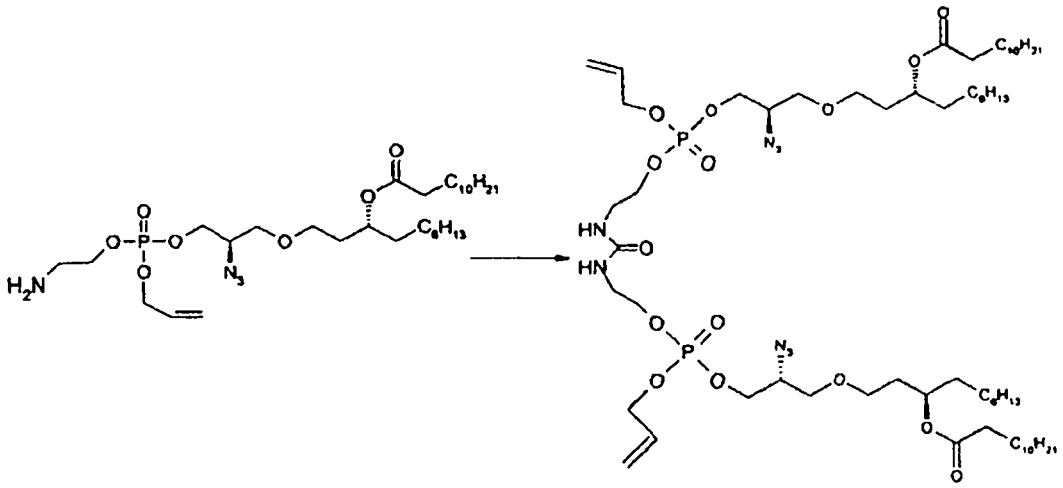
A una disolución de la azida (778 mg) en THF se añadió ácido acético (77 μl) y TBAF (323 mg). Al día siguiente, el tratamiento habitual dio después de cromatografía 428 mg.



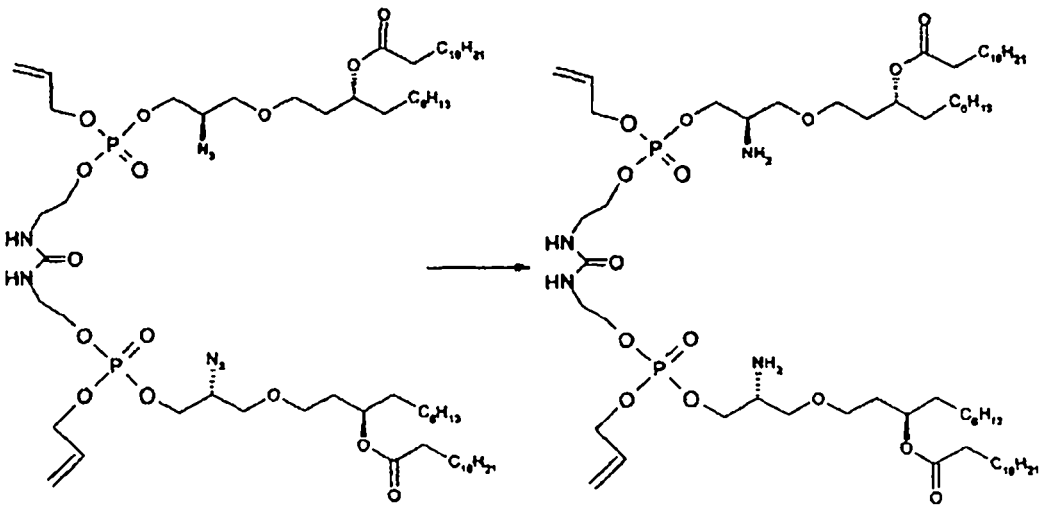
A una disolución de la azida (460 mg) en cloruro de metileno se añadieron tetrazol (165 mg), el reactivo de fosforilación (390 mg), y después de 30 minutos, Oxone en agua (722 mg en 3 ml). La reacción se inactivó con tiosulfato. El tratamiento habitual después de cromatografía dio 392 mg.



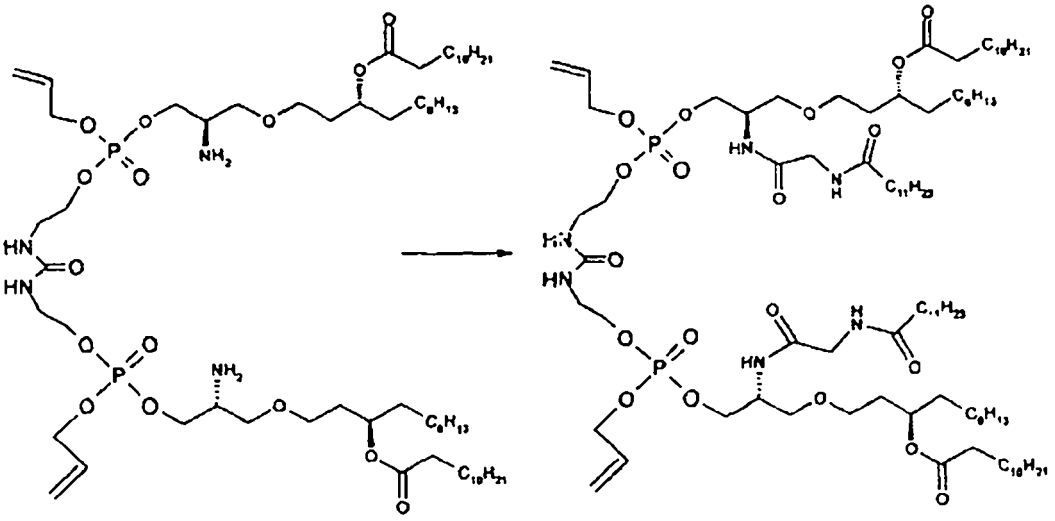
La amina protegida (460 mg) se disolvió en cloruro de metileno y se añadieron ácido trifluoroacético (394 μl) y trietilsilano (308 μl). Después de 1,5 horas, el tratamiento habitual dio, 392 mg.



A una disolución enfriada con hielo de la amina en cloruro de metileno (5,5 ml) se añadieron disolución saturada de bicarbonato sódico (5,5 ml) y fosgeno (164 μl de una disolución 1,93 M en tolueno). Después de 15 minutos, el tratamiento habitual dio después de cromatografía 342 mg.



A una disolución enfriada con hielo de la azida (187 mg) en cloruro de metileno se añadió el reactivo de estaño (1,5 ml) que se preparó como se describe en el documento de EE.UU. 5.756.718 incorporado en esta memoria por referencia. Después de 30 minutos, la mezcla se cromatografió para dar 187 mg.

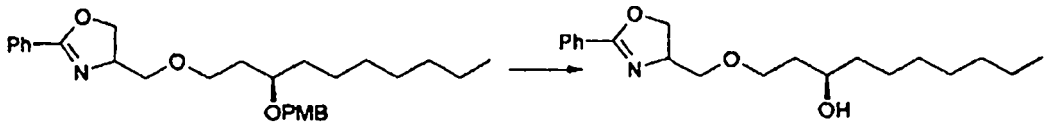


A una disolución enfriada con hielo de la urea (55 mg) en cloruro de metileno se añadió el ácido (59 mg) (preparado como antes) y EDC (44 mg). Al día siguiente, se añadieron EDC (5 mg) y ácido (5 mg) adicionales. Después de 2 horas, el tratamiento habitual proporcionó 45,7 mg.

La separación normal de los grupos protectores con fenilsilano dio el compuesto ER-804221*.

El compuesto ER-804222* se preparó de una forma similar excepto que para el producto de condensación entre el cloruro de laurilo y la glicina se usó el ácido 15-metilmirístico.

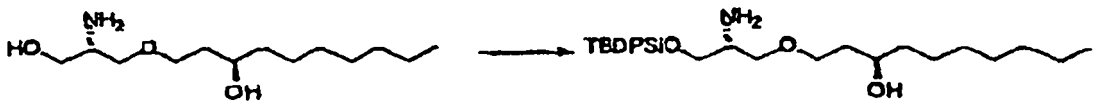
*Preparación de ER-804281**



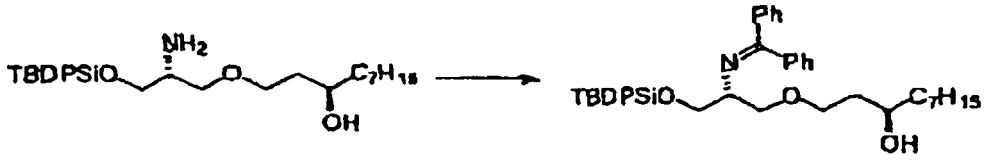
A una disolución enfriada con hielo del alcohol protegido (8,3 g) en acetonitrilo:agua, se añadió CAN (41,4 g). Después de 1 hora, el tratamiento habitual dio 5,7 g.



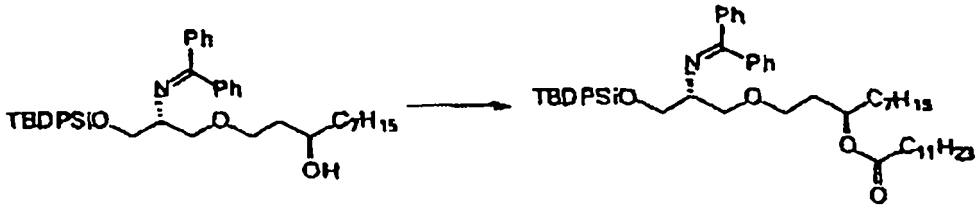
Una disolución del alcohol (5,63 g) en disolución de HCl 4 N se calentó a reflujo durante 1 hora, se enfrió, se neutralizó con hidróxido sódico y se trató de la forma habitual para dar 2,1 g.



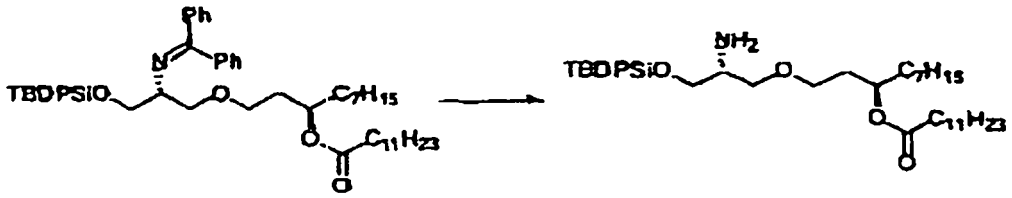
A una disolución enfriada con hielo del alcohol (2,2 g) en cloruro de metileno se añadieron imidazol (0,7 g), cloruro de t-butil-difenilsililo en 15 ml de cloruro de metileno. Al día siguiente, el tratamiento habitual dio 1,54 g.



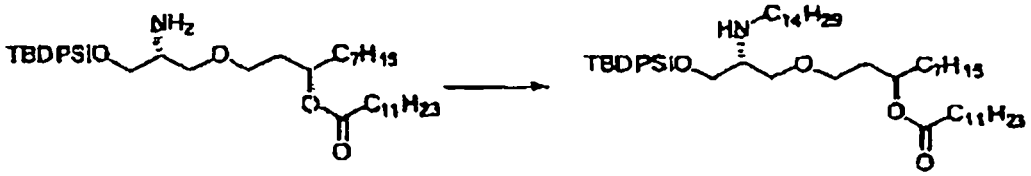
A una disolución del alcohol (1,93 g) en cloruro de metileno (40 ml) se añadió la imina de benzofenona (0,8 ml). Después de 1 día, la mezcla se calentó a reflujo durante la noche. El tratamiento habitual dio 1,67 g.



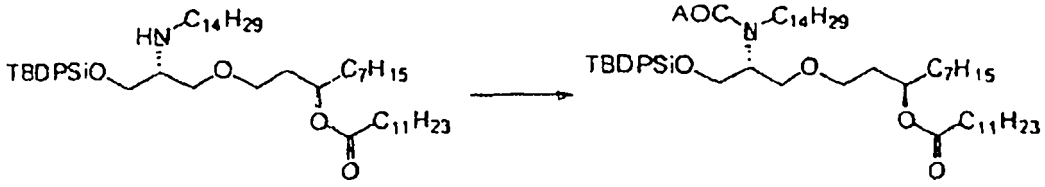
A una disolución enfriada con hielo del alcohol (1,67 g) en cloruro de metileno se añadieron DMAP (159 mg), EDC (0,99 g) y ácido láurico (1,04 g). Después de 1 día, el tratamiento habitual dio 74% de rendimiento



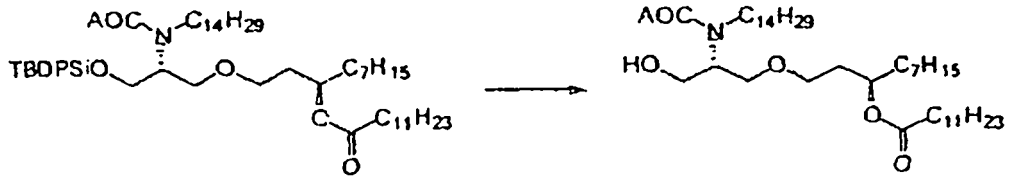
A una disolución enfriada con hielo de la imina (2,9 g) en éter dietílico (50 ml) se añadió HCI 1 N (50 ml). Al día siguiente, el tratamiento habitual dio 2,09 g.



A una disolución de la amina (1,24 g) en dicloroetano se añadió cianoborohidruro sódico (178 mg) y tetradecanal (411 mg). Al día siguiente, el tratamiento habitual dio 1,5 g.



A una disolución enfriada con hielo de la amina (221 mg) en dioxano se añadió cloroformiato de alilo (40 mg) y 308 μl de disolución de NaOH 1 N. Después de 2 horas, el tratamiento habitual dio 200 mg.



A una disolución enfriada con hielo del alcohol protegido (365 mg) en THF se añadieron TBAF (1924 μl) y ácido acético (122 μl). Al día siguiente, el tratamiento habitual dio 271 mg.

