



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 788**

51 Int. Cl.:
A61K 31/70 (2006.01)
C07H 13/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03726743 .2**
96 Fecha de presentación : **09.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1549322**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Análogos de lípido A y de otros ligandos glucídicos.**

30 Prioridad: **09.05.2002 US 378645 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.08.2010

73 Titular/es: **Oncothyreon Inc.**
2601 Fourth Avenue, Suite 500
Seattle, Washington 98121, US

72 Inventor/es: **Jiang, Zi-Hua;**
Koganty, R., Rao y
Budzynski, Wladyslaw

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 343 788 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de lípido A y de otros ligandos glucídicos.

5 Esta solicitud es una no provisional de Jiang *et al.*, solicitud provisional de EE. UU. No. de serie 60/378.645, presentada el 9 de mayo de 2003.

Antecedentes de la invención**10 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a análogos de lípido A caracterizados por el cambio de una unidad de azúcar por un derivado de pentaeritritol. También se refiere a análogos de ligandos glucídicos, incluyendo lípido A, caracterizados por el cambio de un amino azúcar por un derivado de pentaeritritilamina.

15 Referencias a solicitudes relacionadas

Biomira (Jiang *et al.*), WO/2001/036433, presentada el 15 de noviembre, 2000 (nuestro expediente JIANG3A-PCT) se refiere al diseño y síntesis de algunos análogos nuevos de lípido A. Los análogos eran monofosforilados y contenían (1) al menos un lípido nuevo no natural (tales como los lípidos I o II) de los compuestos 33 y 102 (su figura 3) o (2) una combinación no natural de lípidos. La última se refiere a esos análogos de lípido A que contienen lípidos de longitud de cadena uniforme. Sus compuestos 54 y 86 (su figura 4) están en esta categoría. Su compuesto 70 (su figura 19) es similar, pero también contiene un grupo n-propilo en la posición 3-O y es un ejemplo de análogo de lípido A que incorpora un grupo alquilo corto no natural con un enlace éter no natural. Usando un antígeno lipopeptídico sintético (figura 34), una secuencia modificada de 25 aminoácidos que deriva de la mucina asociada a tumor MUC1, los solicitantes fueron capaces de evaluar las propiedades adyuvantes de ciertos análogos sintéticos de lípido A divulgados en esta invención. Basados en los datos de blastogénesis de células T y el nivel IFN- γ obtenido mediante estudios preliminares *in vivo* *in vitro*, se demostró que las estructuras sintéticas de lípido A 48, 54, 70, 86, 102 y 104 eran tan eficaces, como adyuvantes, como las preparaciones de lípido A de origen bacteriano.

30 Koganty, *et al.*, solicitud provisional de EE. UU. No. 60/387.437, presentada el 11 de junio, 2002 (expediente: Koganty5) se refiere a un péptido combinatorio y librerías de glicopéptidos que utilizan un núcleo de pentaeritritol.

35 Biomira (Koganty *et al.*), WO/2003/089574, presentada el 9 de abril, 2003 (expediente: Koganty4A-PCT) enseña que en una vacuna se puede usar un glicopéptido que comprende al menos un epítipo asociado a enfermedad y caracterizado por al menos un aminoácido interior lipidado o por la presencia de un epítipo MUC1, preferiblemente junto con un liposoma.

40 Biomira (Longenecker, *et al.*), WO/1995/027505, presentada el 12 de abril, 1995 (nuestro expediente LONGE-NECKER5-PCT), divulga que se pueden usar un conjugado de un epítipo primario y un péptido inmunomodulador o una mezcla de un antígeno primario y un péptido inmunomodulador, para provocar una respuesta inmune que es específica de CMI.

45 Biomira (Jiang *et al.*), WO/2003/066649, presentada el 4 de febrero, 2003, se refiere al uso de oligonucleótidos covalentemente lipidados que comprenden la unidad del dinucleótido CpG o un análogo de la misma como agentes inmunoestimuladores. Divulga que se puede usar una estructura Pet para unir tales unidades.

Descripción de los antecedentes técnicos

50 Yamamoto, US 4.464.383, presentada el 3 de agosto, 1982, divulga un derivado tritiazol pentametina cianina. No se requiere que los compuestos de la presente invención contengan tiazoles, mucho menos tres. Además, en Yamamoto, X no está covalentemente unido al derivado de tritiazol pentametina cianina. Además, en Yamamoto, incluso si R se selecciona como neopentilo o neohexilo, ninguno de los carbonos del grupo neopentilo o neohexilo está unido al un grupo Y1-Y4. Más bien, están todos unidos a un nitrógeno de anillo, ionizado para estar cargado positivamente, más que a un -NH-.

60 *Pentaeritritol*. Pentaeritritol (Pet) y dipentaeritritol (di-Pet) son polioles comunes y se usan ampliamente en la industria del petróleo para producir lubricantes y otras macromoléculas. Se ha usado un derivado, tetrakis-[13-(2'-desoxitimidin-3'-O-il)-6,9-diaza-2-oxa-5,10,13-trioxotridecil]-metano (dT₄PE-PLC) como un soporte de fase líquida para síntesis de oligonucleótidos a gran escala en solución (Wörl, R. *et al.*, 1999, compuesto 6). Además, se han empleado derivados de Pet, tetrabenzoatos de pentaeritritol semifluorados para diseñar estructuras líquidas cristalinas (Cheng, X. H. *et al.*, 2000) y se han usado derivados lipídicos de pentaeritritol (por ejemplo, dimiristoil-trimetilglicina pentaeritritol) en la preparación de liposomas catiónicos para la distribución de ácidos nucleicos en células de mamífero (Nantz, M. H. *et al.*, 2001). Se ha usado un derivado triamina de pentaeritritol como material de partida en la preparación de agentes quelantes (Dunn *et al.*, 1990).

65 Se ha empleado con éxito el núcleo tetradireccional (la unidad "Pet") de pentaeritritol como un agente de acoplamiento, por ejemplo, en la síntesis de dendrímeros multifuncionales (Armspach, D. *et al.*, 1996 y Kuzdzal, S. A. *et al.*

1994) y como un andamiaje molecular para química combinatoria (Farcy, N. *et al*, 2001). Además, Ranganathan y col usaron la unidad Pet como un núcleo para diseñar un péptido cíclico espiroautoensamblante para la construcción de nanotubos gemelos (Ranganathan, D. *et al*, 2001).

5 Es particularmente interesante advertir el uso de la unidad Pet para acoplar unidades de azúcar. Lindhorst, *et al*, Eur. J. Org. Chem., 2027-34 (2000) usaron la unidad Pet como un marco para un grupo de cuatro manósidos. Schmidt, *et al.*, Eur. J. Org. Chem., 669-674 (2002) prepararon estructuras similares en las que un grupo lipídico (C16H33) estaba O-unido a uno de los cuatro carbonos periféricos, y de uno a tres residuos de manósido estaban O-unidos, a través de un espaciador oligomérico etilenoxi, a otro de los carbonos periféricos. Esos carbonos periféricos que no se unían a un lípido o a un grupo que contenía azúcar estaban simplemente hidroxilados. Por último, Hanessian *et al*. 1996 usaron un andamiaje de pentaeritritol para presentar un grupo de dos epítomos Tn (el monosacárido GalNAc) o TF (el disacárido D-Gal β (1->3)GalNAc), cada uno O-unido a través de un espaciador a un carbono periférico del núcleo Pet. De los dos carbonos periféricos restantes, uno estaba O-unido a -CH₂CH₂NHAc, y el otro O-unido a alilo (Hanessian 33) o 1-octenilo (Hanessian 37). En ninguna de estas referencias un carbono periférico del núcleo Pet
15 estaba N-unido a ningún grupo.

En las diferentes solicitudes mencionadas anteriormente, la unidad Pet sirve como un núcleo para llevar otros grupos. También se puede usar para reemplazar una unidad de azúcar en un oligosacárido. Sin embargo, nunca antes se ha usado para reemplazar una unidad en el disacárido de lípido A. Ni se ha usado Pet-NH- para reemplazar un amino azúcar en ningún ligando glucídico.
20

Toepfer y col divulgaron imitadores de sialil-Lewis X y sialil-Lewis A que contenían una unidad Pet (Toepfer *et al*. 1995; Toepfer *et al*. 2000) como nuevos ligandos para la unión de selectina. De esta manera, en el compuesto 4 de Toepfer *et al*. 1995, dos de los carbonos periféricos de la unidad Pet están hidroxilados, uno está O-unido a un grupo que comprende una única unidad de azúcar y el último está O-unido a un grupo que comprende un disacárido. Se debe advertir que en los análogos de Toepfer, la unidad Pet reemplaza una unidad normal de azúcar, no un amino azúcar como en los análogos de ligandos glucídicos de los solicitantes. Además, los únicos grupos lipofílicos contemplados por Toepfer y col son grupos normalmente usados como grupos protectores en síntesis orgánica, tales como los que producen cambio de hidroxilos de azúcar con O-Al, -O-Tf u -O-Bn.
30

Aguilera *et al*. 1988 describieron la prueba de actividad antimitótica de análogos de oligosacáridos. Los oligosacáridos originales eran el tetrasacárido α -D-GalNAc- β -D-Gal(1->4)-[α -L-Fuc(1->3)]- β -D-GlcOME y un trisacárido sulfatado relacionado (compuesto 1 de Aguilera) que contiene una estructura de tipo Lewis X. En los análogos del trisacárido (compuestos 13-16 de Aguilera) un azúcar se reemplazó con una unidad Pet. En los análogos del tetrasacárido (17, 18), dos de las unidades de azúcar se reemplazaron con unidades Pet. Los análogos contenían así el disacárido en que el residuo α -fucosilo estaba unido a la posición C-3 del GlcNAc. En los seis análogos, un hidroxilo del grupo disacárido se reemplazó con -O(CH₂)₇CH₃, dando así una función lipídica. En los análogos 14, 16 y 18, tres de los cuatro carbonos periféricos de la unidad Pet estaban hidroxilados (el carbono restante estaba unido a un grupo que comprendía el grupo disacárido). En los compuestos de Aguilera 13, 15 y 17, dos carbonos periféricos Pet estaban hidroxilados y el tercero estaba sulfatado. Sin embargo, se encontró que estos compuestos eran inactivos como agentes antimitóticos en todos los tipos celulares, desalentando así el uso adicional de grupos cargados negativamente en análogos de esta familia.
40

Lipopolisacárido (bacteriano). El lipopolisacárido (LPS) es un glicolípido único encontrado exclusivamente en la capa externa de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Estructuralmente, la molécula de LPS bacteriana tiene tres regiones principales: la región del antígeno O, la región del núcleo y la región del lípido A (Stryer, 1981; Raetz, W086/05687). La región del antígeno O es un grupo polisacárido específico de cepa y determina la especificidad antigénica del organismo. La región del núcleo es una cadena de oligosacárido y puede desempeñar un papel en mantener la integridad de la membrana externa. La región del lípido A está conservada y funciona como un ancla hidrofóbica que mantiene el lipopolisacárido en su sitio.
50

Se sabe que LPS desencadena muchos sucesos patofisiológicos en mamíferos, cuando se inyecta o cuando se acumula debido a una infección bacteriana por Gram negativas. Antes del descubrimiento del componente lípido A de LPS generalmente se usaba el término "endotoxina" para describir los efectos del LPS. La endotoxina de bacterias Gram negativas es estable al calor, se asocia a la célula, es pirogénica y potencialmente letal. Además de sus actividades endotóxicas, LPS también muestra varias actividades biológicas, que incluyen actividad inmunoadyuvante, mitogénesis de linfocitos B, activación de macrófagos, producción de interferón, regresión de tumores, etc. Mientras que tanto las regiones de antígeno O como del núcleo modulan la actividad tóxica del LPS, en general se cree que el grupo hidrofóbico lípido A es responsable de estos efectos patofisiológicos de la endotoxina (Rietschel, 1992; Takada, 1992).
60

Lípido A y sus análogos sintéticos. Lípido A es el anclaje lipídico de lipopolisacárido (LPS), el componente de la membrana celular externa de las bacterias Gram negativas. LPS es un fuerte activador de la inmunidad innata del huésped después de la infección bacteriana, y se ha mostrado que su grupo lípido A es responsable de las actividades biológicas de LPS en la mayoría de los sistemas de prueba *in vitro* e *in vivo*. Las relaciones de estructura-actividad del lípido A y sus análogos se han estudiado extensamente durante las dos últimas décadas (Rietschel *et al*, 1996; Takada & Kotani, 1989).
65

El lípido A consiste de un disacárido de D-glucosamina con unión β -(1,6) fosforilado en las posiciones 1-O y 4'-O. Ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados se unen a los grupos hidroxilo y amino del disacárido para conferir hidrofobicidad al lípido A. La figura 1 de WO/2001/036433 (Jiang3A-PCT) muestra dos ejemplos de estructuras naturales de lípido A, el compuesto A (Imoto, 1985a, b) aislado de *E. coli* y el compuesto B (Rietschel, 1984a, b; Seydel, 1981; Strain, 1985) aislado de cepas de *Salmonella*.