Este material se fosforiló, se desbloqueó con TFA, se dimerizó con fosgeno y se eliminaron los grupos protectores alilo con fenilsilano y paladio como se ha descrito antes para dar el compuesto ER-804281.

*Preparación de ER-804339**

ER-804281 → ER-804339

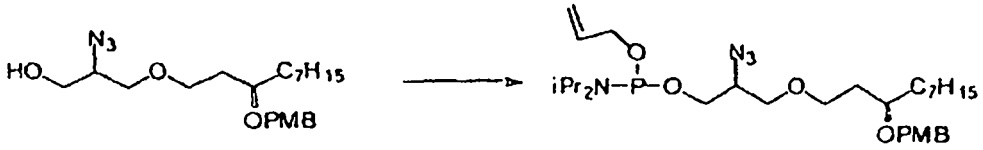
A una disolución enfriada con hielo del compuesto ER-804281 (7 mg) en cloruro de metileno se añadió trietilamina (5 μl), DMAP (0,6 mg) y cloruro de acetilo (1,3 μl). Después de 4 días, el tratamiento habitual dio 1,1 mg.

*Preparación de ER-804674**

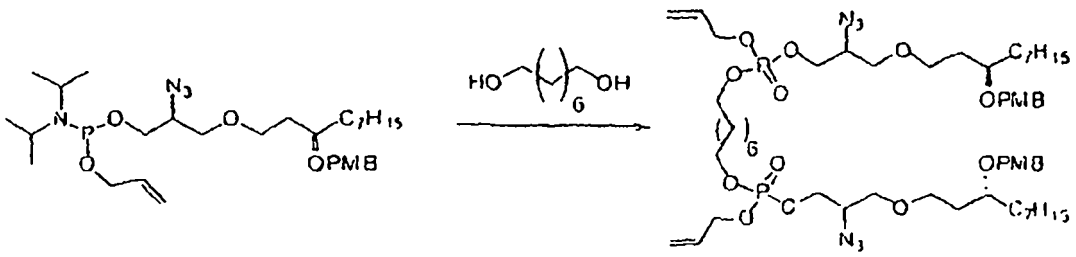
ER-804281 → ER-804674

A una disolución del compuesto ER-804281 (12,7 mg) en THF (1,0 ml) se añadió yoduro de metilo (9,2 mg) y bicarbonato sódico (6,8 mg). La mezcla se agitó durante 5 días y se añadieron bicarbonato de sodio (14 mg) y yoduro de metilo (8 ml) adicionales. Después de 3 días adicionales, se añadieron bicarbonato (28 mg) y Mel (16 μl) adicionales. Después de 6 días adicionales, la mezcla se trató para dar 9,1 mg del producto.

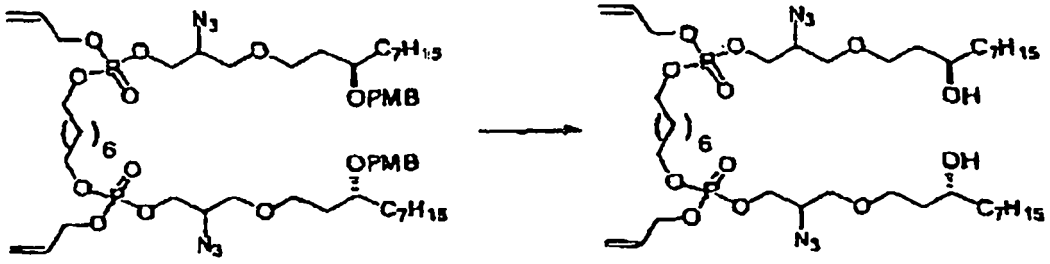
*Preparación de ER-804596**



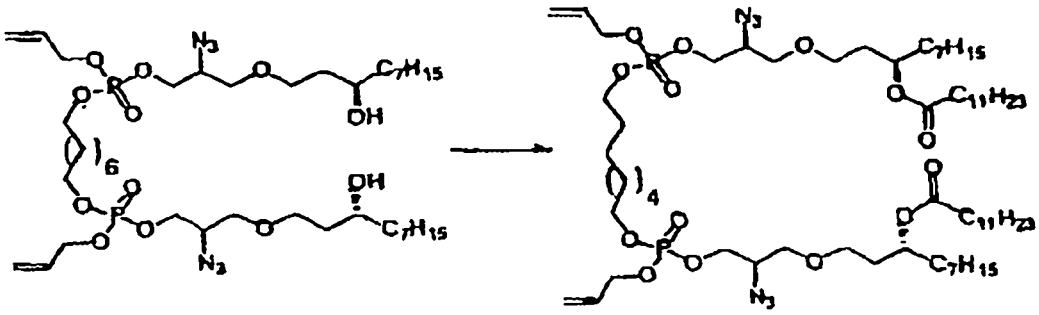
A una disolución del alcohol (393 mg) en cloruro de metileno (2 ml) se añadieron diisopropilamina (210 μl), tetrazol (105 mg) y reactivo de fosforilación (como se ha descrito antes) (488 mg). Después de 2 1/5 horas, el tratamiento habitual dio el producto deseado.



A una disolución del diol (73 mg) en acetonitrilo se añadieron tetrazol (175 mg) y la azida (1 equivalente). Después de 3 horas, la mezcla se enfrió y se añadió ozono (1229 mg). Al día siguiente, el tratamiento habitual dio el producto deseado.



A una disolución enfriada con hielo del alcohol protegido (929 mg) en acetonitrilo:agua (6 ml:1,5 ml) se añadió CAN (358 mg). Después de 1 hora, el tratamiento habitual proporcionó 68,5 mg.



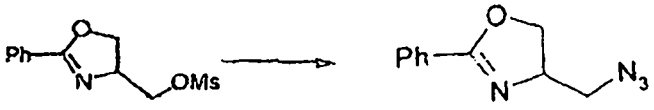
A una disolución enfriada con hielo del diol (68,5 mg) en cloruro de metileno se añadieron ácido láurico (76,5 mg), DMAP (4,7 mg) y EDC (73 mg). Al día siguiente, el tratamiento habitual dio 76,5 mg.

Las azidas se redujeron usando el reactivo de estaño descrito antes. La diamina se aciló con cloruro de dodecanoilo y se eliminaron los grupos protectores con fenilsilano y paladio como se ha descrito antes para dar el compuesto ER-804596.

*Preparación de ER-804732**



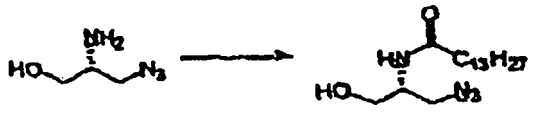
El alcohol (7,04 g) se disolvió en cloruro de metileno (300 ml) con trietilamina (11,13 ml) y después se enfrió a 0ºC en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (3,69 ml) y después de esto la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El tratamiento habitual dio 5,551 g.



El compuesto mesilado (1,114 g) se disolvió en DMF (30 ml) seguido de azida sódica (0,9337 g). La mezcla de reacción se calentó a 57ºC y se agitó durante 16 horas y después a 104ºC durante 3 horas adicionales. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se trató de la forma habitual y dio 0,466 g.



El aminoalcohol protegido (0,466 g) se hidrolizó usando HCI 4 N (15 ml) a 107ºC durante 3 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y se extrajo con éter dietílico, se secó, se concentró y se usó en la siguiente reacción.



El aminoalcohol bruto se disolvió en THF (5 ml) con disolución saturada de bicarbonato sódico (6 ml) y se enfrió a 0ºC. Se añadió gota a gota cloruro de miristoilo (0,79 ml) después de lo cual la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se trató usando los métodos habituales y dio 0,751 g.



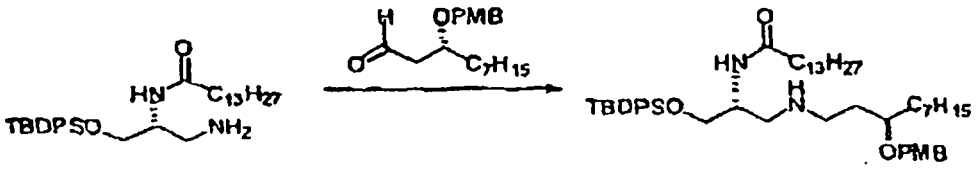
El alcohol (0,185 g) se disolvió en DMF (3,0 ml) con imidazol (0,077 g) y cloruro de terc-butildifenilsililo (0,197 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas después de lo cual el tratamiento habitual dio 0,320 g.



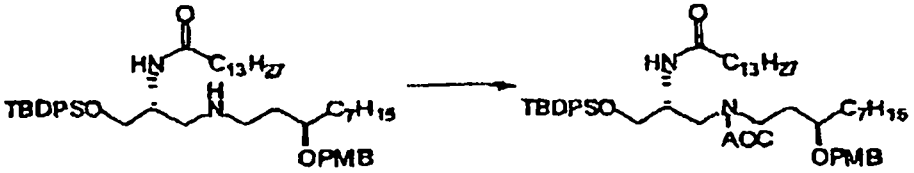
La azida (0,975 g) se disolvió en metanol (20 ml) con paladio sobre carbón al 10% (0,180 g). La mezcla se agitó en una atmósfera de hidrógeno gaseoso a presión atmosférica durante 2 horas, después de lo cual se evacuó el gas y la mezcla se filtró sobre Celite 545 y se concentró. La purificación usando los métodos habituales dio 0,873 g.



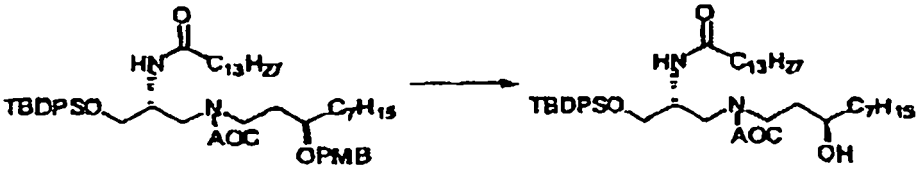
Se añadió gota a gota DMSO (1,5 ml) a cloruro de oxalilo (0,92 ml) en cloruro de metileno (30 ml) a -78ºC. Después de agitar durante 15 minutos, se añadió gota a gota el alcohol (1,727 g) en cloruro de metileno (30 ml) y se agitó durante 30 minutos adicionales. Se añadió gota a gota trietilamina (4,90 ml), la reacción se calentó a 0ºC y se inactivó usando cloruro amónico saturado. La purificación del producto bruto usando cromatografía en gel de sílice con acetato de etilo en hexanos al 20% dio 1,653 g.



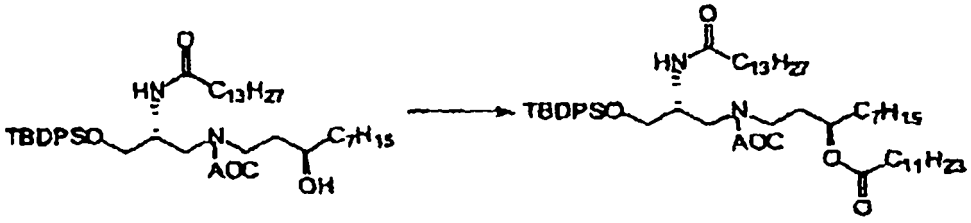
La amina primaria (0,135 g) y el aldehído (0,077 g) se disolvieron en 1,2-dicloroetano (5 ml) seguido de la adición de cianoborohidruro sódico (0,032 g). La reacción se agitó durante 20 horas después de lo cual se añadió ácido acético (0,02 ml) y la reacción se trató de la forma habitual para dar 0,103 g.



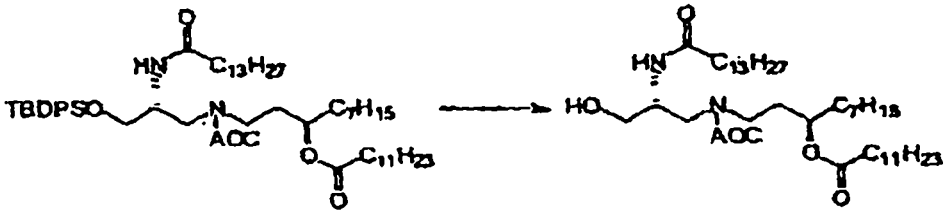
La amina secundaria se disolvió en 1,4-dioxano (15 ml) y se enfrió a 0ºC seguido de la adición lenta de hidróxido sódico 1 M (3,0 ml). Después de agitar durante 10 minutos se añadió gota a gota cloroformiato de alilo (0,236 ml) después de lo cual la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. El tratamiento de la forma habitual dio 0,613 g.



El éter de para-metoxibencilo (0,613 g) se disolvió en una relación 4 a 1 de acetonitrilo a agua (15 ml), se enfrió a 0ºC y después se añadió CAN (1525 g). La mezcla de reacción se agitó a 0ºC durante 2 horas y después se trató de la forma habitual para dar 0,357 g.



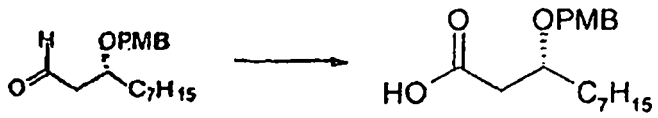
El alcohol (0,357 g) se disolvió en cloruro de metileno (5 ml) con ácido láurico (0,184 g) y EDC (0,175 g), y se enfrió a 0ºC. Se añadió 4-dimetilaminopiridina (0,012 g) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El tratamiento de la forma habitual dio 0,436 g.