Se han preparado un gran número de análogos sintéticos de lípido A. Por ejemplo, Lien *et al.* 2001 describen el agonista ER-112022, en el que el esqueleto de disacárido del lípido A se cambia por $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NHCO-(CH}_2)_4\text{-CONH-CH}_2\text{CH}_2-$. Los dos grupos fosfato unen este esqueleto sustituto a las cadenas de lípidos. Christ *et al.* 1995 prepararon el antagonista de lípido A E5531, derivado por modificación de la estructura del lípido A antagonístico de endotoxina de *Rhodobacter capsulatus*, en el que los enlaces acilo naturales en los carbonos C-3 y C-3' se cambiaron por enlaces éter y el grupo hidroxilo de C-6' se bloqueó. E5531 tenía ventajas en estabilidad y pureza.

Takada y Kotani han realizado un estudio completo de los requerimientos estructurales del lípido A para la endotoxicidad y otras actividades biológicas (Takada & Kotani, 1989), comparando los análogos sintéticos de lípido A preparados por varios grupos (Kotani, 1986a, b; Kiso, 1986; Fujishima, 1987; Charon, 1985; Sato, 1995). Describieron que para la actividad inmunoadyuvante, los requerimientos estructurales de lípido A no parecen ser tan rígidos como los requeridos para la actividad endotóxica y las propiedades de inducir IFN- α/β o TNF-alfa (Takada, 1989; Ribí, 1982). Sin embargo, la eliminación de todos los ácidos grasos abroga todas las actividades biológicas normalmente atribuidas al lípido A.

Ribí *et al.* 1982 mostraron que la estructura mínima requerida para la toxicidad era un núcleo de diglucosamina unido por β -(1,6) bifosforilado al que se unen ácidos grasos de cadena larga. Parece que se requiere un número óptimo de cadenas lipídicas en forma de grupos hidroxiacilo o aciloxiacilo en el esqueleto de disacárido para ejercer actividad endotóxica fuerte y actividades biológicas relacionadas del lípido A (Kotani, 1986a).

Además, la eliminación de cualquier grupo fosfato produce una pérdida significativa de toxicidad sin una pérdida correspondiente de la actividad adyuvante. Bioensayos en monofosforil lípido A mostraron que, mientras que era 1000 veces menos potente en base molar en provocar respuestas tóxicas y pirogénicas, era comparable a difosforil lípido A (y la propia endotoxina) en actividades inmunoestimuladoras (Werner, 1996). Se sabe que los difosforil lípido A de *E. coli* y cepas de *Salmonella* son muy tóxicos, pero el monofosforil lípido A de *E. coli* tiene toxicidad reducida mientras que mantiene las numerosas actividades biológicas que normalmente se asocian con LPS (Werner, 1996; Takayama, 1984; Ulrich, 1995; Myerr, 1990).

Recientemente, se sugirió que la actividad agonística y antagonística del lípido A estaban regidas por la conformación intrínseca del lípido A, que a su vez estaba definida principalmente por el número de cargas, el número y distribución de cadenas acilo en la molécula (Seydel *et al* 2000; Schromm *et al*, 2000).

Además, se ha sugerido que el lípido A es un ligando para el receptor de tipo Toll 4 (TLR4), un receptor de reconocimiento de patrón implicado en la mediación de las respuestas inmunes a LPS/lípido A (Kutuzova *et al*, 2001).

Existe una necesidad para el tratamiento eficaz de trastornos asociados con lípido A/LPS y para un adyuvante potente sin toxicidad asociada. La alta toxicidad del lípido A sin modificar de fuentes naturales desalienta su uso general como fármaco.

Otra desventaja importante con el lípido A natural es acceder a material suficiente con pureza farmacéuticamente aceptable, actividad reproducible y estabilidad. El lípido A natural es una mezcla de varios componentes de la pared celular que incluyen los de lípido A con un número variable de cadenas lipídicas. Tal heterogeneidad en el producto natural lípido A se atribuye a dos fuentes: (1) variabilidad biosintética en el ensamblaje del grupo lípido A y (2) pérdida de ácidos grasos del esqueleto del lípido A durante el procesamiento y purificación. Por consiguiente, es difícil controlar el proceso de fabricación en términos de reproducibilidad de composición de la mezcla, que tiene una relevancia significativa en la actividad biológica y toxicidad.

Compendio de la invención

Análogos de lípido A

Un objeto de la presente invención es el diseño, síntesis y uso de análogos de lípido A en los que una o ambas unidades de azúcar del disacárido del lípido A se cambia por al menos el esqueleto carbonado de pentaeritritol (el núcleo Pet). Estos análogos de lípido A se pueden caracterizar por diferencias adicionales del producto natural, por ejemplo, cambios en el número, estructura y localización de las cadenas lipídicas, eliminación de un grupo fosfato, cambio de uno o ambos grupos fosfato por un grupo relacionado (por ejemplo, un grupo sulfato) y cambios en el espaciado o unión de las unidades de azúcar (o sus reemplazos).

La presente invención también incluye análogos de lípido A en los que una unidad de azúcar del disacárido del lípido A se cambia por al menos el esqueleto carbonado de pentaeritritol y la otra unidad se omite.

La figura 3 muestra unos pocos ejemplos de análogos estructurales de un disacárido de lípido A obtenidos empleando una o dos unidades Pet.

En algunas formas de realización, el análogo de lípido A es un derivado de pentaeritritamina (Pet-NH₂), que es apropiado ya que el lípido A comprende glucosamina, un amino azúcar.

Los análogos de lípido A que tienen actividad agonística de lípido A (actividad inmunoestimuladora) son útiles como agentes inmunoterapéuticos para el tratamiento de infecciones y cánceres. Como adyuvantes de vacuna se pueden formular junto con antígenos para proporcionar respuestas inmunes más fuertes a los antígenos administrados y mejorar por ello la eficacia de la vacuna. También se pueden usar como agentes terapéuticos autónomos (que mejoran la inmunidad innata). Naturalmente, se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades dirigidas.

Los análogos de lípido A que tienen actividad antagonística de lípido A se pueden usar para el control de los trastornos patofisiológicos mediados por LPS. Debido a la respuesta exagerada a LPS liberado de bacterias Gram negativas, las infecciones bacterias a veces pueden producir una cascada de sucesos patofisiológicos denominados septicemia. La septicemia es mortal; mata decenas de miles anualmente en los Estados Unidos solo. Los antagonistas de lípido A se pueden unir al receptor que se une a LPS, receptor de tipo Toll 4 (TLR4), pero tal unión no producirá la liberación incontrolada de citoquinas inflamatorias por el sistema inmune. Por tanto, estos antagonistas pueden ser agentes terapéuticos eficaces para tratar trastornos mediados por LPS, tales como síntomas de inflamación y choque séptico.

En la presente invención, se han diseñado una clase de análogos de lípido A que comprenden un núcleo Pet y se han sintetizado varios ejemplos específicos (compuestos 1-4, figura 5).

Los datos biológicos preliminares muestran que los imitadores de lípido A 1 y 2, que contienen una unidad PetNH₂ reemplazando la glucosamina del extremo reductor del disacárido del lípido A, muestran actividades inmunoestimuladoras fuertes (figuras 14 y 15). Para demostrar adicionalmente la actividad biológica de los análogos contemplados, cada análogo sintético de lípido A 1 y 2 se incorporó en una formulación de liposoma, junto con un antígeno lipopeptídico sintético asociado a tumor derivado de la glicoproteína asociada a tumor MUC1. Esta formulación de vacuna demuestra un efecto de inhibición obvio en el crecimiento tumoral en ratones (figura 16).

De esta manera, los análogos de lípido A, especialmente los compuestos 1 y 2, se pueden usar como adyuvantes inmunoestimuladores al tratar enfermedades, como se divulga en esta invención. En una forma de realización preferida, se usan en construcciones liposomales, que comprenden adyuvante(s) inmunoestimulador(es) totalmente sintético(s) y antígeno(s) totalmente sintético(s), para el tratamiento inmunológico de varias enfermedades, tales como enfermedades infecciosas y cánceres.

Se han sintetizado otros dos análogos de lípido A, 3 y 4. Estos contienen derivados de una unidad di-pentaeritritol (di-Pet) y di-pentaeritritamina (di-PetNH₂), respectivamente, cambiando el esqueleto de disacárido de lípido A completo. No se han evaluado las propiedades biológicas de los compuestos 3 y 4.

Aquellos análogos que poseen actividad antagonística de lípido A serán útiles en tratar trastornos relacionados con lipopolisacárido (LPS)-endotoxina, tal como choque séptico.

Análogos de haptenos glucídicos

Otro objeto de la presente invención es el diseño, síntesis y uso de análogos de ligandos glucídicos. Mientras que un monosacárido tiene varios centros quirales, la unidad Pet no posee ningún centro quiral debido su alta simetría. Es debido a esta propiedad no quiral que Pet puede imitar varios monosacáridos de diferentes estequiometría. De forma similar, cuando se sustituye un brazo del Pet con un grupo amino, la unidad de pentaeritritamina (PetNH₂) resultante puede imitar varios monosacárido amino-sustituidos, incluyendo 1-amino-1-desoxi-(glicosilamina), 2-amino-2-desoxi-(glicosamina), 3-amino-3-desoxi-monosacárido, etc. Por tanto, se pueden producir imitadores estructurales de casi todas las moléculas de hidratos de carbono naturales usando una combinación de monosacáridos naturales y unidad(es) Pet o unidad(es) Pet sola(s).

Mientras que otros han usado la unidad Pet para reemplazar una unidad de azúcar en un ligando glucídico, en cada caso la unidad Pet empleada era una que mantenía todos los oxígenos hidroxilos, es decir, (núcleo carbonado de Pet)(-O-)₄. Los ejemplos mostrados posteriormente han demostrado que derivados (➤ Pet-NH-) de pentaeritritamina (PetNH₂) pueden imitar fácilmente la glucosamina del extremo reductor del disacárido de lípido A. Puesto que lípido A es un ligando glucídico que comprende un amino azúcar es tentador asumir que se puede usar PetNH₂ para construir análogos de otros ligandos glucídicos que comprenden amino azúcares, con ➤ Pet-NH- reemplazando al menos uno de estos amino azúcares. Por ejemplo, se puede usar ➤ Pet-NH- para reemplazar N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina. Los derivados de la forma (núcleo carbonado de Pet)(-O-)₃-NH- son de interés particular.

La figura 19 muestra algunos análogos derivados de PetNH₂ de antígenos glucídicos asociados a tumor, que son potencialmente útiles para el desarrollo de agente inmunoterapéuticos para tratar cánceres. De forma similar, la figura 20 muestra algunos análogos derivados de PetNH₂ de ligandos glucídicos implicados en la adhesión bacteriana al

huésped. La infección normalmente empieza con la colonización de las bacterias en las células huésped, proceso durante el cual se usan moléculas glucídicas como los ligandos de unión. Los análogos estructurales de estos hidratos de carbono son inhibidores potenciales para la adhesión bacteriana y por tanto se pueden usar eficazmente como antibióticos para prevenir la infección bacteriana. Una ventaja de tales análogos sobre los hidratos de carbono naturales es que los análogos son más resistentes a la degradación enzimática en un sistema biológico y por tanto su biodisponibilidad mejora.

Los objetos de la invención incluyen remediar las deficiencias de los antecedentes técnicos.

10 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra las similitudes estructurales entre una unidad de pentaeritritol (Pet) y una pentosa y/o hexosa.

La figura 2 muestra las estructuras generales del lípido A de lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas. El lípido A consiste en un disacárido de D-glucosamina con unión beta-(1,6) fosforilado en las posiciones 1-O y 4'-O, con numerosos grupos acilo graso unidos a los grupos hidroxilo y amino del esqueleto del disacárido. La estructura A (Imoto *et al.*, 1985) se aisló de *E. coli* y la estructura B (Seydel *et al.*, 1984) se aisló de *Salmonella minnesota*.

La figura 3 muestra unas pocas estructuras derivadas de unidades Pet y di-Pet para imitar al disacárido beta-1,6-diglucosamina del lípido A. En las estructuras I-IV, la glucosamina en el extremo reductor del disacárido del lípido A se ha reemplazado por una unidad Pet o PetNH₂; en las estructuras V-VI, la unidad glucosamina en el extremo no reductor se ha reemplazado por una unidad Pet o PetNH₂; y en las estructuras VII-IX, el disacárido di-glucosamina completo se ha reemplazado por una unidad di-Pet, di-PetNH₂ o Pet-PetNH₂. En las estructuras III y IV, la glucosamina del extremo no reductor del disacárido del lípido A también se cambia por glucosa. Para demostrar la razón fundamental del diseño, se han preparado unos cuantos imitadores (figuras 4 y 5) basados en las estructuras I, VII y IX.

La figura 4 muestra ejemplos de estructuras de lípidos que se pueden incorporar en moléculas de lípido A. Las moléculas de lípido A que contienen tanto lípidos naturales como lípidos no naturales son bien toleradas por su receptor de unión (receptor de tipo Toll 4) implicado en la estimulación inmune. La longitud del lípido también es variable, pero lo más preferiblemente en el intervalo de 12 a 16 carbonos. Esos grupos acilo grasos mostrados en la figura 4 se pueden unir tanto a grupos hidroxilo como amino del esqueleto disacárido del lípido A, mientras que el grupo alquilo se une preferiblemente a un grupo hidroxilo a través de un enlace éter.

La figura 5 muestra cuatro imitadores de lípido A (1-4) preparados como ejemplos. Tanto 1 como 2 se diseñan como imitadores estructurales cercanos al lípido A natural (compuesto A o B, figura 2). El compuesto 2 mantiene ambos grupos fosforilo del lípido A natural mientras que el compuesto 1 representa el análogo 1-O-desfosforilado. Además, la unidad PetNH₂ en 2 se hace quiral, lo que finalmente produce la formación de una mezcla diastereoisomérica de 2 si no se separa. Las estructuras 3 y 4 derivan de una unidad dipentaeritritol (di-Pet), que tiene dos grupos fosforilo pero con números menores de cadenas lipídicas.

La figura 6 describe la síntesis del donante de glicosilación 12 con un grupo fosfato protegido con bencilo en la posición 4-O. El acoplamiento de 6 con el ácido lipídico 7 produjo 8 con alto rendimiento. La apertura selectiva del anillo de bencilideno en 8 usando cianoborohidruro de sodio y HCl seco (g) dio el compuesto 9 con buen rendimiento. El grupo fosfato protegido con bencilo se introdujo después en la posición 4-O para formar 10 en un rendimiento del 68%. La desalilación seguida por la reacción con tricloroacetnitrilo y DBU proporcionó el donante de glicosilación 12.

La figura 7 describe la síntesis del aceptor de glicosilación 18, un derivado de Pet. Se preparó pentaeritritol sustituido con bencilo 13 según un procedimiento de la bibliografía (Dunn *et al.*, 1990). La formación de dimetilacetil a partir de 13 dio el compuesto monohidroxilo 14, que se convirtió en su derivado tosilato 15. La reacción de 15 con azida de sodio en presencia del catalizador de transferencia de fase ALIQUATTM proporcionó el intermedio sustituido con azida 16, que se redujo a su amina libre y después se hizo reaccionar con cloroformato de tricloroetoxicarbonilo para dar 17. La eliminación del grupo protector dimetilacetil proporcionó el compuesto dihidroxilo 18 como un aceptor de glicosilación para la preparación de los imitadores diseñados del lípido A 1 y 2.

La figura 8 describe la síntesis del intermedio 20. La reacción de glicosilación de 12 con exceso de 18 (4,0 eq.) dio el producto monoglicosilado deseado 19 en presencia de TMSOTf como catalizador con un rendimiento del 81%. El tratamiento de 19 con polvo de zinc en ácido acético produjo la eliminación de ambos grupos Troc para dar un intermedio diamina, que se acopló después con el ácido lipídico 7 para proporcionar el intermedio 20. Los datos del espectro de ¹H RMN de 20 mostraron dos series de dobles a d 4,35 (*J* = 8,0 Hz) y d 4,65 (*J* = 8,0 Hz), lo que confirmó la presencia de dos diastereoisómeros en una relación de alrededor de 1:1, teniendo ambos enlace b.

La figura 9 muestra la preparación final de los compuestos diseñados 1 y 2. La desbencilación hidrolítica de 20 en presencia de paladio sobre carbón dio 1 con rendimiento cuantitativo. Por otra parte, la introducción de otro grupo fosfato protegido con bencilo en el grupo hidroxilo libre de 20 proporcionó 21, que se desprotegió para dar el producto final 2. La estructura tanto de 1 como 2 se confirmaron mediante datos de espectro de ¹H RMN y ESIMS.

ES 2 343 788 T3

La figura 10 describe la síntesis del imitador del lípido A 3. Primero se protegió pentaeritritol como acetal de dibencilideno 22 que se hizo reaccionar con bromuro de tetradecilo en presencia de hidruro de sodio para dar el compuesto dilipidado 23. La apertura reductora del anillo de los acetales de bencilideno tratando 23 con cianoborohidruro de sodio y ácido trifluoroacético dio 24 con rendimiento moderado. La introducción de dos grupos fosfato protegidos con bencilo en 24 dio el precursor 25 que tras el tratamiento con paladio sobre carbón en una atmósfera de hidrógeno produjo el producto diseñado 3.

La figura 11 describe la síntesis del intermedio 29. Se trató el compuesto 22 con cloruro de tosilo y piridina para dar el ditosilato 26, que se convirtió a diazida 27 haciéndolo reaccionar con azida de sodio en presencia del catalizador de fase aliquat™ 336. La reducción de la azida con ditiopropano produjo el compuesto diamina 28, que tras el acoplamiento con el ácido di-lipo 7 proporcionó el intermedio 29 con un rendimiento del 66%.

La figura 12 describe la síntesis del imitador de lípido A derivado de Pet 4. Mediante los mismos pasos de reacción que se han descrito para la preparación del compuesto 3 (figura 10), el compuesto 29 se convirtió en la molécula diana 4 con un rendimiento total bueno.

La figura 13 muestra algunas estructuras más diseñadas como imitadores del lípido A (X-XII) que contienen PetNH₂ y di-PetNH₂. Las estructuras X y XI se basan en un esqueleto di-Pet con distribución lipídica asimétrica. En la estructura XII, la unidad PetNH₂ ha reemplazado a la glucosamina del extremo no reductor del disacárido de lípido A.

La figura 14 muestra la potencia de los imitadores del lípido A 1 y 2 en inducir la secreción *in vivo* de citoquinas por células adherentes aisladas de sangre periférica humana. También se probó lípido A R595, un producto de lípido A natural aislado de *Salmonella minnesota*, R595 (Avanti Polar Lipids, Inc.) por comparación. Se determinó el patrón de secreción para (a) secreción de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa, pg/mL); (b) secreción de IL-6 (pg/mL); (c) secreción de IL-8 (pg/mL). Los datos muestran que los imitadores de lípido A 1 y 2 son comparables a lípido A R595 en la activación de la secreción de las tres citoquinas, TNF-alfa, IL-6 e IL-8. Es bastante razonable pensar que los imitadores 1 y 2 activan estos monocitos humanos mediante mecanismos similares que sus equivalentes naturales.

La figura 15 muestra la inducción de la respuesta de proliferación de células T específica de antígeno mediante la vacuna liposomal sintética BLP25 que contiene el imitador de lípido A 1 ó 2 como adyuvante. Un lipopéptido 25-mero derivado de MUC1, H₂N-STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK (palmitoil)G-OH, se usó como antígeno. Los datos de proliferación de células T presentados en la figura 15 demuestran claramente que los ratones C57BL/6 inmunizados con una dosis de la vacuna liposomal BLP25 produce una respuesta de células T potente específica al antígeno de MUC1. La respuesta en los ratones inmunizados con la formulación liposomal que contenía el imitador sintético de lípido A 1 ó 2 es comparable a esa en el grupo de ratones inmunizados con una formulación que contenía lípido A R595. Cuando la formulación liposomal no contiene análogo de lípido A como adyuvante, la respuesta de proliferación de células T específica de antígeno es muy baja (datos no mostrados).

La figura 16 muestra el efecto inhibitorio en el crecimiento tumoral de una vacuna liposomal que contiene un análogo de lípido A como adyuvante. La vacuna liposomal BLP25 contiene un lipopéptido 25-mero derivado de MUC1 y el imitador de lípido A 1 ó 2, o lípido A R595. Se realizó la inmunoterapia activa específica de los ratones que tenían tumores MC-38 MUC1 mediante inmunización por vía intradérmica con la formulación liposomal BLP25. Los ratones se provocaron con tumor el día 0 y se inmunizaron el día 7, 14 y 21. El día 34, se tomaron los diámetros de los tumores (longitud y anchura) y el tamaño del tumor se expresó como mm² (longitud'anchura). Como se presenta en la figura 16, la vacuna liposomal BLP25 con adyuvante de imitador sintético de lípido A 1 ó 2 produce un efecto de inhibición tumoral comparable al producido por la formulación BLP25 con adyuvante lípido A R595. En el grupo control de ratones inmunizados con solución salina sola, el tamaño del tumor es alrededor del doble de los inmunizados con la vacuna BLP25 con adyuvante de imitador de lípido A 1 ó 2.

La figura 17 muestra una estrategia sintética para preparar un imitador glucídico que contiene PetNH₂, TM. TM se basa en el tetrasacárido terminal del antígeno asociado a tumor Globo-H en el que la N-acetil-galactosamina de cambia por PetNHAc. Un brazo del núcleo PetNH₂ se une a la galactosa del extremo reductor a través de un enlace éter mientras que el otro brazo se une al disacárido a través de un enlace glucosídico. Se emplean diferentes metodologías para construir estos dos tipos diferentes de enlace. El enlace éter se puede construir mediante reacción de sustitución S_N1/S_N2 clásica mientras que el enlace glucosídico se puede construir mediante reacciones de glicosilación usando varios tipos de donantes (por ejemplo, método del tricloroacetimidato como se muestra en la figura 17). La manipulación de grupos protectores, acoplamiento a lo largo de paso y desprotección final estándar produciría el producto completamente desprotegido TM.