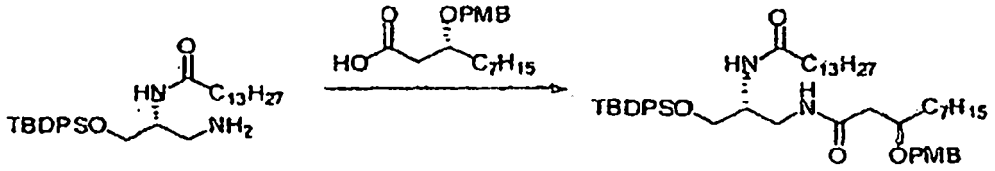
El alcohol protegido con sililo (0,211 g) se disolvió en THF (5 ml) con ácido acético (0,03 ml). Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (0,115 g) en una porción y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Un tratamiento normal dio 0,150 g.

Este material se fosforiló, se desbloqueó con TFA, se dimerizó con fosgeno y se eliminaron los grupos protectores alilo con fenilsilano y paladio como se ha descrito antes para dar el compuesto ER-804732.

*Preparación de ER-804680**



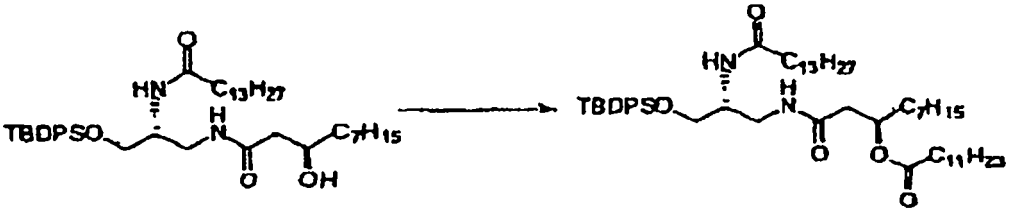
El aldehído (1,54 g) se disolvió en THF (28 ml) y se enfrió a 0ºC después de lo cual se añadieron 2-metil-2-buteno (14 ml) y alcohol terc-butílico (28 ml). Se añadieron una suspensión agitada de clorito sódico (3,70 g) y trihidrógenofosfato de sodio (4,09 g) en agua (42,7 ml) a la mezcla anterior y se agitó a 0ºC durante 1,5 horas. La reacción completada se diluyó con acetato de etilo (100 ml) y se lavó con bisulfito sódico al 10% y salmuera, se secó, se concentró y se cromatografió en gel de sílice para dar 1,55 g.



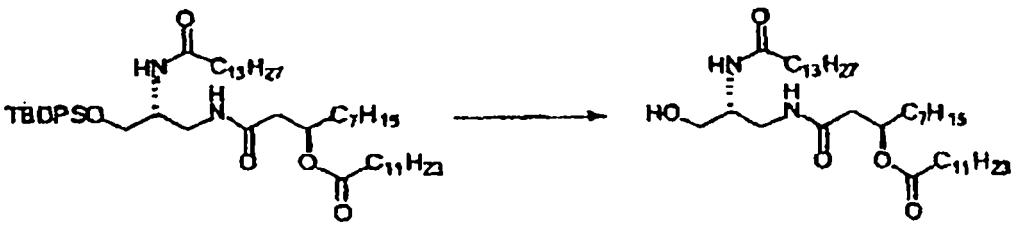
La amina (0,553 g) y el ácido (0,381 g) se mezclaron en cloruro de metileno (8 ml) y se enfriaron a 0ºC, después de lo cual se añadió EDC (0,230 g) y la mezcla reacción se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. El tratamiento habitual dio 0,567 g.



El éter de metoxibencilo (0,567 g) se disolvió en una relación 1 a 1 de acetonitrilo a agua (16 ml) con cloruro de metileno (8 ml) y se enfrió a 0ºC. Se añadió CAN (1,53 g) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora después de lo cual se trató de la forma habitual para dar el alcohol bruto.



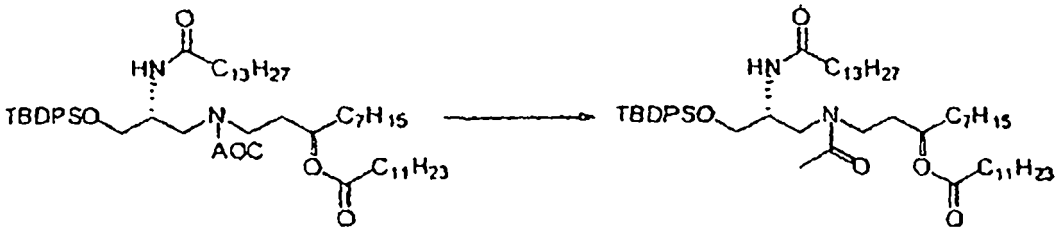
El alcohol bruto anterior se disolvió en cloruro de metileno (15 ml) con ácido láurico (0,280 g) y 4-dimetilaminopiridina (0,017 g). La mezcla de reacción se enfrió a 0ºC y se añadió EDC (0,267 g) en una porción, después de lo cual la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. El tratamiento normal produjo 0,622 g.



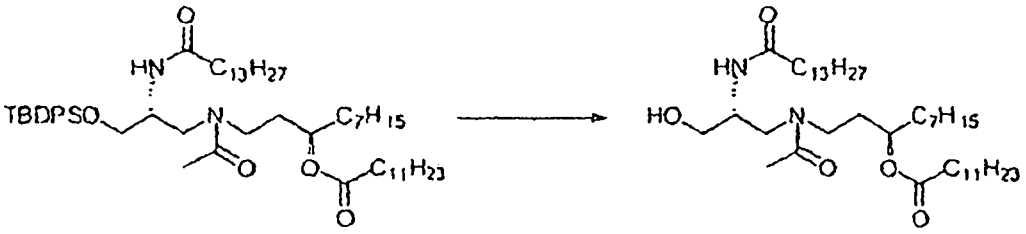
El éter de sililo (0,563 g) se disolvió en THF (10 ml) con ácido acético (0,087 ml). Se añadió fluoruro de terc-butilamonio (0,330 g) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El tratamiento de la forma habitual dio 0,384 g.

Este material se fosforiló, se desbloqueó con TFA, se dimerizó con fosgeno y se eliminaron los grupos protectores alilo con fenilsilano y paladio como se ha descrito antes para dar el compuesto ER-804780.

*Preparación de ER-804679**



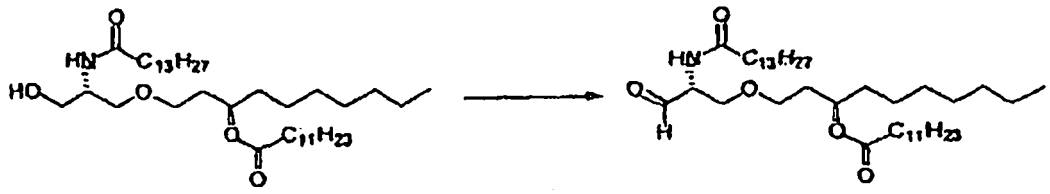
La amina secundaria protegida (0,071 g) se disolvió en cloroformo desgasificado (3 ml) con fenilsilano (0,017 ml) y anhídrido acético (0,014 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0ºC y después se añadió tetrakis(trifenilfosfina) paladio(0) (0,002 g). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se dejó agitar durante 30 minutos. La reacción completada se diluyó con cloruro de metileno, se lavó con agua, se secó, se concentró y se cromatografió para dar 0,068 g.



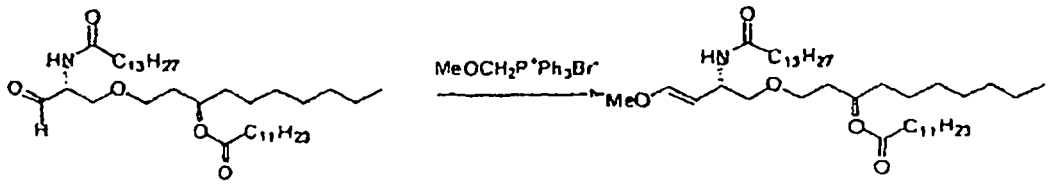
El éter de sililo se desprotegió en THF (5 ml) con ácido acético (0,025 ml) y con la adición de fluoruro de terc-butilamonio (0,092 g). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas la reacción se trató de la forma habitual para dar 0,120 g.

Este material se fosforiló, se desbloqueó con TFA, se dimerizó con fosgeno y se eliminaron los grupos protectores alilo con fenilsilano y paladio como se ha descrito antes para dar el compuesto ER-804679.

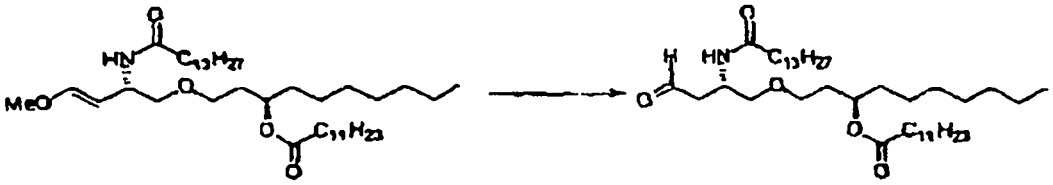
*Preparación de ER-804764**



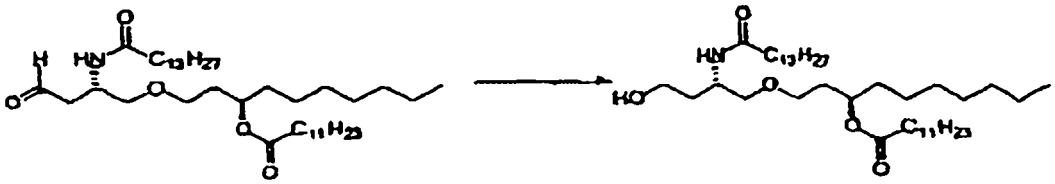
Se añadió gota a gota DMSO (0,33 ml) a cloruro de oxalilo (0,203 ml) en cloruro de metileno (10 ml) a 78ºC. Después de agitar durante 15 minutos, se añadió gota a gota el alcohol (0,993 g) en cloruro de metileno (3 ml) y se agitó durante 30 minutos adicionales. Se añadió gota a gota trietilamina (1,08 ml), la reacción se calentó a 0ºC y se inactivó usando cloruro amónico saturado. La purificación del producto bruto usando cromatografía en gel de sílice con acetato de etilo en hexanos al 20% dio 0,743 g.



Se añadió gota a gota n-butil-litio 1,6 M en hexanos (1,5 ml) a la sal de fosfonio (0,797 g) en THF (10 ml) a 0ºC. Después de agitar durante 30 minutos, se añadió gota a gota el aldehído (0,734 g) en THF (15 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la reacción se trató de la forma habitual para dar 0,193 g.



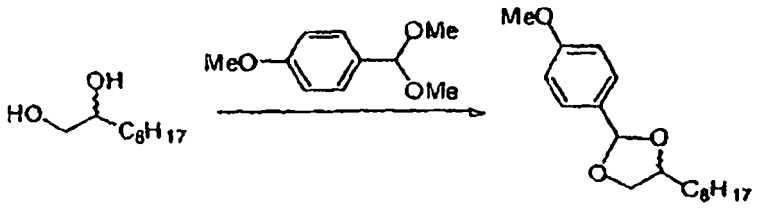
El enol-éter (0,193 g) se hidrolizó con yoduro de hidrógeno al 57% (0,114 litros) en acetonitrilo (2 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se inactivó con disolución saturada de bicarbonato sódico, se extrajo con cloruro de metileno, y se secó para dar 0,211 g del aldehído bruto.



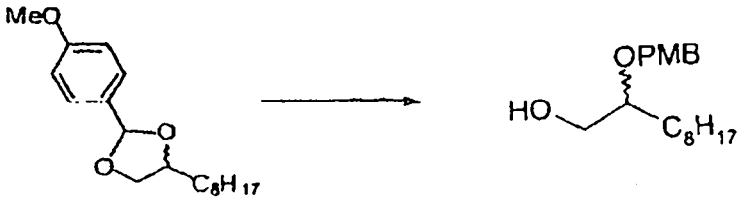
El aldehído bruto (0,211 g) se disolvió en metanol (3 ml) y se añadió borohidruro sódico (0,033 g) a 0ºC. Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se diluyó con agua, se extrajo con cloruro de metileno, se secó, se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice para dar 0,148 g.

Este material se fosforiló, se desbloqueó con TFA, se dimerizó con fosgeno y se eliminaron los grupos protectores alilo con fenilsilano y paladio como se ha descrito antes para dar el compuesto ER-804764.

*Preparación de ER-804772**



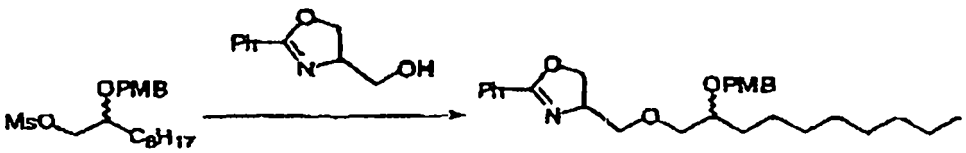
El diol disponible en el comercio (1,486 g) se mezcló con el acetal (1,864 g) y ácido *para*-toluenosulfónico (0,195 g) en DMF (10 ml). Después de agitar durante 20 horas a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno, la reacción se inactivó con disolución saturada de bicarbonato sódico, se extrajo con cloruro de metileno, se secó y se concentró con alto vacío. La cromatografía en gel de sílice del producto bruto resultante usando acetato de etilo en hexanos al 10% dio 2,084 g.



El acetal (2,084 g) se enfrió a -78ºC en atmósfera de nitrógeno en cloruro de metileno (30 ml) y después se añadió gota a gota DIBAL 1,0 M en hexanos (14,3 ml). Después se añadió DIBAL (14 ml) adicional, la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora, se calentó a temperatura ambiente y se inactivó con tartrato de sodio y potasio. El tratamiento habitual dio 2,1 g.



El alcohol (1,286 g) se mezcló con trietilamina (0,883 g) en cloruro de metileno (15 ml) y se enfrió a 0ºC. Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (0,575 g) y después se agitó durante 20 minutos a 0ºC y a temperatura ambiente durante 2 horas. El tratamiento normal dio 1,496 g.