La figura 18 muestra la estructura del lipopéptido BLP25 (SEQ ID NO: 1) derivado de la mucina MUC1. El lipopéptido es un antígeno sintético asociado a tumor usado para la evaluación biológica de los imitadores de lípido A 1 y 2. Una formulación liposomal que contiene el lipopéptido BLP25 y cualquier imitador de lípido A 1 ó 2 muestra efecto terapéutico en inhibir el crecimiento tumoral en ratones.

La figura 19 muestra algunos ejemplos de estructuras nuevas que contienen PetNH₂ derivadas de antígenos glucídicos asociados a tumor. Estos hidratos de carbono se asocian con la progresión del cáncer y se expresan a mayor nivel en células cancerosas que en células normales. Se han hecho grandes esfuerzos para desarrollar potenciales agentes

5 terapéuticos para el tratamiento del cáncer a partir de estos hidratos de carbono (S. J. Danishefsky & J. R. Allen, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 836-863). Se espera que los miméticos estructurales ejerzan significancia inmunológica similar. Se juzga que las respuestas inmunes dirigidas a estas estructuras miméticas reconozcan sus equivalentes naturales. Por ejemplo, se espera que los anticuerpos producidos contra la estructura mimética (TM, figura 17) del tetrasacárido terminal de Globo-H den reacción cruzada con las células cancerosas que expresan el antígeno Globo-H.

10 La figura 20 muestra algunas estructuras nuevas derivadas de los hidratos de carbono implicados en el suceso de la adhesión bacteriana a las células huésped. Se sabe bien que los glicosfingolípidos (por ejemplo, GM1, GM2 y GM3) y los hidratos de carbono de la serie Lewis (por ejemplo, Le^a, Le^b, Le^x, Le^y, sialil Le^x, etc.) desempeñan papeles importantes en la colonización bacteriana en las células huésped. En general se cree que las moléculas que inhiben este proceso de colonización pueden ser agentes antibacterianos eficaces ya que previenen la entrada de las bacterias al huésped. Los ligandos glucídicos en su forma natural son malos inhibidores debido a sus bajas constantes de unión y su inestabilidad a la degradación enzimática. De esta manera, los miméticos sintéticos de estos ligandos glucídicos naturales ofrecen una oportunidad de mejorar su baja constante de unión y baja biodisponibilidad en el sistema biológico. Por ejemplo, el trisacárido determinante sanguíneo H de tipo I (figura 20) está implicado en la adhesión en la que participa la bacteria patógena *Helicobacter pylori*. Su mimético estructural proporciona un esqueleto alternativo donde se pueden ajustar modificaciones químicas adicionales para encontrar nuevas moléculas con mayor eficacia de inhibición.

20 Descripción detallada de las formas de realización preferidas de la invención

25 Por claridad se debe advertir que cuando se usa la abreviatura “Pet” en el contexto de un componente estructural de los análogos de lípido A de la presente invención, lo que se quiere decir es el “residuo” de pentaeritritol, es decir, pentaeritritol menos uno o más de sus hidrógenos, de modo que se pueda incorporar a una entidad química mayor. Además, el término “Pet” cuando se usa en este contexto, incluye los grupos modificados divulgados que mantienen el núcleo de cinco carbonos de Pet (2,2-dimetilpropano), pero en el que uno o más de los oxígenos hidroxilos se cambia por un grupo espaciador Y1-Y4 como se define más adelante.

30 Asimismo, cuando se usa la abreviatura “Pet-NH2” en el contexto de un componente estructural de los análogos del ligando glucídico (incluyendo análogos de lípido A) de la presente invención, lo que se quiere decir es el “residuo” de pentaeritritamina, es decir, la última menos uno de los hidrógenos del amino y opcionalmente uno o más de los hidrógenos de los hidroxilos. Además, el término “Pet-NH2”, cuando se usa en este contexto, incluye los grupos modificados divulgados en los que uno o más de los oxígenos de los hidroxilos se cambian por un grupo espaciador Y1-Y4 como se define más adelante. El símbolo ➤ Pet-NH- se usa algunas veces para indicar que la función amino debe estar presente, pero que las otras funciones están sometidas a modificación.

40 Debe ser además evidente que el término “Pet” incluye “Pet-NH2” como un caso especial, es decir, uno en que un oxígeno hidroxilo se cambia por un nitrógeno. Si es necesario referirse específicamente a la situación en la que uno de los carbonos de Pet está aminado, se puede usar “Pet-OH” o “Pet-cal”, “cal” representa calcógeno.

Análogos de lípido A

45 Las composiciones de lípido A bacteriano se usan ampliamente como adyuvantes para aumentar las respuestas inmunes a varios antígenos usados en formulaciones de vacuna.

50 La presente invención se refiere a nuevos análogos estructurales sintéticos del lípido A bacteriano, especialmente lípido A de *E. coli*, y métodos de síntesis de tales análogos. Estos análogos de lípido A pueden ser agonistas o antagonistas del lípido A bacteriano. Es más probable que los agonistas tengan un mayor grado de similitud estructural al lípido A que los antagonistas.

55 Los análogos sintéticos de lípido A tienen varias ventajas sobre las preparaciones de adyuvantes naturales. Un compuesto sintético está químicamente definido con una estructura única y facilita así su seguimiento y control desde la fabricación hasta la formulación final. El producto sintético es rentable y fácilmente adaptable para aumentar a escala comercial al tiempo que se mantiene la consistencia tanto en calidad como en realización.

60 Una característica estructural invariable de la molécula de lípido A natural de *E. coli* es su esqueleto de disacárido de D-glucosamina con unión β -(1,6). Sin embargo, se ha mostrado que análogos de monosacáridos pueden expresar actividades endotóxicas. Véase, por ejemplo, Matsuura, *et al.*, *Infect. & Immun.* 63: 1446-51 (1995); Funatogawa, *et al.*, *Infect. & Immun.*, 66: 5792-98 (1998). Además, se conocen agonistas de lípido A en los que la unidad de disacárido entera se ha cambiado por un esqueleto acíclico, véase Hawkins, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 300: 655-61 (2002).

65 Los análogos de lípido A de la presente invención cambian al menos una de las unidades de azúcar del lípido A natural por el esqueleto de cinco carbonos (núcleo) de pentaeritritol (Pet). Este presenta un carbono central, unido individualmente a cuatro carbonos periféricos:



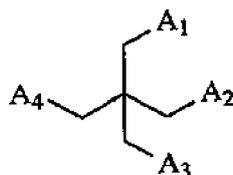
5

Estos carbonos a su vez están unidos a otros grupos.

La unidad de azúcar restante se puede mantener (posiblemente en una forma modificada), también cambiar por Pet o suprimir.

De esta manera, los análogos de lípido A de la presente invención tienen la estructura

15



20

(Fórmula G-1)

25

donde A1-A4 se definen posteriormente. Cada uno de A1-A4 se puede considerar una "rama primaria" del análogo. Nótese que ninguno de A1-A4 es simplemente hidrógeno.

Puesto que la conservación de los grupos azúcar no se considera importante, se pueden cambiar una o ambas unidades de azúcar del lípido A en el análogo por una unidad Pet, o se puede cambiar una así y suprimir la otra sin cambio.

30

En general, para conservar la similitud estructural a lípido A, se aplican las siguientes limitaciones adicionales a A1-A4:

35

- (1) al menos uno de A1-A4 comprende al menos un equivalente fosfato (un grupo fosfato o un análogo del mismo como se describe posteriormente) y
- (2) al menos uno de A1-A4 comprende al menos un grupo fuertemente lipofílico como se define posteriormente.

40

Con respecto a la limitación (1), el lípido A natural está difosforilado, pero se sabe que el análogo monofosforilado es activo y los solicitantes creen que ciertos análogos de fosfato también serán eficaces.

Con respecto a la limitación (2), el lípido A natural está, claramente, lipidado y si se deslipida pierde su actividad inmunoestimuladora.

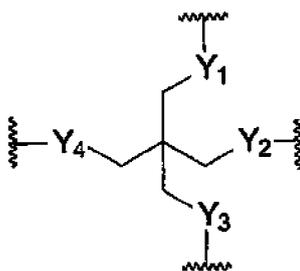
45

En una forma de realización preferida, A₁ es Y₁R₁, A₂ es Y₂R₂, A₃ es Y₃R₃ y A₄ es Y₄R₄, donde Y₁-Y₄ son espaciadores como se define más adelante. Preferiblemente cada uno de R₁-R₄ se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo orgánico o un grupo que junto con el grupo adyacente Y forma un fosfato, sulfato o borato. Para ponerlo de otra manera, preferiblemente cada uno de R₁-R₄ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno -P(=O)(OH)OH, -C(=O)OH, -S(=O)(=O)OH, -B(OH)OH o un grupo orgánico. Preferiblemente, cada uno de estos grupos orgánicos no tiene más de 200 átomos diferentes de hidrógeno, más preferiblemente, no más de 150, aún más preferiblemente, no más de 100.

50

La unidad Pet se puede considerar que es el esqueleto (núcleo) Pet como se ha definido anteriormente, junto con los grupos Y₁-Y₄ que corresponden a o reemplazan a los oxígenos hidroxilo de Pet sin modificar:

55



60

65

ES 2 343 788 T3

Se advierte además que puede haber más unidades Pet en el análogo que las usadas para reemplazar una o ambas unidades de azúcar del lípido A. Tales unidades Pet “extra” pueden ser útiles como andamiajes para la unión de equivalentes fosfato, grupos fuertemente lipofílicos y otros grupos químicos útiles. Preferiblemente, no son más que dos unidades Pet “extra” (es decir, un total de tres unidades Pet si el análogo incluye una unidad de azúcar o un total de cuatro unidades Pet si no). Más preferiblemente, solo hay una y lo más preferiblemente no hay ninguna unidad Pet “extra”.

Cuando hay dos o más unidades Pet en el análogo, pueden estar adyacentes o separadas por otro grupo. Si están adyacentes, entonces uno de los espaciadores Y1-Y4 de una unidad Pet sirve también como uno de los espaciadores Y1-Y4 de la unidad Pet adyacente, como se ve, por ejemplo, en la figura 3, compuestos VII-IX y la figura 5, compuestos 3 y 4.

De forma alternativa, puede haber otro grupo químico que una el espaciador de una unidad Pet y el espaciador de la otra unidad Pet. Este grupo puede, pero no necesita, comprender una unidad de azúcar, un grupo fuertemente lipofílico y/o un equivalente fosfato.

Cuando hay más de dos unidades Pet en un análogo, pueden estar unidas de forma lineal (Pet1... Pet2... Pet3), cíclica (Pet1... Pet2... Pet3... Pet1) o de forma ramificada (Pet1... Pet2(... Pet3)... Pet4), o en alguna combinación de las mismas. Nótese que en lo anterior “...” representa una unión que puede ser adyacente o mediante algún otro grupo químico.

En una forma de realización preferida, si el análogo de lípido A comprende una unidad de azúcar, el análogo lipídico es uno tal que si se prepara como una película multicapa fina como se describe en Seydel *et al.*, Eur. J. Biochem. 267: 3032-39 (2000), el ángulo de inclinación del esqueleto de azúcar del análogo relativo a la superficie de “membrana”, determinado como enseña Seydel, es al menos 35°, más preferiblemente más de 50°, si se busca un agonista, y el ángulo de inclinación es menor de 25° si se desea un antagonista. Se debe enfatizar que esto es solamente una forma de realización preferida y no es necesario determinar el ángulo de inclinación o, si se determina, que esté en los intervalos sugeridos anteriormente.