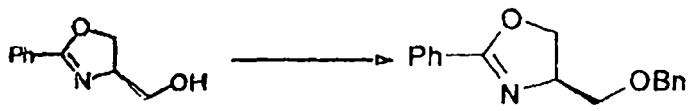


El alcohol (1,495 g) en DMF (10 ml) se añadió gota a gota a una suspensión en agitación de hidruro sódico al 60% lavado (0,257 g) en DMF (20 ml) a 0ºC. Después de agitar durante 3 horas, se añadió gota a gota el mesilato (0,925 g) en DMF (10 ml). Después de agitar durante 3 días adicionales, la reacción se inactivó y se trató de la forma habitual para dar 0,905 g.

Como en los ejemplos proporcionados antes, el grupo protector para-metoxibencilo se hidrolizó con CAN, el amino-alcohol protegido se hidrolizó usando HCl acuoso y después KOH, la amina se aciló con cloruro de tetradecanoilo, el alcohol primario se sililó con TBDPS, el alcohol secundario se aciló con cloruro de dodecanoilo, y el grupo protector sililo se hidrolizó usando TBAF, para dar el alcohol primario. Este material se fosforiló, se desbloqueó con TFA, se

dimerizó con fosgeno y se eliminaron los grupos protectores alilo con fenilsilano y paladio como se ha descrito antes para dar el compuesto ER-804772.

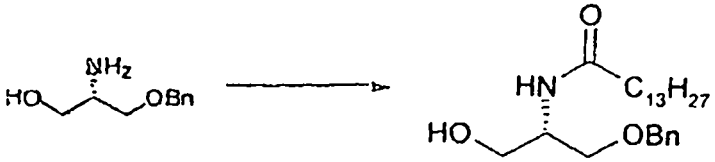
*Preparación de ER-804947**



El alcohol (0,263 g) en THF (5 ml) se añadió gota a gota a hidruro sódico al 60% lavado (0,216 g) en DMF (2,0 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos después de lo cual se añadieron bromuro de bencilo (0,272 ml) con una cantidad catalítica de yoduro de tetrabutilamonio (0,05 g). La mezcla de reacción final se agitó durante 1 hora adicional, después de lo cual la mezcla se inactivó y se trató de la forma habitual para dar 0,365 g.

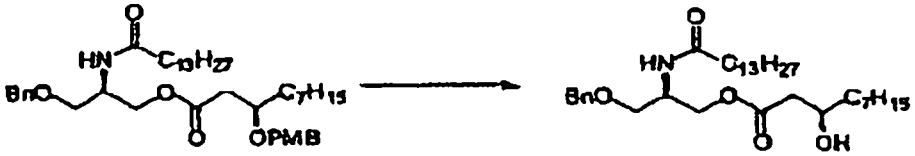


El aminoalcohol protegido (0,189 g) se hdirolizó usando ácido clorhídrico 4 N (2,5 ml) seguido de hidróxido sódico al 40% (2,5 ml) como se ha descrito previamente para proporcionar 0,121 g.

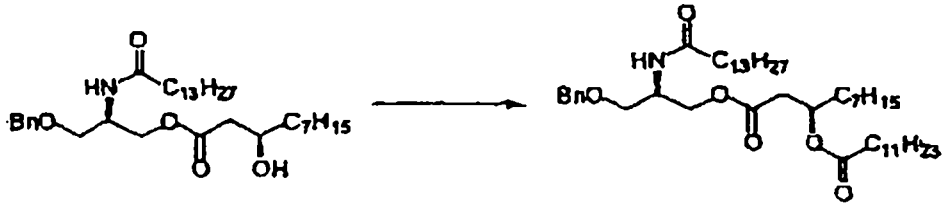


El aminoalcohol (0,121 g) se disolvió en cloruro de metileno (2 ml) con disolución saturada de bicarbonato sódico (2 ml). Después de enfriar a 0ºC se añadió gota a gota cloruro de miristoilo (0,199 ml). Después de continuar agitando durante 2 horas la mezcla se trató de la forma habitual y dio 0,181 g.

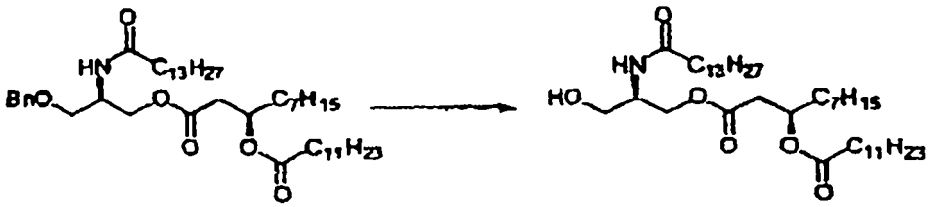
El alcohol (0,181 g) se disolvió en cloruro de metileno (5 ml) con el ácido (0,180 g) y 1-[3-(dirnetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC 0,133 g). La mezcla se enfrió a 0ºC y se añadió 4-dimetilaminopiridina agitando durante 16 horas a temperatura ambiente. El tratamiento habitual dio 0,310 g.



El éter de *para*-metoxibencilo (0,305 g) se disolvió en acetonitrilo (8 ml) con agua (2 ml) y se enfrió a 0ºC. Se añadió nitrato de cerio y amonio (1,110 g) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas, después de lo cual el uso del tratamiento normal dio el alcohol bruto.



El alcohol bruto se disolvió en cloruro de metileno (8 ml) con ácido láurico (0,126 g) y 4-dimetilaminopiridina (0,011 g). Después de enfriar a 0ºC, se añadió EDC (0,119 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El tratamiento habitual dio 0,355 g.



El éter de bencilo (0,355 g) se disolvió en acetato de etilo (50 ml) con hidróxido de paladio (0,048 g) y ácido acético (0,25 ml). La mezcla de reacción se puso en atmósfera de hidrógeno a 3,5 kg/cm^2 y se agitó durante 10 horas. El tratamiento de forma normal dio 0,255 g.

Este material se fosforiló, se desbloqueó con TFA, se dimerizó con fosgeno y se eliminaron los grupos protectores alilo con fenilsilano y paladio como se ha descrito antes para dar el compuesto ER-804947.

Ejemplos biológicos

Ejemplo 7

Inducción de citoquinas (in vitro)

No hay ensayos *in vitro* validados que se puedan usar como un indicador de la actividad adyuvante. Sin embargo, la incapacidad de una molécula para provocar cualquier respuesta estimuladora en macrófagos es una indicación buena de que no es probable que sea un inmunoadyuvante. Por esta razón, la capacidad de los compuestos para estimular la liberación de TNF-alfa y otras citoquinas de células inmunitarias puede ser indicativa de su capacidad para estimular una respuesta inmunitaria que puede dar como resultado una actividad adyuvante.

A. *Ensayos en sangre entera humana*

El sistema humano del que se dispone más fácilmente para ensayar la actividad de compuestos en monocitos/macrófagos es en la sangre entera. Se añadieron diferentes concentraciones de compuestos de la invención como 10x disoluciones madre en 50 μl de disolución salina equilibrada de Hank (HBSS) exenta de Ca^{++}, Mg^{++}, seguido de 50 μl de HBSS en 400 μl de sangre entera heparinizada obtenida de voluntarios normales (18-51 años de edad; 49-104 kg), a los pocillos de placas de ensayo de plástico, para un volumen total de 500 μl/pocillo (la concentración final de la sangre entera era 80%). Después de 3 horas de incubación con agitación suave a 37ºC en una atmósfera de CO_2 al 5%, las placas de ensayo se centrifugaron a 1000xg durante 10 min, a 4ºC, y se extrajo el plasma y se congelaron a -80ºC. Se analizó en las muestras de plasma el TNF-alfa por ELISA (Genzyme Corp., Cambridge, MA). Cada punto de ensayo se ensayó por triplicado.

Como se muestra en la figura 1, los compuestos tales como 100, 184 y 186 estimularon a las células transmitidas por la sangre para liberar TNF-alfa. La actividad estimuladora se puede comparar con la de la endotoxina 10 ng/ml (o LPS) presente en incubaciones similares en el mismo ensayo. Como se muestra en la tabla 1, la actividad de los compuestos (ensayados con 10 μM) está en el intervalo de inactivo (tal como el compuesto 110) a compuestos que demuestran mayor actividad que el LPS de referencia.

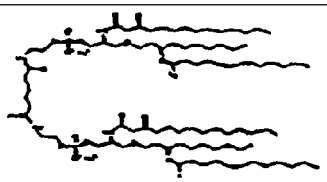
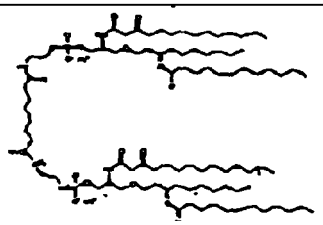
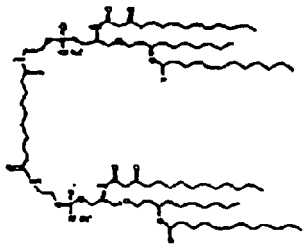
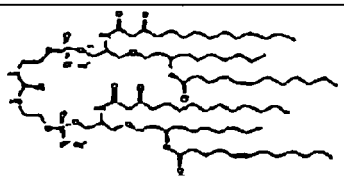
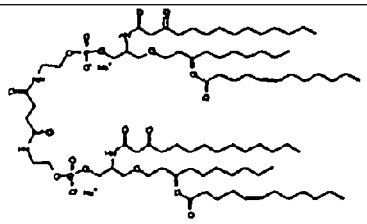
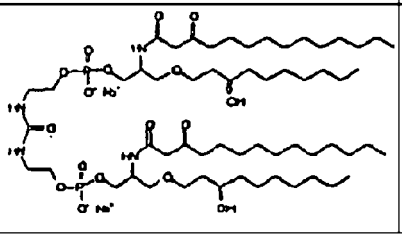
B. *Líneas de células humanas cultivadas*

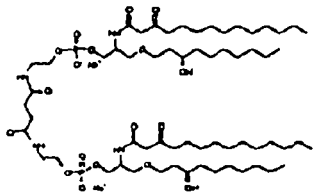
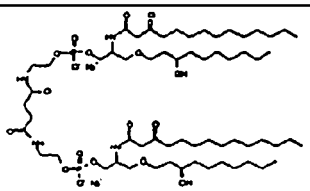
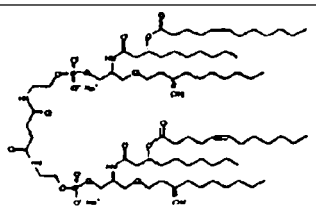
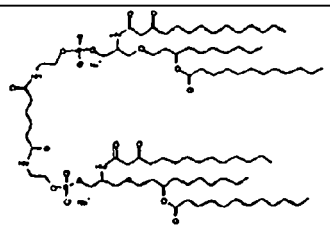
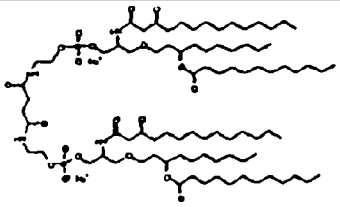
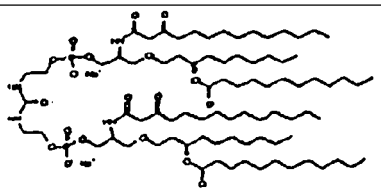
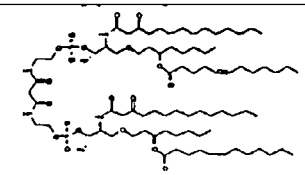
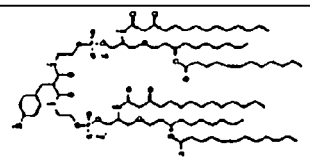
Se pueden obtener resultados similares cuando los compuestos de la invención se ensayan en un modelo de cultivo celular. En este ensayo, se ensaya la capacidad de los compuestos de la invención para estimular la secreción de fosfatasa alcalina de células THP-1 que se han transfectado con el gen para la fosfatasa alcalina secretada bajo el control del promotor de TNF-alfa, como se describe con detalle en Goto *et al*., *Molecular Pharmacology* 49; 860-873 (1996). Sin embargo, en este ensayo se pueden evaluar los efectos de eliminar el suero[1], una condición que puede imitar con más probabilidad un entorno subcutáneo acuoso. Como se muestra en la figura 2 y se describe en la tabla 1, los resultados de estos ensayos indican que los compuestos de la invención estimulan la inducción de genes bajo el control del promotor de TNF-alfa cuando se añade a células en ausencia así como en presencia de suero.

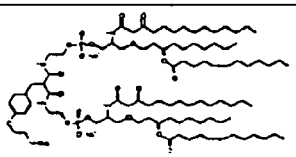
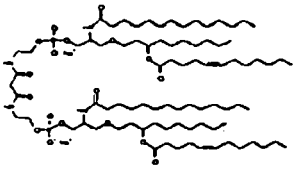
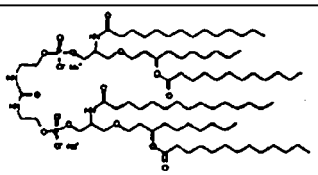
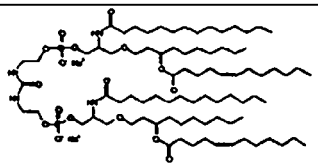
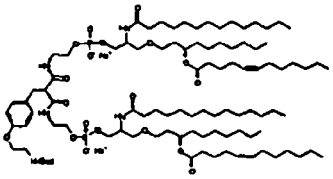
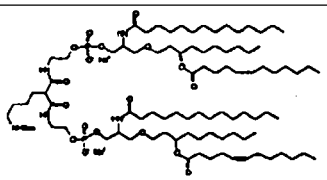
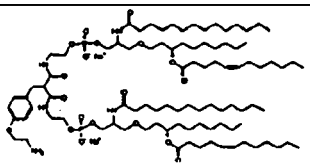
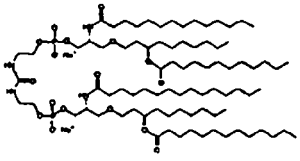
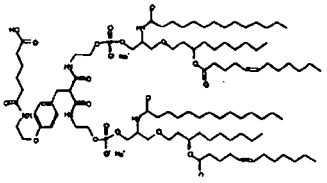
[1]Esto es importante para determinar si los componentes del suero tales como la proteína de unión a lipopolisacáridos, son necesarios para la actividad del fármaco.

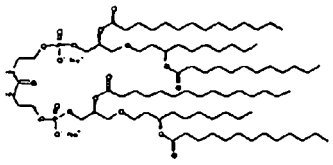
TABLA 1

Estimulación de la liberación de citoquinas por los compuestos de la invención y compuestos comparativos in vitro

Compuesto ER nº	Sangre entera (% de LPS a 10 µM)	Estimulación de células THP-1 (% de compuesto 100 a 10 µM)[1]	
		+suero	-suero
MPL de referencia	29[2]		
112022 	131 ± 10,2 (n= 6)		
111230 		49	
111231 		17	
111232 	158	155	225
111233 		141	
112043 	0		

112047		0		
112047		0		
112048 *		0	24	
112064			50	
112065			86	
112066		162	330	
113651		133 ± 4.4 (n=4)	215	254
118023		63		

019772 	69		
118989 	159		
119327* 	165±33 (n=3)		
119328 	181±42 (n=3)		
119329 	2±2 (n=2)		
119521 	103		
119522 	129		
803022* 	164		
803045 	65		

803592 	15		

(1)La respuesta en cada ensayo se comparó con el compuesto de referencia interna 100, 10 μM, que normalmente inducía un aumento de 2-3 veces de la expresión de TNF-alfa PLAP respecto a la basal.

(2)Ensayado con 5,8 μM

C. *Esplenocitos murinos*

La capacidad de los compuestos para estimular la liberación de citoquinas de esplenocitos se puede evaluar en un modelo de ratón. Se cultivan células de bazo recogidas de ratones C57BL/6 durante 24 horas en medio de cultivo celular RPMI 1640 que contenía FBS al 5%, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina 100 U/ml y beta-mercaptoetanol 50 μM, diferentes concentraciones del compuesto de ensayo, durante 20-24 horas, después de lo cual se ensaya la presencia de citoquinas en el líquido sobrenadante del cultivo celular.

Las células de bazo recogidas de los ratones se cultivaron durante 24 horas con compuesto de ensayo y se ensayó en el líquido sobrenadante la liberación de citoquinas. Como se muestra en las figuras 3 y 4, la liberación de citoquinas tales como IL-10 e interferón gamma de los esplenocitos, es estimulada por compuestos tales como 104, 106, 124, 126, 160 y 162.

Estos ensayos utilizaban una población heterogénea de células derivadas del bazo. Esto hace que sea posible que la inducción de citoquinas sea causada tanto por efectos directos de los compuestos de ensayo en las células como por estimulación más indirecta de "cascadas" de citoquinas, en las que la liberación de una citoquina por un tipo de célula puede inducir la liberación de otras citoquinas en otras células presentes en el mismo medio. Es posible que este "medio" de citoquinas sea responsable en parte de estas fuertes respuestas inmunitarias.

Ejemplo 8

Inducción in vivo de la respuesta de anticuerpos

El ensayo más crítico de la actividad adyuvante es la determinación de si la adición de un compuesto a una preparación de antígeno aumenta la respuesta inmunitaria elevando el nivel de anticuerpos generados contra ese antígeno, cuando se administra a un animal vivo.

Los experimentos iniciales implicaron la inyección de ratones (Balb/c) con compuestos de la invención más un péptido conjugado con un vehículo tal como hemocianina de lapa californiana. El péptido elegido para estos estudios es un péptido (P18) que corresponde a los aminoácidos 308-322 del bucle V3 de la proteína gp 120 del VIH IIB. Se ha descrito que el péptido P18 de 21aa, correspondiente a los aminoácidos 308-322 del bucle V3 de la proteína gp 120 del VIH IIB, es inmunógeno. Este péptido con restos espaciadores de glicina/alanina/glicina más un resto cisteína amino terminal fue sintetizado por Genosys (Woodlands TX). La secuencia peptídica es la siguiente: CGAGIRIORGP GRAFVTIGKG representando los aminoácidos indefinidos la secuencia nativa. El péptido se aisló con una pureza >80% usando el proveedor HPLC. Este péptido se acopló por el resto de cisteína a albúmina de suero bovino (BSA) y hemocianina de lapa californiana (KLH) usando conjugación activada con maleimida (Pierce Immunochemical; nº cat. 77107). El péptido conjugado con KLH se usó como el inmunógeno y el conjugado con BSA como el antígeno objetivo de selección para los anticuerpos específicos de P18. La cantidad indicada de conjugado KLH-P18 se usó de forma rutinaria junto con 300 μg de compuesto de ensayo, Alum o PBS, y se inyectó en intervalos de 2 ó 3 semanas (como se indica), en ratones macho Balb/c (Charles River Laboratories) de aproximadamente 6-8 semanas de edad (18-25 g). Todas las inyecciones fueron subcutáneas en la parte posterior del cuello con 200 μl de una mezcla de antígeno más adyuvante en PBS administrado cada 2 semanas (3 semanas para polisacáridos o influenza) durante un total de 3 inyecciones. Se sacó sangre a los ratones 1 ó 2 semanas después de la 2ª o 3ª inyección. Las muestras de sangre se designan con respecto a cuándo se tomaron (es decir, toma de sangre secundaria es 1 semana después de la segunda inyección de proteína o 2 semanas después de la segunda inyección de polisacárido, toma de sangre terciara es después de la tercera inyección de antígeno/adyuvante. La sangre se recogió después de hacer una muesca en la vena de la cola y las gotas se recogieron en tubos separadores de suero Microtainer de marca Becton Dickinson. Se separó el suero de los glóbulos rojos por microcentrifugación y se ensayaron los niveles de IgG específica del antígeno por ELISA.

La respuesta inmunitaria al péptido se puede ensayar por ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), que puede cuantificar niveles de anticuerpo en el suero que se unen al péptido P18 conjugado con otra proteína que no tiene reacción cruzada, tal como la albúmina de suero bovino (P18-BSA) y revestido sobre una placa de ELISA.

Como se muestra en la figura 5 y las tablas 2 y 3, los ratones a los que se inyectaron diferentes compuestos junto con el antígeno KLH-P18 demostraron una respuesta mayor (niveles más altos de anticuerpo) que aquellos a los que se inyectó solo el conjugado de péptido P18-KLH.

TABLA 2

Estimulación de la generación de anticuerpos contra el péptido P18 por los compuestos de la invención y compuestos comparativos

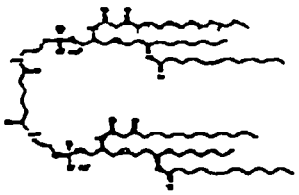
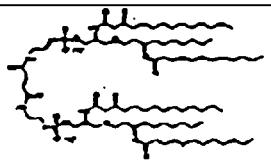
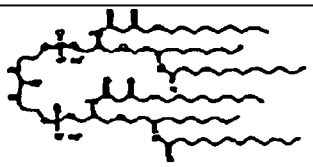
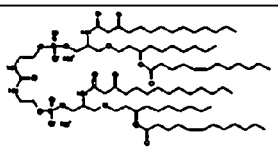
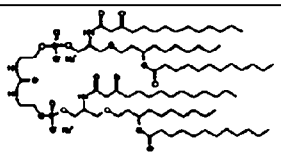
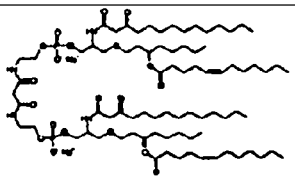
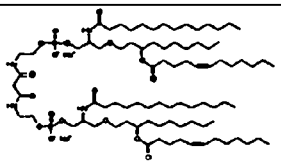
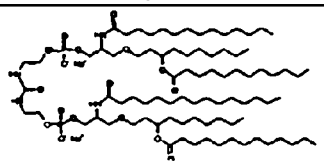
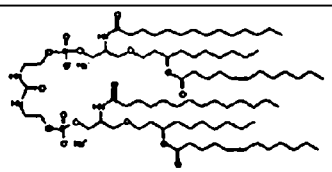
ER nº	Compuesto	Concentración[1] media de IgG anti-P18 del suero (nº de veces de aumento frente a sin adyuvante)
112022		6,7
112065		19,4
112066		39,2
[1]Concentración de IgG ensayada en la toma de sangre terciaria. IgG media en el suero de 5 ratones a los que se inyectaron 300 µg de compuesto y 5 µg de antígeno conjugado KLH-P18 como se describe en la sección de Métodos. Los ELISA específicos del antígeno se realizaron como se describe en la sección de Métodos con placas de EIA/RIA Costar revestidas con 50 µl de conjugado de BSA-P18 5 µg/ml en PBS		

TABLA 3

Estimulación de generación de anticuerpos contra el péptido P18 por los compuestos

Compuesto nº	Compuesto	Concentración[1] media de IgG anti-P18 del suero (nº de veces de aumento frente a sin adyuvante)
111232		7,6
112066		13,4*
113651		10,5*
118989		4,35*
119327*		16,5*
119328		26,8*

[1]Concentración de IgG ensayada en la toma de sangre terciaria. IgG media en el suero de 5 ratones a los que se inyectaron 300 μg de compuesto y antígeno (a continuación) como se describe en la sección de Métodos. Los ELISA específicos del antígeno se realizaron como se describe en la sección de Métodos con placas de EIA/RIA Costar revestidas con 50 μl de conjugado de BSA-P18 5 μg/ml en PBS. Como comparación, la adición de Alum aumentó los niveles de IgG 7,4 veces respecto a PBS/antígeno solo.

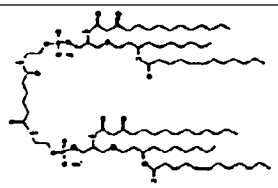
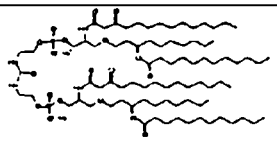
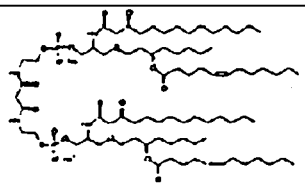
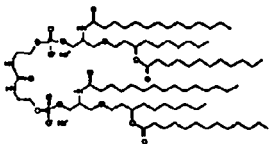
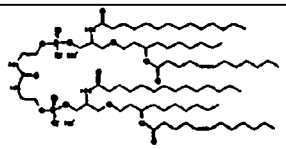
Antígeno usado: principal: 1 μg de péptido P18 conjugado con KLH. Refuerzo 2º y 3º: 0,5 μg de péptido P18 conjugado con KLH

*$p<0,05$ por ensayo t de Student de dos colas (varianza desigual) comparado con el grupo de PBS + antígeno.

La actividad adyuvante también se ha obtenido con compuesto de la invención cuando se ensayaron con otros antígenos. Los compuestos tales como 100, 116, 126, 160, 184 y 186, pueden estimular la producción de anticuerpos específica de antígeno en hasta 26,8 veces (tabla 4) contra el antígeno de influenza X-31. Los aumentos de las respuestas también se observan cuando se usan el toxoide del tetánico y el polisacárido C meningocócico (Tabla 5) como antígenos estimulantes. En los ensayos se usaron 1 μg de PS C meningocócico o 1,5 μg de toxoide tetánico o 5 μg de influenza X31 (SPAFAS laboratories). Se usó el toxoide tetánico de Accurate Chemical (nº de cat. sstettox) como antígeno estimulante, mientras que se usó el toxoide purificado de List Biologicals (nº de cat.191) como antígeno objetivo para el ensayo ELISA.

TABLA 4

Estimulación de la generación de anticuerpos contra influenza X31 por los compuestos

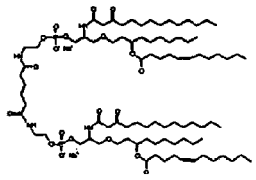
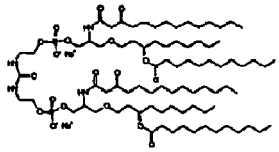
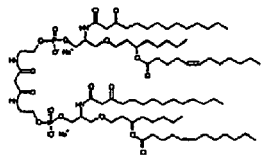
ER nº	Compuesto	Concentración[1] media de IgG anti-influenza X-31 del suero (nº de veces de aumento frente a sin adyuvante)
112022		1,7
112066		2,3
113651		1
119327*		7,85
119328		26,8

[1]Concentración de IgG ensayada en la toma de sangre terciaria.

IgG media en el suero de 5 ratones a los que se inyectaron 300 µg de compuesto y 5 µg de antígeno como se describe en la sección de Métodos. Los ELISA específicos del antígeno se realizaron como se describe en la sección de Métodos con placas de EIA/RIA Costar revestidas con 50 µl de antígeno influenza X-31 10 µg/ml en tampón de carbonato sódico 0,5 M, pH 0,6. Como comparación, la adición de Alum aumentó los niveles de IgG 3,5 veces respecto a PBS/antígeno solo.

TABLA 5

Estimulación de la generación de anticuerpos contra el polisacárido meningocócico por los compuestos

ER nº	Compuesto	Concentración[1] media de IgG anti-Ps meningocócico del suero (nº de veces de aumento frente a sin adyuvante)
112022		8,3
112066		12,9
113651		18,3
[1]Concentración de IgG ensayada en la toma de sangre secundaria. IgG media en el suero de 5 ratones a los que se inyectaron 300 µg de compuesto y 1 µg de antígeno como se describe en la sección de Métodos. Los ELISA específicos del antígeno se realizaron como se describe en la sección de Métodos con placas de EIA/RIA Costar revestidas con 50 µl de PS meningocócico 5 µg/ml en PBS más albúmina de suero humano metilada como describen Gheesling et al. *J. Clin Microbiol.* 32; 1475-82 (1994). Como comparación, la adición de Alum aumentó los niveles de IgG 2,3 veces respecto a PBS/antígeno solo.		