30 *Brazos primarios*

La numeración de los brazos primarios A1-A4 y sus componentes Y1-Y4 y R1-R4 es completamente arbitraria.

Un planteamiento para clasificar los análogos se basa en si proporcionan una unidad de azúcar, un segundo núcleo Pet o ninguno.

Otro planteamiento para la clasificación se basa en el número de los grupos R de R1-R4 que son hidrógeno.

En una primera clase de análogos, R1-R3 son H y R4 comprende el/los grupo(s) fuertemente lipofílico(s), el equivalente fosfato y, opcionalmente, la unidad de azúcar o segundo núcleo Pet. En esta clase, es preferible que o todos de A1-A3 sean -OH o que dos sean -OH y el tercero NH₂. En R4, el componente proximal al núcleo Pet puede ser el grupo fuertemente lipofílico, el equivalente fosfato o, si está presente, la unidad de azúcar o el segundo núcleo Pet. Preferiblemente, R4 incluye un azúcar o un segundo núcleo Pet, y más preferiblemente este es el componente proximal al primer núcleo Pet, y el equivalente fosfato y al menos un grupo fuertemente lipofílico están unidos al mismo.

En una segunda clase de análogos, solo dos de R1-R4 son H (y preferiblemente los grupos Y correspondientes son -O-) y por tanto el grupo fuertemente lipofílico, el equivalente fosfato y, opcionalmente, la unidad de azúcar o el segundo núcleo Pet, se distribuyen entre los dos brazos restantes. De esta manera, en el compuesto 1, un brazo consiste en grupo fuertemente lipofílico unido por NH y un segundo consiste en una unidad de azúcar fosfatada y lipidada O-unida.

En una tercera clase de análogos, solo uno de R1-R4 es H (y preferiblemente el grupo Y correspondiente es -O-) y el/los grupo(s) fuertemente lipofílico(s), el/los equivalente(s) fosfato y, opcionalmente, la unidad de azúcar o segundo núcleo Pet, se distribuyen entre los tres brazos restantes.

De esta manera, en el compuesto 2, un brazo es fosfato (nótese que uno de los oxígenos del fosfato hace doble tarea como grupo Y), un segundo brazo es un grupo fuertemente lipofílico unido por NH y el brazo final es un azúcar O-unido que está tanto lipidado (a través del -NH-) como fosfatado. El compuesto 4 es similar, excepto que es un segundo núcleo Pet, más que una unidad de azúcar, el que está lipidado y fosfatado. El compuesto 3 se diferencia del 4 en que el lípido está unido por O- más que por NH- a los núcleos Pet.

En una cuarta clase de análogos, ninguno de R1-R4 es H. Puesto que como máximo un brazo puede comprender una unidad de azúcar o un segundo núcleo Pet, esto implica que los otros tres brazos comprenden equivalentes fosfato y/o grupos fuertemente lipofílicos. Y eso a su vez implica que debe haber al menos dos equivalentes fosfato o al menos dos grupos fuertemente lipofílicos.

ES 2 343 788 T3

Un tercer planteamiento de clasificación se basa en el número y localización de los equivalentes fosfato. Las clases son entonces (1) un equivalente fosfato, (2) dos equivalentes fosfato, pero en el mismo brazo, (3) dos equivalentes fosfato, en brazos diferentes, o (3) más de dos equivalentes fosfato. Se pueden subdividir adicionalmente en base a si el equivalente fosfato está unido a la unidad de azúcar o no.

Un cuarto planteamiento de clasificación se basa en el número y localización de los grupos fuertemente lipofílicos. Por ejemplo, en los compuestos 1 y 2 hay tres grupos fuertemente lipofílicos y en los compuestos 3 y 4 hay dos. Además, pueden estar unidos al núcleo Pet (a través de un espaciador Y) a una unidad de azúcar o a un equivalente fosfato.

Unión de elementos principales

En esta especificación, se definen cuatro elementos principales del análogo de lípido A: una unidad Pet, una unidad de azúcar, un grupo fuertemente lipofílico y un equivalente fosfato. Cuando se dice que dos elementos principales están unidos, significa sin ningún otro elemento principal intermedio. Puede haber algún otro grupo químico, tales como los enlazadores y espaciadores divulgados, entre ellos.

De esta manera, cuando se dice que un grupo fuertemente lipofílico está unido a un equivalente fosfato, significa, sin ninguna unidad de azúcar o unidad Pet intermedia. Asimismo, cuando se dice que un grupo fuertemente lipofílico está unido a una unidad de azúcar, significa, sin ninguna unidad Pet o equivalente fosfato intermedio. A la inversa, cuando se dice que un grupo fuertemente lipofílico está unido a una unidad Pet, significa, sin ninguna unidad de azúcar o equivalente fosfato intermedio. Se pueden dar ejemplos análogos para las otras uniones de dos direcciones de las cuatro clases de elementos principales.

La especificación también puede identificar que dos elementos están unidos mediante un tercer elemento, en cuyo caso cada uno de los primeros elementos está unido al último.

Espaciadores (Y1-Y4)

Se puede considerar que el pentaeritritol es el compuesto de fórmula general I en el que A1-A4 son todos -OH. De forma equivalente, es el compuesto de esa fórmula en el que Y1-Y4 son todos -O- y R1-R4 son todos -H.

Mientras que el pentaeritritol por sí no es uno de los análogos de lípido A de la presente invención, el último contempla la incorporación de espaciadores Y1-Y4 que son -O- o análogos del mismo.

En una forma de realización preferida, cada espaciador Y1-Y4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en -O-, -S- o -NH-. Incluso más preferiblemente, cada uno de estos espaciadores es -O- o -NH-. Lo más preferiblemente, (a) todos estos espaciadores son -O-, o (b) un espaciador es -NH- y los otros espaciadores son -O-.

Equivalentes fosfato en análogos de lípido A

El lípido A natural presenta dos grupos fosfato, cada uno unido a una unidad de azúcar (el lípido es un disacárido). Sin embargo, se ha mostrado que monofosforil lípido A (MPLA) tiene actividad adyuvante y es menos tóxico que la molécula difosforilada natural. Además, se cree que uno o más de los grupo(s) fosfato del lípido A o MPLA se puede (n) cambiar por ciertos grupos químicos relacionados.

Por tanto, en los análogos del lípido A de la presente invención, al menos uno de A1, A2, A3 y A4 comprenden al menos un grupo -O-P(=O)(OH)-O-, -C(=O)OH, -O-S(=O)₂-O- ó -O-B(OH)-O-, estos están enumerados en orden de más a menos preferido. Aquí se define un análogo de fosfato como tal grupo, diferente de fosfato mismo. Un equivalente fosfato se define aquí para incluir tanto fosfato como análogos de fosfato.

Preferiblemente, si el análogo de lípido A carece de unidad de azúcar, al menos un equivalente fosfato comprende un grupo -O-P(=O)(OH)-O-, -O-S(=O)₂-O- ó -O-B(OH)-O-.

Las tres estructuras anteriormente mencionadas se pueden usar para unir el núcleo Pet a un grupo químico que comprende al menos un grupo fuertemente lipofílico y/o un equivalente de azúcar seleccionado del grupo que consiste en una unidad de azúcar y un segundo núcleo Pet. En tal caso, uno de los -O- del equivalente fosfato se juzga el espaciador Y1-Y4 referido a algún otro lugar.

De forma alternativa, el equivalente fosfato puede ser esencialmente un grupo terminal (el -C(=O)OH siempre lo es). De esta manera, en algunas formas de realización preferidas, al menos un equivalente fosfato es de la forma -OB(OH)OR, -OP(=O)(OH)OR o -OS(=O)(OH)OR, donde R es hidrógeno o un grupo alquilo sustituido o sin sustituir de 1-4 carbonos. Si R es hidrógeno, entonces tres de estos grupos se reducen a grupos inorgánicos: borato, fosfato y sulfato. Si R es un grupo sustituido, entonces las sustituciones son preferiblemente -OH o -NH₂. Un grupo R de interés particular es CH₂CH₂NH₂. Otra estructura de interés es -OP(=O)(OH)-O-P(=O)(-OH)-O-R, divulgada por Ulmer.

En otras formas de realización preferidas, al menos un equivalente fosfato es de la forma -R'-C(O)OH, donde R' es un grupo alquilo sustituido o sin sustituir de 1-4 carbonos. Más preferiblemente R' es -CH₂-.

ES 2 343 788 T3

Los análogos de lípido A de la presente invención preferiblemente tienen uno o dos equivalentes fosfato y, si tienen más de uno, pueden ser iguales o diferentes. De esta manera, podrían tener un fosfato y un análogo de fosfato. Si hay más de uno, los equivalentes fosfato se pueden incorporar en la misma o, más preferiblemente, en diferentes ramas primarias del análogo.

5

En algunas formas de realización preferidas, al menos uno de A1-A4 será el equivalente fosfato. En ese caso, uno de los oxígenos del equivalente fosfato también sirve como el espaciador Y1-Y4 para ese brazo.

10

En otras formas de realización preferidas, el equivalente fosfato será un sustituyente de un grupo mayor que se une al espaciador anteriormente mencionado. En una subrealización especialmente preferida, este grupo mayor es el azúcar o análogo de azúcar anteriormente mencionado, como, en lípido A natural, el grupo fosfato está unido a la unidad de azúcar. En el lípido A de *E. coli*, los grupos fosfato están unidos a los carbonos C-1 y C-4' del disacárido nuclear.

15

En aún otras formas de realización preferidas, al menos un equivalente se incorpora en al menos uno de los grupos lipofílicos anteriormente mencionados.

Unidad opcional de azúcar de los análogos de lípido A

20

Se debe advertir que el lípido A natural es un disacárido y la unidad Pet requerida del análogo reemplaza una de las dos unidades de azúcar de ese disacárido. Por tanto, el análogo de lípido A tendrá una unidad de azúcar o ninguna. Si no tiene unidades de azúcar, es porque la segunda unidad de azúcar del lípido A natural se ha reemplazado por un núcleo Pet o se omitió del todo.

25

Si el análogo incluye un azúcar, no necesita ser el mismo azúcar que en el lípido A natural, es decir, una glucosamina. Sin embargo, es preferible que sea una hexosa y/o un azúcar cíclico (especialmente una piranosa) y más preferiblemente que sea una glucosa o derivado de glucosa y aún más preferible que sea una glucosamina.

30

Si el análogo comprende solo una unidad Pet, entonces preferiblemente el equivalente fosfato no es -COOH y preferiblemente el análogo no comprende ninguna nucleobase.

Complemento lipídico de análogos de lípido A

35

La diversidad lipídica contribuye con mucho a las variaciones más significativas entre las estructuras de lípido A natural. Mientras que todos están unidos mediante enlaces éster y amida a los grupo hidroxilo y amino del azúcar respectivamente, las variaciones incluyen el número de lípidos unidos, la longitud de cada cadena lipídica y los grupos funcionales contenidos en las cadenas lipídicas. Se cree que estas variaciones contribuyen a varias funciones biológicas de la molécula entera de lípido A y de forma más importante a sus propiedades adyuvantes.

40

En algunas formas de realización preferidas, el análogo de lípido A comprende al menos un grupo fuertemente lipofílico que es idéntico a la cadena lipídica que se da en una estructura natural de lípido A. En una subrealización, todos los grupos fuertemente lipofílicos del análogo del lípido A son grupos que se dan en estructuras naturales de lípido A, pero no se requiere que todas se den en la misma molécula natural de lípido A o incluso en el contingente de lípidos encontrados en las moléculas naturales de lípido A de la misma bacteria. Sin embargo, estas restricciones adicionales se pueden considerar subrealizaciones adicionales.