El virus influenza X-31 se adquirió en SPAFAS (Storrs, CT) y se inactivó, y el proveedor confirmó que era inactivo (Payne *et al*. *Vaccine* 16; 92-98 (1998)).

El polisacárido C meningocócico (PS) lo suministró Pasteur Merrieur Connaught (Swiftwater PA). La albúmina humana metilada se puede obtener de acuerdo con los métodos descritos por Gheesling *et al*. *J. Clin Microbiol*. 32; 1475-82 (1994).

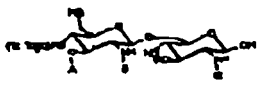
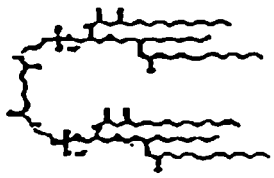
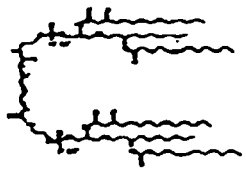
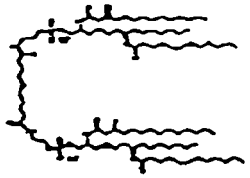
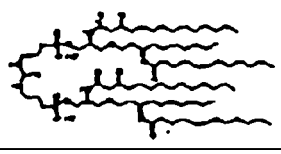
Para la preparación de mezclas de antígeno/adyuvante, los compuestos de ensayo liofilizados se reconstituyeron a 2 mg/ml con disolución salina tamponada con fosfato (PBS; nº de cat. P-3813; Sigma Chemical Co, St Louis MO) y se trató con ultrasonidos en un baño de agua enfriada durante 2 minutos. El monofosforil lípido A, MPL, (Ribi Immunochemical) se reconstituyó a 2 mg/ml con agua estéril para inyección, se incubó a 50ºC durante 15 minutos y después se trató con ultrasonidos como antes. Imject^{R} Alum, adquirido en Pierce Immunochemical, se usó de acuerdo con las directrices del fabricante, y comprendía aproximadamente 20-30% del volumen de inyección. Se mezclaron las cantidad indicadas de antígeno diluido en PBS, con los compuestos, MPL o Alum, de modo que la concentración final del compuesto o del MPL era 300 μg (salvo que se indique lo contrario) en los 200 μl de volumen de inyección. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 40 minutos con agitación continua antes de inyección.

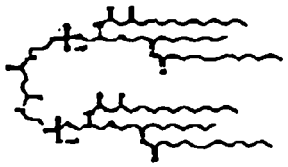
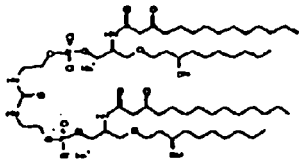
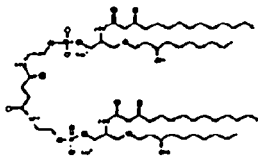
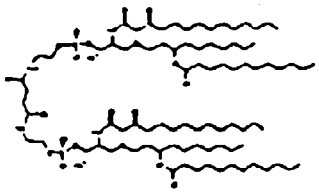
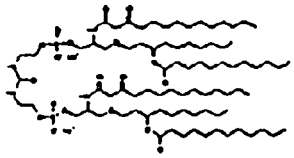
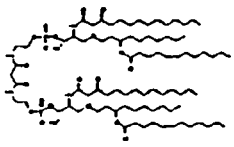
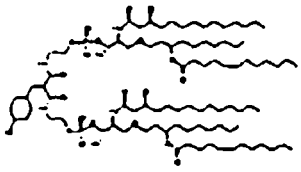
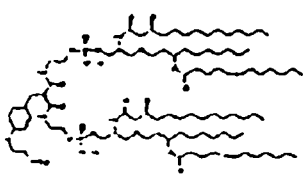
Los niveles de IgG específicos de antígeno se siguieron por ELISA directo, en el que se aplicaron como revestimiento de forma pasiva sobre placas de EIA/RIA Costar de 96 pocillos. Las placas se revistieron con 50 μl/pocillo del antígeno indicado y se incubaron durante la noche a 4ºC y se lavaron 3x con PBS + Tween 20 al 0,05% (PBS-t) en un lavador de placa automático. Después, las placas se bloquearon con 200 μl/pocillo de gelatina al 0,5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente (T.a.) y se lavaron 3 x con PBS-t. Los sueros de ratón se diluyeron en PBS-t más BSA al 0,3% y se añadieron 100 μl de diferentes diluciones, por duplicado, a los pocillos revestidos con antígeno (o pocillos revestidos con BSA como control) y se incubaron a T.a. durante 1 h, y se lavaron otra vez 3x con PBS-t. La IgG anti-ratón de cabra biotinilada (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham AL, nº de cat. 1031-08) se diluyó 1:5000 en PBS-t y se aplicaron 100 μl/pocillo y se incubaron a T.a. durante 1 h, se lavaron 3 x con PBS-t y después se añadieron 1:10.000 de conjugado de estreptavidina.peroxidasa de rábano picante (Southern Biotechnology Associates Inc.) en PSS-t durante 30 minutos a T.a. y se lavaron otra vez 3x con PBS-t. Después se incubaron los pocillos en 100 μl de sustrato TMB (Kirkegaard and Perry Labs) durante 5 minutos. El desarrollo de color se detuvo por la adición de un volumen igual de ácido fosfórico 1 M y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placa Titertek Multiscan con el paquete de software de análisis Deltasoft.

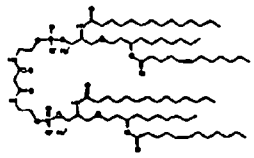
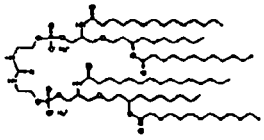
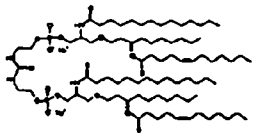
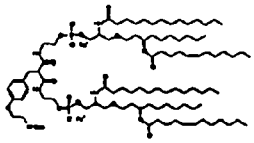
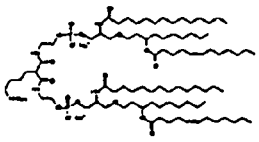
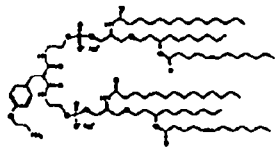
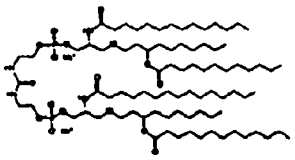
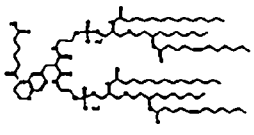
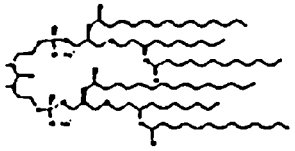
Para la cuantificación relativa de los niveles de IgG específica de antígeno, se compararon las curvas entre sí determinando la dilución necesaria para obtener una cantidad fija de color generado por el anticuerpo. En algunos casos, se llevó a cabo un ensayo de IgG total usando un reactivo específico anti-FAb para capturar cantidades conocidas de IgG (adquirida en Southern Biotech.) como una curva patrón de IgG, junto con el ELISA directo del conjugado de BSA-P18. El reactivo anti-FAb orienta la IgG purificada de una forma similar a como se uniría un anticuerpo a un antígeno por la región FAb. Esto permite la detección del anticuerpo unido por los mismos reactivos usados para medir la captura de anticuerpos específica de antígeno. Las mismas disoluciones de reactivos usadas para detectar los anticuerpos unidos al conjugado de BSA-P18, en particular anti-IgG biotinilada (específico de Fc) encontrados con HRP-estreptavidina, se aplicaron simultáneamente al ensayo cuantitativo de IgG total anti-FAb y al ensayo específico de antígeno. Por lo tanto, la señal de la unión de la curva patrón de IgG purificada es equivalente a la generada con cantidades iguales de IgG unida en el ensayo de antígeno anti-objetivo. La cantidad de anticuerpo en el suero después se interpola del patrón de IgG purificada, usando un ajuste de curva de 4 parámetros (paquete de software DeltaSoft 3).

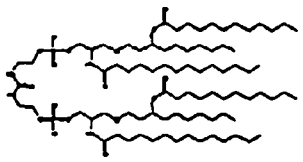
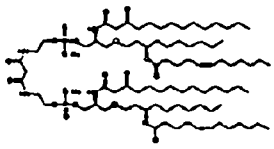
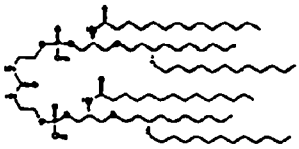
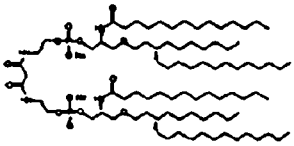
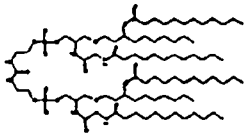
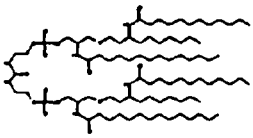
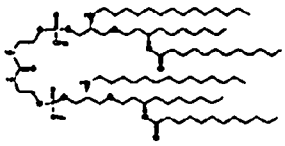
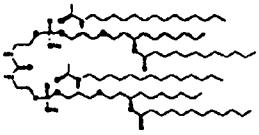
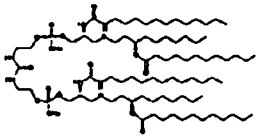
TABLA 6

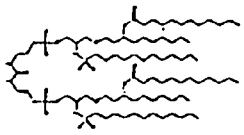
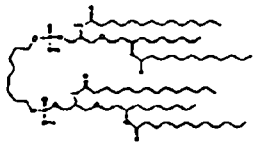
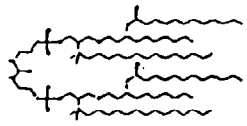
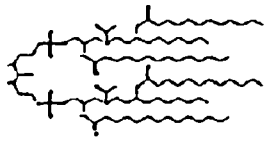
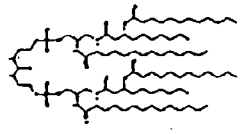
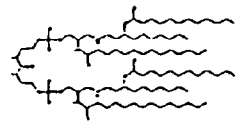
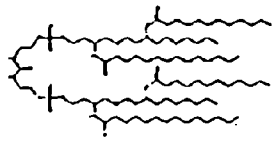
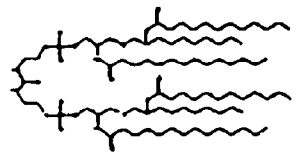
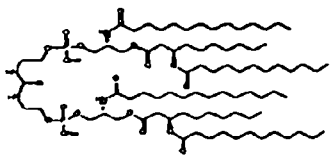
DE_{50} de WB frente a % de LPS con 10 ng/ml para compuestos de la invención y compuestos comparativos

ER nº	Estructura	DE_{50} WB frente a LPS con 10 ng/ml
MPL patrón		>> 10 µm
112022		0,696 µm
111230		
111231		0-29 µm
111232		

ER nº	Estructura	DE_{50} WB frente a LPS con 10 ng/ml
111233		
112043		
112047		
112065		0,25 µM
112066		0,04 µM
113651		0,70 µM
118023		
019772		

ER nº	Estructura	DE_{50} WB frente a LPS con 10 ng/ml
118989		0,1 µM
119327*		0,015 µM
119328		» 10 µM
119329		
119521		
119522		
803022*		0,06 µM
803045		
803592		

ER nº	Estructura	DE_{50} WB frente a LPS con 10 ng/ml
803789*		0,10 µM
804061		2,5 µM
804121*		0,46 µM
804130*		0,66 µM
804221*		2,2 µM
804253*		> 10 µM
804281*		0.45 µM
804339*		1,06 µM
804442*		0,007 µM

ER nº	Estructura	DE_{50} WB frente a LPS con 10 ng/ml
804558*		0,16 µM
304596*		> 10 µM
804674*		1,2 µM
304679*		0,53 µM
84630*		0,015 µM
804732*		<0,001 µM
804764*		0,015 µM
804772*		0,008 µM
804947*		>>10 µM

La siguiente tabla 7 contiene el número de compuesto con el que se designa en esta memoria con el correspondiente número ER.

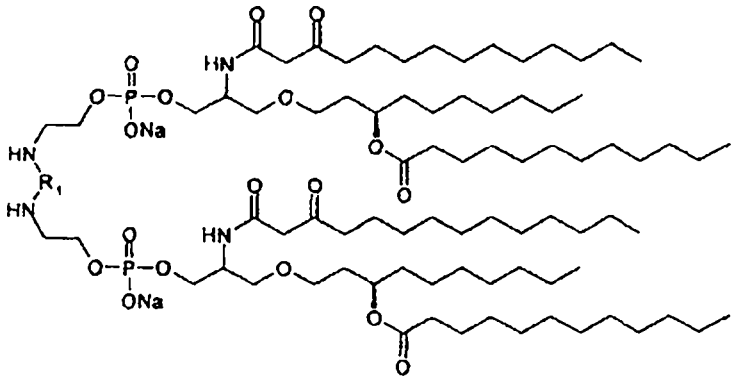
TABLA 7

Correspondencia de los números de compuestos con los números ER

Compuesto nº	ER nº	Compuesto nº	ER nº
16*	112048	160	113651
48	803733	168	118023
50*	803022	170	019772
62*	803789	172	118989
72	803592	184*	119327
100	112022	186	119328
102	111230	188	119329
104	111231	190	119521
106	111232	192	119522
108	111233	198	803045
110	112043	206	803592
112	112047		
114	112047		
122	112064		
124	112065		
126	112066		

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



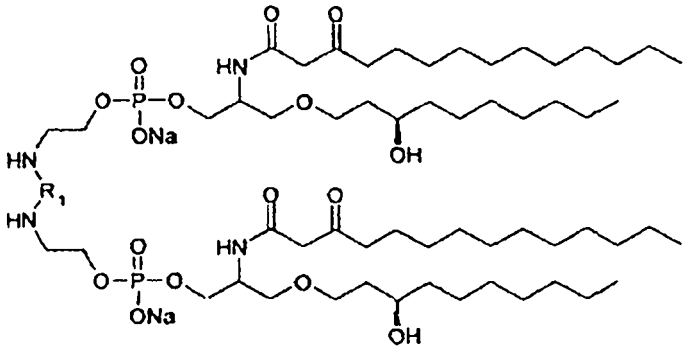
(I)

en la que:

R^1 se selecciona del grupo que consiste en -C(O)-, $-C(O)(CH_2)_2-C(O)$ y $-C(O)(CH_2)_4-C(O)$-.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^1 es -C(O)-.