45

Una ventaja principal proporcionada por la síntesis de un análogo de lípido A es que se puede diseñar una molécula para alcanzar eficacia como adyuvante, seguridad y estabilidad modificando las cadenas lipídicas y sus enlaces.

50

Por tanto, en otras formas de realización preferidas, el análogo de lípido A comprende al menos un grupo fuertemente lipofílico que no se encuentra en ninguna estructura natural de lípido A. La diferencia puede ser, pero no está limitada a, una diferencia en la longitud de la cadena, el grado de ramificación de la cadena, la presencia o localización de enlaces insaturados o la presencia o localización de enlaces -COO- (éster), -O- (éter) o -NH- (amino).

55

En términos químicos, los enlaces éster son lábiles ya que son vulnerables a hidrólisis en condiciones fisiológicas. La pérdida gradual de cadenas lipídicas puede reducir lentamente la actividad del adyuvante en almacenamiento largo de las vacunas disminuyendo así su vida útil. La introducción de enlaces éter no naturales pero estables en lugar de ésteres puede por lo tanto ser ventajosa.

60

En la forma principal de lípido A natural de *E. coli*, el esqueleto de disacárido está compuesto de dos glucosaminas, que llamaremos azúcar II (tiene un fosfato en el carbono 4') y azúcar I (tiene un fosfato en el carbono 1). El componente lipídico toma la forma de cadenas de seis carbonos unidas a los carbonos 2' y 3' del azúcar II y los carbonos 2 y 3 del azúcar I.

65

Un lípido ramificado, está O-unido al carbono 3'. Un lípido ramificado similar está N-unido al carbono 2'. En ambos lípidos ramificados, la cadena primaria (la unida al carbono del anillo de azúcar) es una cadena acilo. Una cadena acilo secundaria está O-unida al carbono C-3 de la cadena primaria de acilo (el carbono carbonilo es C-1). De esta manera, un total de cuatro cadenas de carbono (acilo) se unen directa o indirectamente al azúcar II.

ES 2 343 788 T3

Además, una cadena de acilo no ramificada pero hidroxilada está O-unida al carbono 3 del anillo de azúcar y otra de tales cadenas de acilo está N-unida al carbono 2 del anillo de azúcar. De esta manera, un total de dos cadenas de carbono (acilo) se unen al azúcar I.

5 Puesto que hay cuatro cadenas de acilo en un azúcar y dos en el otro, se dice que el lípido A purificado de *E. coli* (Alexander, 2002, Fig. 2A; Seydel, 2000, fig. 1A, "lípido A hexaacilo") tiene un complemento lipídico hexaacilo asimétrico y, más específicamente, una distribución 4/2. (Todas las referencias a "lípido A" son, a menos que califique, a este lípido A de *E. coli* purificado como se ha descrito anteriormente).

10 El complemento lipídico de los presentes análogos de lípido A consiste esencialmente en uno o más grupos fuertemente lipofílicos como se define en la sección posterior. Cada grupo fuertemente lipofílico preferiblemente proporciona una o más cadenas de carbono principales como se define posteriormente. Colectivamente, el complemento lipídico de los presentes análogos de lípido A preferiblemente proporciona una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más cadenas de carbono principales, siendo de tres a seis más preferidas. Preferiblemente, cada grupo fuertemente lipofílico proporciona una, dos o tres cadenas de carbono principales. Preferiblemente, estas cadenas de carbono principales tienen cada una 10-20, más preferiblemente 12-16 carbonos.

15 En el lípido A de *E. coli*, los grupos lipídicos proporcionan 82 átomos de carbono y en el lípido A de *S. minnesota*, 98 carbonos (7 cadenas acilo), mientras que en el lípido A de *R. capsulatus*, que es un antagonista de endotoxina, proporcionan 60 átomos de carbono. Hay agonistas análogos monosacáridos de lípido A cuyos grupos lipídicos proporcionan 42 átomos de carbono.

20 Por lo tanto, preferiblemente, las cadenas de carbono principales de los grupos fuertemente lipofílicos proporcionan colectivamente al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70 o al menos 80 átomos de carbono. Deseablemente, no proporcionan más de 120, no más de 110, no más de 100, no más de 90, no más de 80, no más de 70 o no más de 60.

30 Preferiblemente la suma de los logP predichos (véase posteriormente) para los grupos fuertemente lipofílicos es al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40 o al menos 50. Preferiblemente, no es más de 60, no más de 40, no más de 40 o no más de 30.

Cada grupo fuertemente lipofílico preferiblemente está unido al resto del análogo por un enlazador proximal seleccionado del grupo que consiste en -O-, -S- y -NH-.

35 Puede estar unido así al carbono de un azúcar o núcleo Pet, o al átomo de azufre, fósforo o boro de un equivalente fosfato divalente. En el caso de unión al azúcar, el enlazador proximal es el oxígeno de un hidroxilo de azúcar, el azufre de un tio azúcar o el nitrógeno de un amino azúcar. En el caso de unión al núcleo Pet, el enlazador proximal es una parte del espaciador Y1-Y4. En el caso de unión al átomo anteriormente mencionado de un equivalente fosfato, el enlazador proximal es un -O- de dicho equivalente fosfato.

40 Este enlazador proximal puede estar unido directamente a una cadena de carbono principal como se define más adelante, o a un enlazador distal. El enlazador distal puede ser divalente, trivalente, tetravalente, etc. Normalmente será al menos trivalente, por lo que sirve para unir el resto del análogo a al menos dos cadenas de carbono principales diferentes del grupo lipofílico. El enlazador distal consiste en dos o más elementos independientemente seleccionados del grupo que consiste en alquilo de 1-5 átomos de carbono, -O-, -S-, -C(=O), -C(=S)-, -NH y -N<, con la advertencia de los átomos del enlazador distal unidos directamente a las cadenas de carbono principales del grupo lipofílico no son átomos de carbono (si lo fueran, entonces esos átomos serían parte de la cadena de carbono, no parte del enlazador distal).

50 En la figura 4, las estructuras séptima y octava presentan enlazadores distales. En la séptima estructura, es el -C(=O)-CH(-CH₂-O)-CH₂-O- trivalente. En la octava estructura, es el -C(=O)-CH₂-CH(-NH-)-C(=O)O-trivalente.

55 Para el propósito de determinar si un grupo unido a un azúcar es un grupo fuertemente lipofílico, se pasa por alto el enlazador proximal, pero el enlazador distal se considera parte del grupo. Asimismo, para un grupo unido al núcleo Pet, se pasa por el alto el espaciador intermedio.

Si el análogo de lípido A proporciona un azúcar, al menos uno de los siguientes sitios en el esqueleto de carbono del azúcar se puede unir al grupo fuertemente lipofílico:

- 60 (A) el carbono anomérico del anillo
(B) el otro carbono del anillo inmediatamente adyacente al heteroátomo del anillo (normalmente oxígeno)
(C) un carbono del anillo diferente de (A) o (B) anteriores
65 (D) un carbono del azúcar diferente de un carbono del anillo.

ES 2 343 788 T3

Se entenderá que tal unión normalmente será a través de un enlazador tal como el “enlazador proximal” definido aquí, pero una unión sin un enlazador (es decir, un aminoácido C-sustituido) no se excluye absolutamente.

5 Si el azúcar es una hexosa y una piranosa, como glucosa, al menos uno de los siguientes sitios puede estar unido a un grupo fuertemente lipofílico:

- (1) el carbono C-2 o C-2' de los anillos de azúcar (es decir, uno de los sitios en los que el lípido A natural está N-lipidado);
- 10 (2) el carbono C-3 o C-3' de los anillos de azúcar (es decir, uno de los sitios en los que el lípido A natural está O-lipidado);
- (3) el carbono C-1' (anomérico) del anillo de azúcar II (en lípido A natural, este carbono está unido al C-6 del azúcar I, pero si se omite el azúcar I, entonces este carbono está libre);
- 15 (4) el C-1 (carbono anomérico) del anillo de azúcar I (en lípido A natural, este carbono está fosforilado);
- (5) el carbono C-6 no de anillo del azúcar I (en lípido A natural, este carbono está unido al C-1 del azúcar II, pero si se omite el azúcar II, entonces este carbono está libre);
- 20 (6) el carbono C-6' no de anillo del azúcar II (en el disacárido de lípido A basado en lípido A natural, este lleva solo -OH, pero este es normalmente el sitio de unión del disacárido de lípido A al resto de la molécula de LPS);
- (7) el carbono C-4' del anillo de azúcar II (en lípido A natural, este está fosfatado);
- 25 (8) el carbono C-4 del anillo de azúcar I (en lípido A natural, este lleva un hidroxilo libre).

Preferiblemente, los grupos fuertemente lipofílicos están unidos a los C-2 y C-3 del azúcar I y los C-2' y C-3' del
30 azúcar II.

El uso de un enlazador fosfato satisface el requerimiento de un equivalente fosfato, pero se pueden proporcionar otros equivalentes fosfato, si se desea. El uso de un enlazador fosfato es preferido en el caso de sustituciones en el
35 carbono 4' del anillo.

El enlazador -O- se prefiere en los carbonos 4, 3 y 3' y el enlazador -NH- en los carbonos 2 y 2'. Se debe apreciar que si el grupo NH₂ de estos carbonos está lipidado, el NH₂ se convierte en un enlazador NH. Asimismo, si el 4-OH está lipidado, el -OH se convierte en un enlazador -O-.

40 No hay preferencia particular con respecto al enlazador en el carbono anomérico o en los carbonos no de anillo del azúcar.

De forma alternativa o adicional, se puede incorporar al menos un grupo lipofílico en uno o más de los brazos primarios de la unidad Pet, sin convertirse en sustituyente de la unidad de azúcar, si hay alguna. El brazo primario en
45 cuestión puede consistir esencialmente en el grupo fuertemente lipofílico.

El grupo fuertemente lipofílico en general comprenderá una o más cadenas de carbono. Cada cadena de carbono estará compuesta de átomos de carbono unidos secuencialmente por enlaces sencillos, dobles o triples.

50 Las cadenas de carbono que tienen al menos seis carbonos de longitud se consideran cadenas de carbono “principales”. Otras cadenas de carbono se consideran cadenas de carbono “subordinadas”. El grupo fuertemente lipofílico preferiblemente comprende al menos una cadena de carbono principal. No hay preferencia en ningún sentido respecto a la presencia de cadenas de carbono subordinadas.

55 Las cadenas de carbono subordinadas se pueden considerar una especie de enlazador. En las estructuras séptima y octava en la figura 4, hay cadenas subordinadas.

Preferiblemente, no más de un enlace de una cadena de carbono particular es un doble o triple enlace, y más preferiblemente, la cadena de carbono está completamente saturada. Se prefieren los dobles enlaces sobre los triples
60 enlaces.

Los átomos de carbono de una cadena de carbono pueden estar unidos a 3, 2, 1 ó 0 hidrógenos. En una cadena de carbono principal, los carbonos -CH< y >C< normalmente son puntos de ramificación para la unión (con o sin enlazador) de otra cadena de carbono. También pueden estar sustituidas con un grupo lateral, tal como amino o
65 hidroxilo.

Puramente como cuestión de definición, el grupo fuertemente lipofílico no puede comprender una unidad Pet (puede comprender un núcleo Pet si carece de uno o más de los espaciadores requeridos Y1-Y4). Sin embargo, lo que

ES 2 343 788 T3

se podría haber interpretado de otra manera como un gran grupo fuertemente lipofílico que comprende una unidad Pet se puede reinterpretar como una unidad Pet con uno o más grupos fuertemente lipofílicos más pequeños unidos a ella.