3. Un compuesto de fórmula (II):

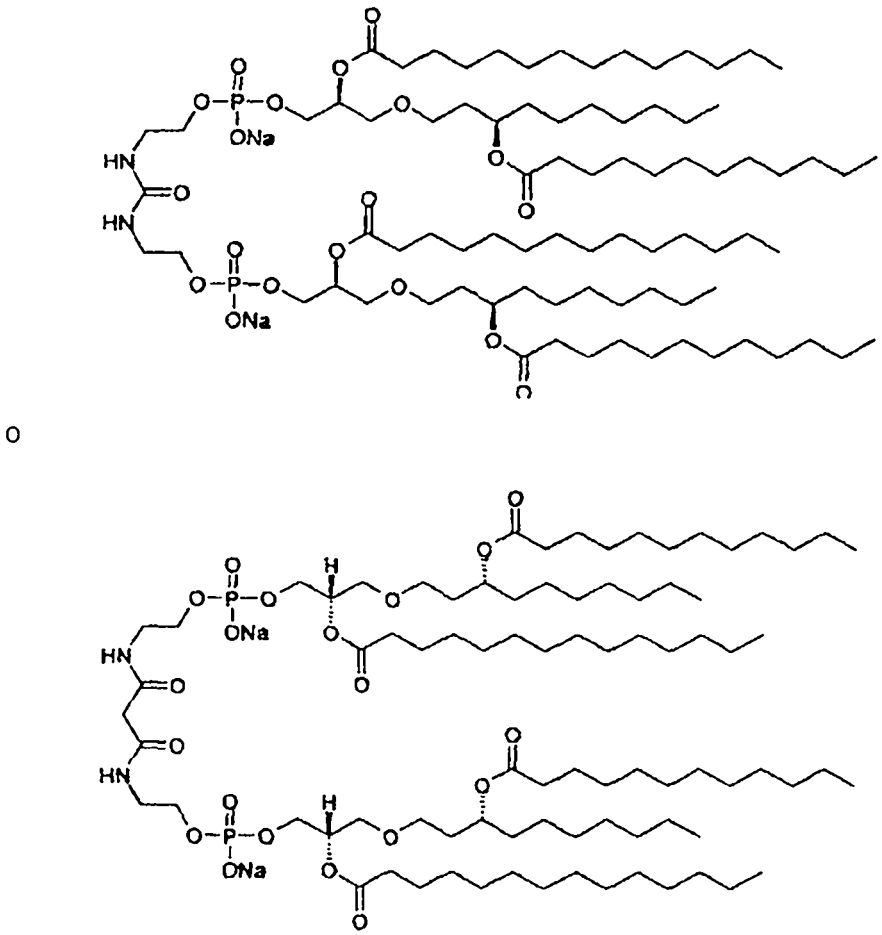


(II)

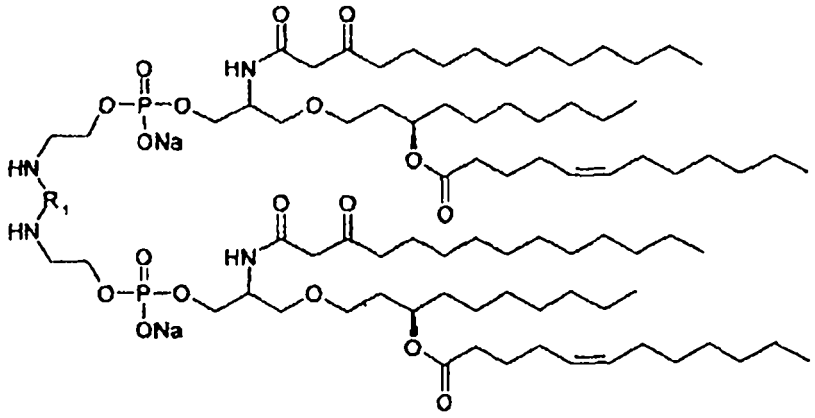
en la que:

R^1 se selecciona del grupo que consiste en -C(O)- y $-C(O)(CH_2)_2-C(O)$-.

4. Un compuesto de fórmula:



5. Un compuesto de fórmula (V):

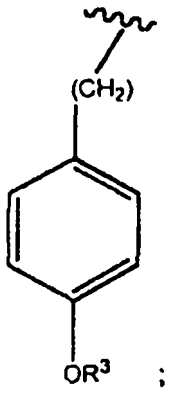


(V)

en la que:

R^1 se selecciona del grupo que consiste en -C(O)-, -C(O)(CH_2)-C(O)-, -C(O)(CH_2)$_2$-C(O)-, -C(O)(CH_2)$_4$-C(O)-, -C(O)(CH_2)$_6$-C(O)-, -C(O)(CH_2)$_8$-C(O)- y -C(O)(CH(R^2))-C(O)-;

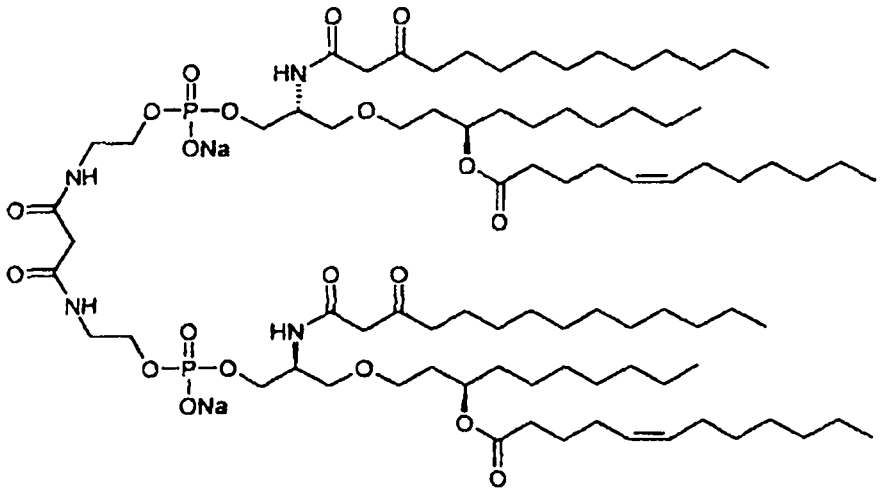
R^2 es



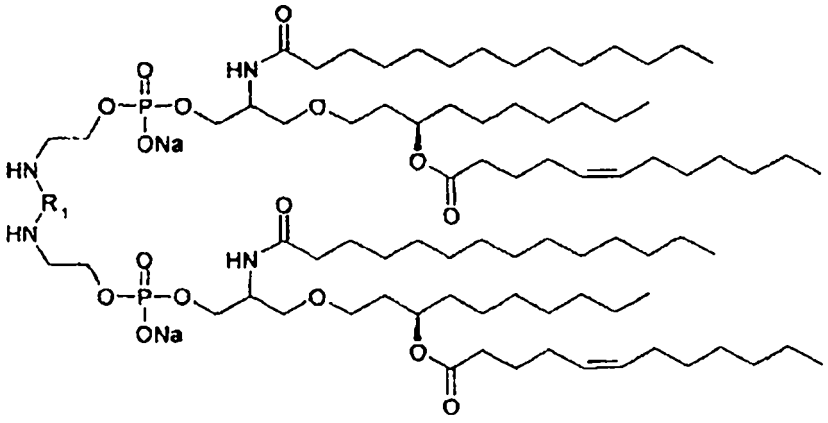
;

R^3 se selecciona del grupo que consiste en -H y $-(CH_2)_2NHBoc$.

6. El compuesto de la reivindicación 5, que tiene la fórmula:



7. Un compuesto de fórmula (VI):



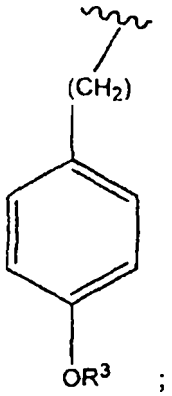
(VI)

en la que:

R^1 se selecciona del grupo que consiste en -C(O)-, $-C(O)(CH_2)$-C(O)- y $-C(O)(CH(R^2))$-C(O)-;

R^2 se selecciona del grupo que consiste en

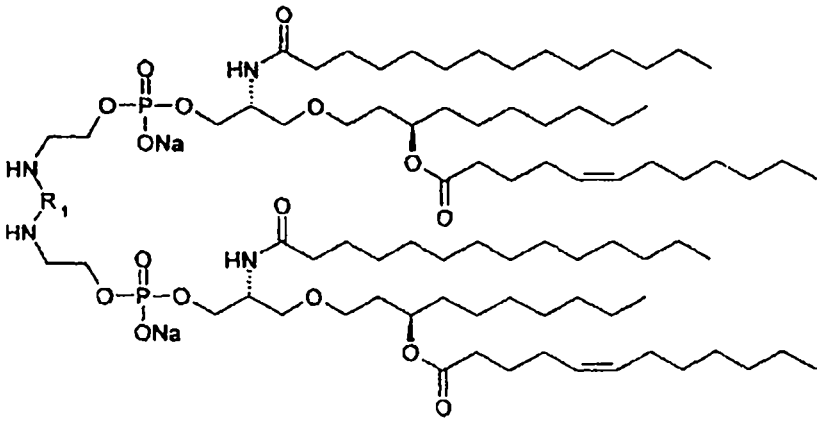
$-(CH_2)_4NHBoc$ y



;

R^3 se selecciona del grupo que consiste en $-(CH_2)_2NHBoc$, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_2NH(CO)(CH_2)_4C(O)OH$.

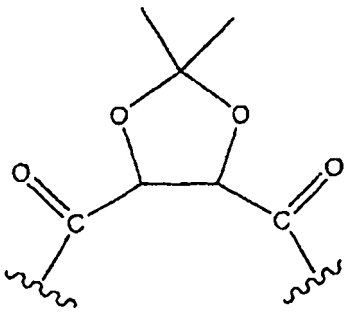
8. Un compuesto de fórmula (VI):



(VI)

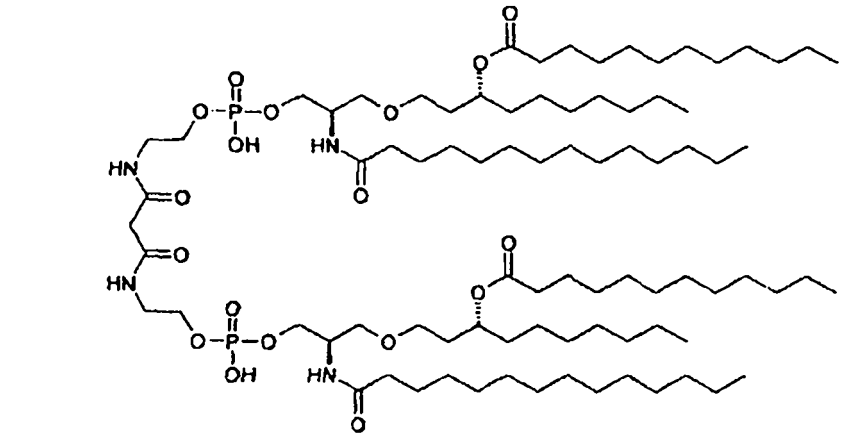
en la que:

R^1 es



.

9. Un compuesto que tiene la fórmula:



,

O

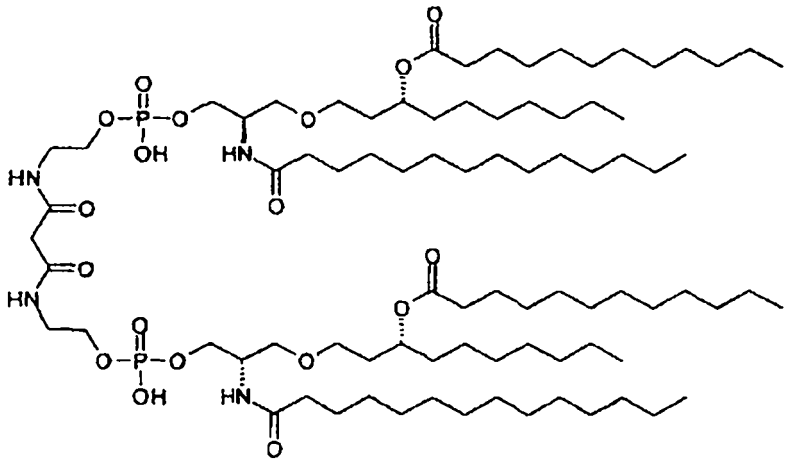


Figura 1.

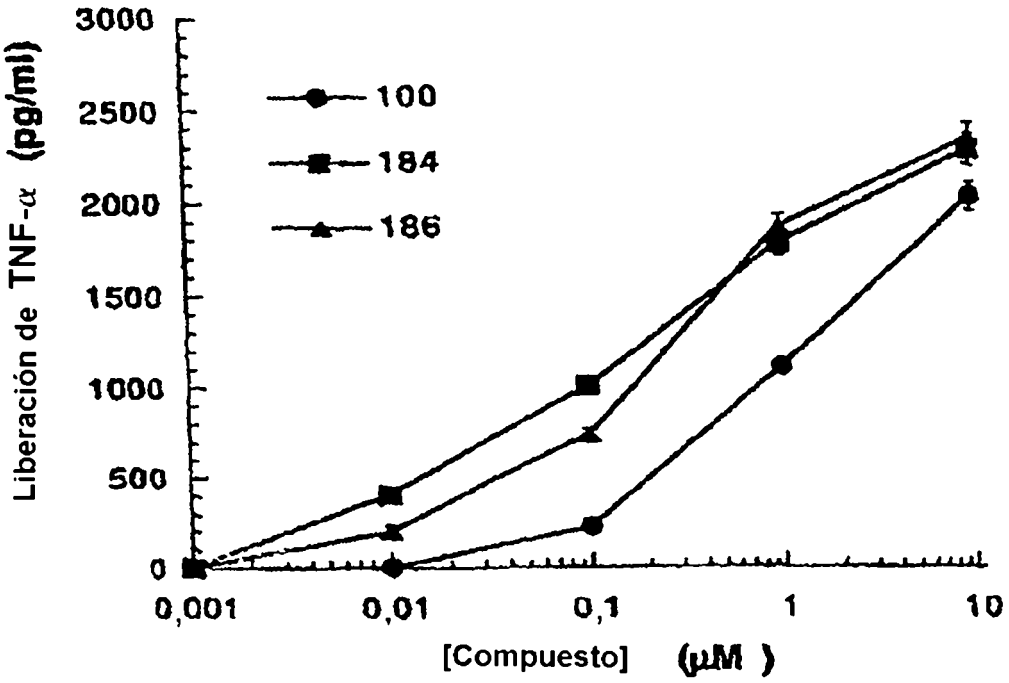

3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Liberación de TNF-α (pg/ml)
100
184
186
0,001
0,01
0,1
1
10
[Compuesto] (μM)

Figura 2.

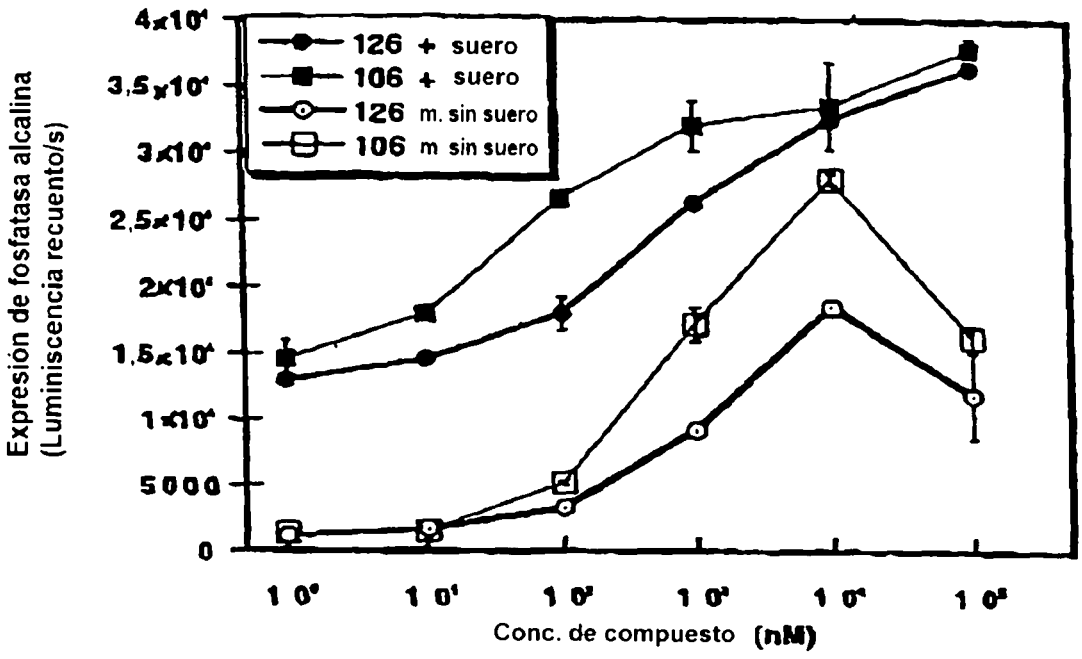

Expresión de fosfatasa alcalina
(Luminiscencia recuento/s)
4x10⁴
3,5x10⁴
3x10⁴
2,5x10⁴
2x10⁴
1,5x10⁴
1x10⁴
5000
0
126 + suero
106 + suero
126 m. sin suero
106 m sin suero
1 0⁰
1 0¹
1 0²
1 0³
1 0⁴
1 0⁵
Conc. de compuesto (nM)

Figura 3.

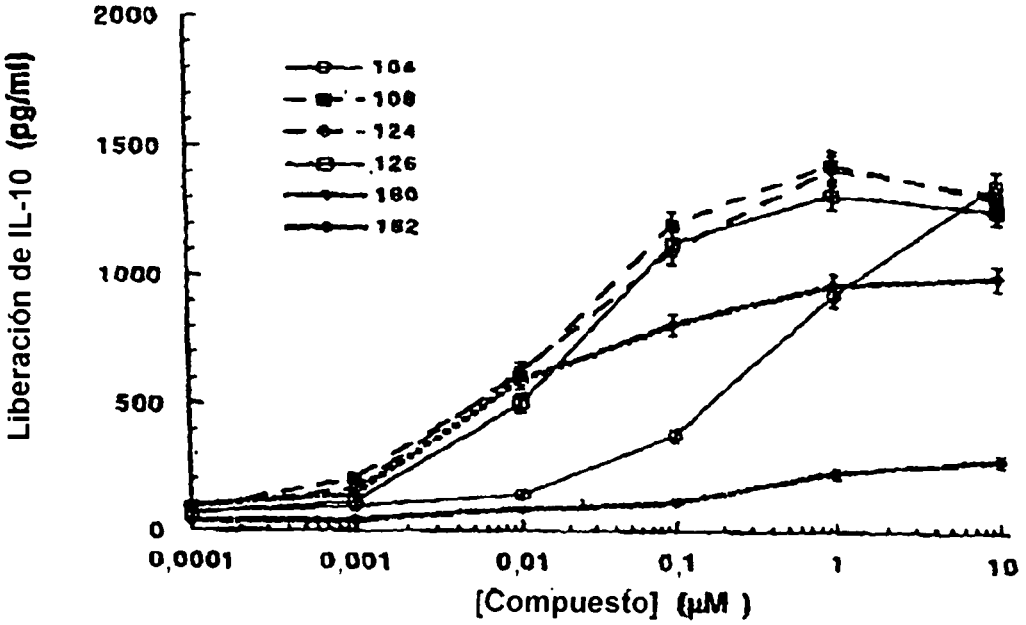

2000
1500
1000
500
0
Liberación de IL-10 (pg/ml)
104
108
124
126
160
162
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
[Compuesto] (µM)

Figura 4.

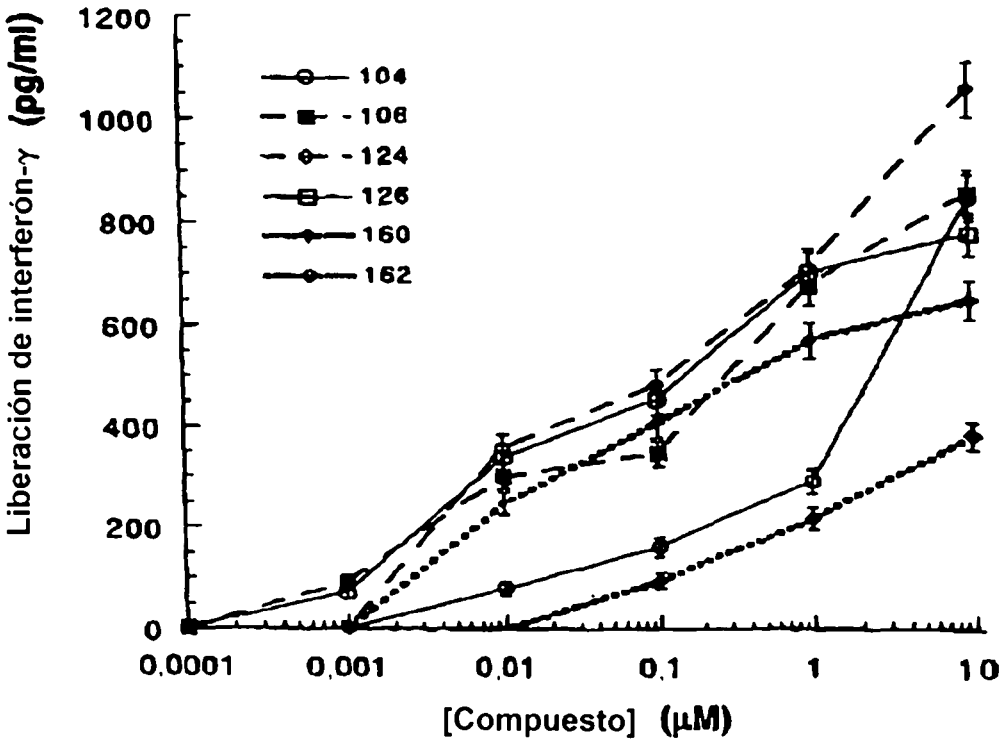

Liberación de interferón-γ (pg/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
104
106
124
126
160
162
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
[Compuesto] (μM)

Figura 5.

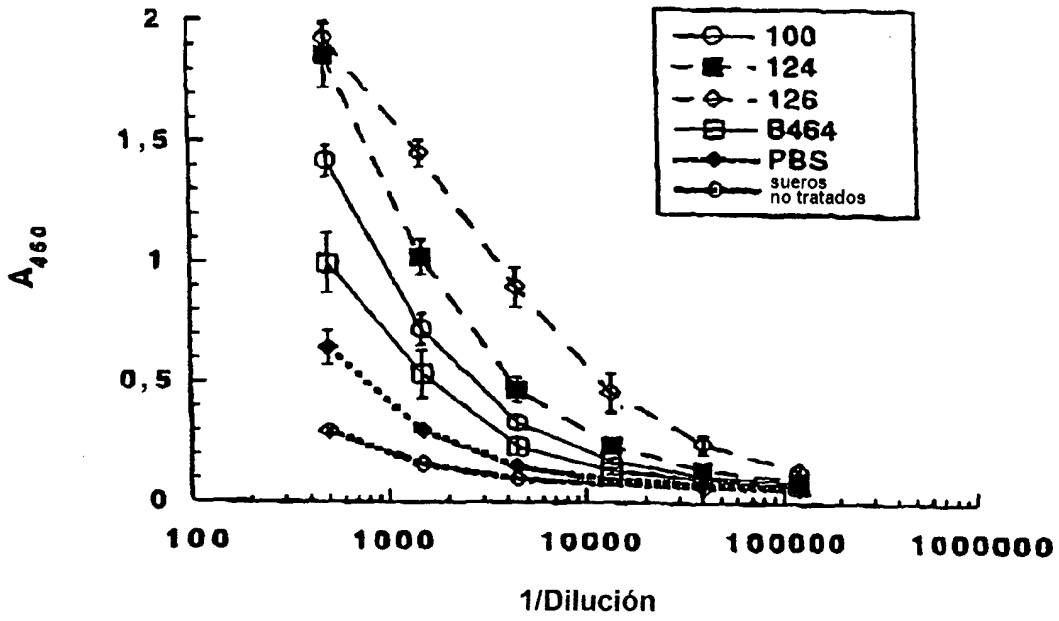
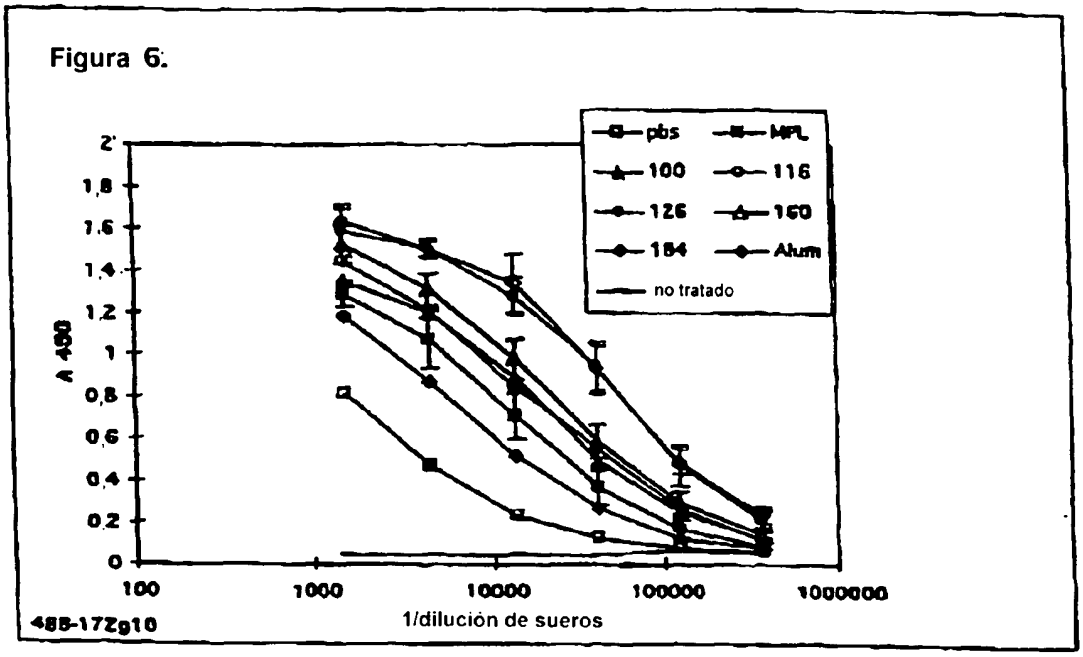

2
1,5
1
0,5
0
A_{450}
100
1000
10000
100000
1000000
1/Dilución
100
- 124
- 126
B464
PBS
sueros no tratados

Figura 6.


pbs
MPL
100
116
126
160
184
Alum
no tratado
A 450
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
100
1000
10000
100000
1000000
1/dilución de sueros
488-17Zg10