5 Los átomos de carbono de cualquier cadena de carbono principal pueden incluir uno o más carbonos carbonilo o tiocarbonilo, es decir, $-C(=O)-$ o $-C(=S)-$. Se prefiere carbonilo. Si solo hay un carbono carbonilo o tiocarbonilo, está preferiblemente al principio de la cadena, de modo que la cadena sea una cadena acilo (saturada o insaturada). De esta manera, si el enlazador es $-O-$, la unión a carbonilo forma un éster ($-O-C(=O)-$), y si es $-NH-$, la unión forma una amida ($-NH-C(=O)-$).

10 Un grupo lipofílico particular puede ser un lípido sencillo (sin ramificar acíclico) o un lípido complejo (ramificado y/o cíclico, incluyendo parcialmente aromático).

15 Si el grupo lipofílico comprende más de una cadena de carbono principal, la cadena principal que empieza lo más cerca al núcleo azúcar o Pet se considera la cadena principal primaria del grupo. Cualquier cadena unida a la cadena principal primaria se considera cadena principal secundaria. Cualquier cadena principal unida a cadenas principales secundarias se considera cadena principal terciaria, etc. (La referencia a cadenas primarias, secundarias, etc. de aquí en adelante es a cadenas principales a menos que se indique de otra manera).

20 Es posible que varias cadenas principales estén igualmente cercanas al núcleo de azúcar o Pet, en cuyo caso cada una será cadena primaria.

Una cadena secundaria puede estar unida al extremo distal (relativo al núcleo de azúcar o Pet) de la cadena primaria, en cuyo caso el grupo lipofílico se mantiene lineal (ausentes otros grupos). O puede estar unida a un carbono interior de la cadena principal, en cuyo caso el grupo lipofílico es un lípido ramificado.

30 Una cadena secundaria se puede unir a la cadena primaria mediante un enlazador sencillo $-O-$, $-S-$ o $-NH-$ o se puede unir directamente sin enlazador (es decir, $C-C$). También se puede unir mediante un enlazador complejo, es decir, una combinación de un enlazador sencillo y el enlazador distal previamente definido. Una cadena terciaria se puede unir a una cadena secundaria de la misma manera, etcétera. Un punto preferido de unión de una cadena de orden mayor a una cadena de orden menor (por ejemplo, secundaria a primaria) es en el carbono C-3 de la cadena de orden inferior (por ejemplo, primaria).

35 Como una cadena primaria, una cadena secundaria o de orden mayor puede comprender átomos de carbono con dobles o triples enlaces y/o carbonos carbonilos o tiocarbonilo.

40 Las diferentes cadenas de carbonos a que se hace referencia anteriormente se pueden sustituir con grupos hidroxilo o amino, siendo preferido el hidroxilo. Las posiciones preferidas para el grupo hidroxilo serían como sustituyentes en el carbono C-2 o C-3 de la cadena.

El grupo fuertemente lipofílico puede ser completamente alifático o puede ser de carácter parcialmente aromático. Si incluye una estructura aromática, se juzga que esa estructura es una cadena de carbono principal separada incluso si está directamente unida a una cadena alifática. Se prefiere un grupo enteramente alifático.

45 Los grupos ácido graso de la forma $-O-CO-Q$, donde Q es principalmente alquilo pero puede incluir alqueno, alquino o enlaces éter, son de interés particular. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos, con frecuencia derivados de o contenidos en un aceite o grasa animal o vegetal. Todos los ácidos grasos están compuestos de una cadena de grupos hidrocarburo que contienen de 4 a 22 átomos de carbono y se caracterizan por un radical carboxilo terminal. Se pueden designar mediante "el número de átomos de carbono: número de dobles enlaces" y opcionalmente las localizaciones del isomerismo cis/trans. De esta manera, los ácidos grasos adecuados incluyen aquellos con designaciones 4:0, 6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 16:1(9c), 18:0, 18:1(9c), 18:2(9c, 12c), 18:3(9c, 12c, 15c), 18:4(6c, 9c, 12c, 15c), 18:3(9c, 11t, 13t), 18:1(9c) 12-OH, 20:1(9c), 20:1(11c), 20:4(8c, 11c, 14c, 17c), 20:5(5c, 8c, 11c, 14c, 17c), 22:0, 22:1(11c), 22:1(13c), 22:5(7c, 10c, 13c, 16c, 19c) y 22:6(4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c), todos los cuales se encuentran en glucósidos naturales.

55 Las estructuras lipídicas que se producen en el lípido A natural de varias especies incluyen ácidos grasos 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 20:0. Los grupos acilo secundarios normalmente están 3-O-unidos. La hidroxilación normalmente es 3-OH o 2-OH. Ciertos lípidos A (por ejemplo, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodobacter sphaeroides*) incluyen grupos acilo secundarios 12:1 de 14:1. Véase Alexander, *et al.*, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 14: 69-86 (Mar. 2002).

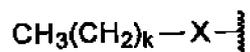
65 En una forma de realización preferida, al menos un grupo fuertemente lipofílico del análogo de lípido A es un grupo fuertemente lipofílico no usado como grupo protector en la síntesis de hidratos de carbono. Los grupos protectores usados en las síntesis de hidratos de carbono incluyen metilo, bencilo, alilo, trilito (trifenilmetilo), varios acetatos, benzoato, etc. Los grupos protectores bencilideno e isopropilideno pueden proteger simultáneamente dos oxígenos de hidroxilo adyacentes. Véase en general Harwood, *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis* (1996); Dekker, *Preparative Carbohydrate Chemistry* (1997); Blackie, *Carbohydrate Chemistry* (1998).

ES 2 343 788 T3

Las siguientes estructuras genéricas son de interés:

(i)

5



donde X es -CO- o -CH₂-, k es un número entero de 4-30;

10

(ii)

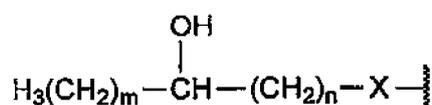
15



donde n es un número entero de 0-6, k es un número entero de 0-30 y 2k+3n es un número entero de 4-30;

(iii)

20



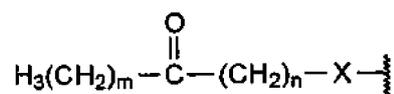
25

donde m y n son números enteros (0-6 para n y 0-30 para m) y m+n+1 es 4-30;

30

(iv)

35

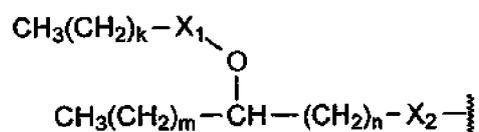


40

donde m+n+1 es 4-30;

(v)

45



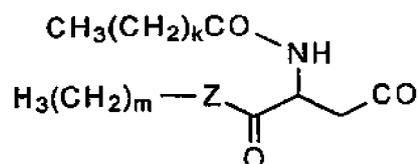
50

donde X₁ y X₂ son independientemente -CO- o -CH₂- y m+n+k+1 es 4-30;

55

(vi)

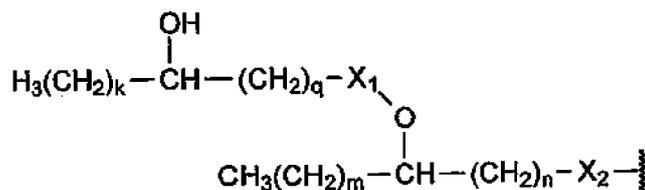
60



65

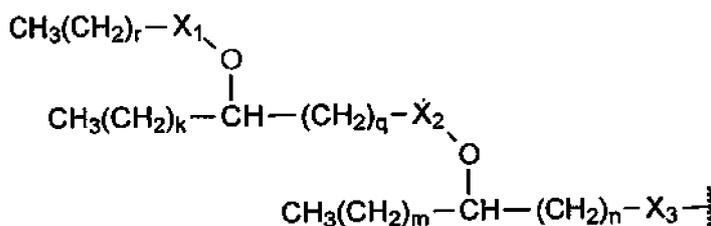
donde Z es -NH- o -O- y k+m+2 es 4-30;

(vii)



donde q es un número entero de 0-6 y k+q+m+n es 4-30;

(viii)



donde X₁, X₂ y X₃ son independientemente -CO- o -CH₂-, r es un número entero de 0-6 y r+k+q+m+n es 5-30.

En cada uno de los casos (i)-(viii), parámetros previamente definidos mantienen su significado.

Véase también los sustituyentes de lípido A sugeridos en USP 6.235.724.

Se entenderá que estos grupos deben aún calificar como grupos fuertemente lipofílicos, que puede constreñir más los parámetros indicados anteriormente.

Las estructuras lipídicas mostradas en la figura 4 son de interés particular. Todas ellas califican como grupos fuertemente lipofílicos.

Componente lipídicos de otros análogos de ligandos glucídicos

Se requiere que los análogos de lípido A de la presente invención comprendan al menos un grupo fuertemente lipofílico. Los análogos de ligando glucídicos de la presente invención que no son análogos de lípido A pueden, pero no es necesario, comprender un grupo fuertemente lipofílico. Esto puede facilitar la integración en un liposoma. Se debe advertir que, para el fin de determinar si un análogo comprende un grupo fuertemente lipofílico, el núcleo Pet requerido se pasa por alto.

Definición de grupos lipofílicos y fuertemente lipofílicos

Los grupos se pueden clasificar como lipofílicos (hidrofóbicos), lipofóbicos (hidrofílicos) o neutros. Se puede determinar la lipofilicidad de los grupos midiendo el coeficiente de reparto de la molécula HZ (donde Z es la cadena lateral en cuestión) entre un solvente no polar (por ejemplo, etanol, dioxano, acetona, benceno, n-octanol) y agua, a temperatura y presión normales. Se puede definir la lipofilicidad como el logaritmo de este coeficiente de reparto; será positivo para moléculas que prefieren el solvente no polar. De esta manera, un *grupo lipofílico* es uno para el que logP es mayor de cero.

El coeficiente de reparto (P) se define como el cociente de las concentraciones de equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema de dos fases que consiste en dos solventes en gran parte inmiscibles. Uno de tales sistemas es n-octanol:agua; la fase de octanol contendrá alrededor del 20% de agua y la fase acuosa alrededor del 0,008% de octanol. De esta manera, el coeficiente de reparto relevante (Pow) es la relación de la concentración molar de soluto en octanol saturado con agua a su concentración molar en agua saturada con octanol. N-octanol es un sustituto útil para membranas biológicas porque, como muchos componentes de membrana, es anfifílico. (La referencia de aquí en adelante a logP significa logPow a menos que se especifique de otra manera).

Para más información sobre métodos para determinar Pow, véase, Sangster, J., *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry* (Abril 1997) (ISBN 0-471- 9739).

Para las tabulaciones de los coeficientes de reparto en octanol-agua, véase "Chemicals in the Environment: OPPT Chemicals Fact Sheets" de la EPA, la base de datos de las propiedades de pesticidas de USDA, Sangster, J., "Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds", *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 18:1111-1230 (1989);

ES 2 343 788 T3

Verbruggen, E.M.J., *et al.*, "Physicochemical Properties of Higher Nonaromatic Hydrocarbons: Literature Study", *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 29:1435-46 (2000). Para más fuentes, véase las referencias citadas en Penn State University Libraries, Physical Sciences Library, octanol-water Partition Coefficients (última actualización 21 de agosto, 2001), en la URL libraries.psu.edu/crsweb/physci/coefficients.htm. Se debe advertir que los valores de Pow compilados para los diferentes compuestos se pueden haber determinado por metodologías diferentes.

Para evitar la necesidad de determinaciones experimentales de logPow, para el propósito de la presente invención, se usará el valor predicho por el método de Meylan.

En el método de Meylan, el logPow predicho se obtiene añadiendo coeficientes ponderados para cada fragmento (el coeficiente crudo multiplicado por el número de copias de ese fragmento) a la constante 0,2290. Los fragmentos considerados incluyen, -CH₃ alifáticamente unido (0,5473), -CH₂- (0,4911), -CH (0,3614), -OH (-1,4086), -NH₂ (-1,4148), -C(=O)N (-0,5236), -SH (-0,0001), -NH- (-1,4962), -N=C (-0,0010), -O- (-1,2566), -CHO (-0,9422), -tert C de modo que C unido 3+ (0,2676), C sin H ni tert (0,9723), -C(=O)O- (-0,9505), -C(=O)- (-1,5586), =CH o C< (0,3836), #C (0,1334), -C(=O)N (-0,5236), -O-CO-C-N-CO (-0,5), -SO-O (-9), -O-P (-0,0162), O=P (-2,4239), -OH unido a fosfato (0,475); C aromático (0,2940), N aromático (anillo de 5 miembros) (-0,5262) y -OH aromáticamente unido (0,4802).

El algoritmo de Meylan se implementa en el programa LogPow (KowWin). Una versión en línea del programa, disponible en esc.syrres.com/interkow/kowdemo.htm acepta número de registro CAS o notaciones de estructuras SMILES. El programa también describe valores determinados experimentalmente, si están en su base de datos.

Se espera que un grupo sea un grupo lipofílico si su logP, como predice el algoritmo de Meylan, es mayor que cero.

Para el propósito de esta divulgación, un grupo fuertemente lipofílico se define como un grupo, que comprende al menos cinco átomos diferentes de hidrógeno, para los que el logP predicho es al menos 3.

Preferiblemente, el logP predicho por el algoritmo de Meylan es al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10, cuanto mayor más preferido.

Preferiblemente, el grupo fuertemente lipofílico comprenderá no más de 100 átomos diferentes de hidrógeno, más preferiblemente, no más de 80 de tales átomos, aún más preferiblemente, no más de 60 de tales átomos, incluso más preferiblemente no más de 40 de tales átomos.

Como se ha advertido previamente, el grupo fuertemente lipofílico debe comprender al menos cinco átomos diferentes de hidrógeno. Preferiblemente, comprende al menos seis, más preferiblemente al menos 8, aún más preferiblemente al menos 9, incluso preferiblemente, comprende al menos 11 de tales átomos, aún más preferiblemente al menos 13 de tales átomos, lo más preferiblemente al menos 21 de tales átomos.

Preferiblemente, el grupo fuertemente lipofílico tiene una composición de elementos limitada a los elementos carbono, silicio, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Preferiblemente, la mayoría de los enlaces en la cadena lateral que no implican hidrógeno son enlaces carbono-carbono.

Puesto que la presencia de oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo tiende a reducir la lipofilidad, en el grupo fuertemente lipofílico, preferiblemente más del 50%, aún más preferiblemente más del 75% de los átomos no de hidrógeno son átomos de carbono.

Por la misma razón, el grupo fuertemente lipofílico preferiblemente comprende al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 átomos de carbono.

Aplicaciones de la definición de lipofilidad

Usando el programa LogKow, se han calculado (véase más adelante) los valores de Pow bajos para las estructuras mostradas en la figura 4 o consideradas de otra manera dignas de comparación.

| SMILES (minúscula es aromático) | Comentarios | LogP predicho |
|---------------------------------|---------------|---------------|
| CCCCC | alquilo (C5) | 2,80 |
| CCCCC C | alquilo (C6) | 3,29 |
| CCCCC CCCCC CCCCC CCCCC | alquilo (C20) | 10,16 |
| CCCC O CCCC | | 3,01 |
| CC(C)(C)C | núcleo Pet | 2,69 |

ES 2 343 788 T3

| Estructuras de la figura 4 | | | |
|----------------------------|--|--|-------|
| 5 | CCCCC CCCCC CCCC | alquilo (C14) | 7,22 |
| | O=C CCCCC CCCCC CCC | acilo (14:0) | 5,73 |
| | CO CC(O) CCCCC CCCCC C | 14:0, 3-OH | 4,19 |
| | O=C CC(=O) CCCCC CCCCC | | 3,68 |
| 10 | O=C CC(O C(=O)CCCCC CCCCC CCC) CCCCC CCCCC C | 14:0, 3-O-(14:0) | 11,09 |
| 15 | O=C CC(O C(=O)CCCCC C=CCCC CCC) CCCCC CCCCC C | 14:0, 3-O-(14:1) | 10,87 |
| | O=C C(COC(=O)CCCCC CCCCC CCC) CO C(=O) CCCCC CCCCC CCC | | 11,61 |
| 20 | O=C CC(NC(=O)CCCCC CCCCC CCC) C(=O)O CCCCC CCCCC C | acilo secundario N- unido | 9,57 |
| 25 | O=C CC(OC(=O)CC(O CCCCC CCCCC CC) CCCCC CCCCC C)CCCCC CCCCC C | tiene cadena de acilo terciaria O-unida | 15,65 |

El logP predicho se usa incluso si está disponible un logP experimental, por ejemplo, para el núcleo Pet, es de 3,11.

30 *Ligando glucídicos de referencia; análogos de ligandos glucídicos*

Un ligando glucídico de referencia, para el propósito de la presente invención, es un compuesto que comprende una o más unidades de amino azúcares como se definen aquí posteriormente y que no comprende un núcleo Pet, que sea capaz de unirse específicamente a un receptor como resultado, al menos en parte, de la presencia de dichas unidades de azúcar. Este ligando de referencia se puede dar, pero no es necesario, en la naturaleza.

El receptor puede ser un receptor celular o puede ser un anticuerpo. El anticuerpo puede ser, pero no es necesario, natural, por ejemplo, como parte de la respuesta inmune a una enfermedad. Cuando el receptor es un anticuerpo, el ligando se puede considerar un antígeno. Si es capaz de provocar una respuesta inmune por sí mismo, se considera un inmunógeno. De otra manera, se considera un hapteno.

El ligando glucídico de referencia preferiblemente tiene una actividad de unión específica para tal receptor (de-seablemente, con una afinidad de unión caracterizada por una K_d menor -es decir, mejor- de 10-3 litros/mol) y, más preferiblemente, una actividad biológica o inmunológica atribuible a tal unión al receptor.

Algunos ligandos glucídicos de referencia se presentan en la sección "Haptenos glucídicos" posteriormente, y otros lo están en las figuras 19 y 20.

Además, se pueden considerar los antibióticos que contienen hidratos de carbono, tal como el azúcar puro nojirimicina, los aminoglicósidos estreptomina, kanamicina y gentamicina C, el N-glicósido estreptotricina, el C-glicósido vancomicina y el glicolípido moenomina A.

También puede ser un ligando antitumoral, tal como varios oligosacáridos sulfatados, en particular sulfato de fosfomanopentosa (PI-88), y sulfato de maltohexosa. Véase, Parish, *et al.*, Cancer Res., 59: 3433-41 (1999).

O puede ser un ligando antivírico, tal como el aza azúcar 6-O-benzoil castanospermina, un agente contra la enfermedad de Parkinson, tal como el glicolípido gangliósido G, un anticonvulsivo, tal como topiramato o un inhibidor de la glucosidasa para terapia de la diabetes tal como un aza azúcar o un antitrombótico, tal como el glucosaminoglicano heparina.

Los análogos de ligandos glucídicos de la presente invención son compuestos que pueden competir con un ligando glucídico de referencia, como se ha definido anteriormente, para la unión a un receptor y que se diferencian del ligando glucídico de referencia en que al menos una unidad de amino azúcar del ligando glucídico de referencia se cambia por un grupo (núcleo Pet)-NH-. Normalmente serán sustancialmente idénticos al ligando glucídico de referencia, sin contar tal cambio.

ES 2 343 788 T3

El ligando glucídico de referencia puede comprender unidades de azúcar que no son amino azúcares. También puede comprender grupos no glucídicos sustanciales, tales como, sin limitación, lípidos, sulfatos, fosfatos, aminoácidos y nucleobases. Puede ser así un glicolípido o glicopéptido.

5 Se puede considerar un análogo de ligando glucídico sustancialmente idéntico al ligando glucídico de referencia si:

(1) para cada unidad de azúcar en el ligando de referencia, hay una unidad de azúcar correspondiente sustancialmente idéntica o una unidad Pet correspondiente en el análogo.

10 (2) La topología básica de las unidades de azúcar del ligando de referencia es sustancialmente idéntica a las unidades de azúcar o Pet correspondientes en el análogo.

15 Se considera una unidad de azúcar sustancialmente idéntica a otra si

(1) son ambas abiertas o ambas cíclicas

20 (2) si ambas son cíclicas, los tamaños de los anillos son iguales y los heteroátomos del anillo son iguales (normalmente oxígeno),

(3) si la configuración de un hidroxilo del anillo está limitada (axial o ecuatorial) en el azúcar del ligando de referencia, el hidroxilo bien se mantiene en la unidad de azúcar análoga o se cambia por halógeno o por tiol,

25 (4) si la configuración limitada del hidroxilo se mantiene en la unidad de azúcar análoga, está limitada de la misma manera (axial o ecuatorial) en la unidad de azúcar análoga,

(5) los carbonos del anillo que están aminados en la unidad de azúcar del ligando de referencia están aminados en la unidad de azúcar del análogo, y ningún otro carbono del anillo está aminado;

30 (6) la configuración (alfa o beta) del carbono anomérico en la unidad de azúcar del ligando de referencia se mantiene en la unidad de azúcar del análogo.

35 Las modificaciones permisibles incluyen (1) cambio o delección de sustituyentes, diferentes de hidroxilo, en carbonos del anillo de la unidad de azúcar del ligando de referencia, (2) cambio o delección de sustituyentes en los carbonos del anillo inmediatamente adyacentes al heteroátomo del anillo. El cambio puede ser por un grupo químico más grande que el grupo original.

40 A modo de ejemplo, galactosa, glucosa y fucosa son todas hexosas (unidades de azúcar de 6 carbonos), aldosas y piranosas (con anillos de 6 miembros; un oxígeno, cinco átomos de carbono). Se diferencian en que Gal tiene un 4-OH axial, Glc tiene un 4-OH ecuatorial y Fuc tienen un 4-OH axial pero le falta un 6-OH; es decir, es 6-desoxi-L-galactosa. Los carbonos inmediatamente adyacentes al oxígeno del anillo son los carbonos C-1 y C-5. El sustituyente de C-1 es OH y el sustituyente de C-5 es CH₂OH en Gal y Glc y CH₃ en Fuc.

45 Estos sustituyentes de C-1 y C-5 se pueden deleccionar o cambiar libremente, excepto que no se pueden aminor directamente. Los átomos C-2, C-3 y C-4 llevan cada uno hidroxilo de configuración limitada. Estos sólo se pueden cambiar por tiol o halógeno.

50 El cambio o delección de sustituyentes se limita además si el sustituyente del carbono del anillo de la unidad de azúcar del ligando de referencia comprende otra unidad de azúcar. El sustituyente no se puede deleccionar del todo y se puede cambiar sólo por un sustituyente que comprenda una unidad de azúcar o una unidad Pet.

55 La topología básica es sustancialmente idéntica si por cada par de unidades de azúcar que están unidas directamente en el ligando de referencia, las unidades de azúcar correspondientes (o unidades Pet) se deben unir directamente en el análogo. Las uniones de consideración directas si no comprenden otra unidad de azúcar o unidad Pet y si la cadena más directa de átomos entre las dos unidades no tiene más de tres veces la longitud de la unión original. No es necesario que la naturaleza química del enlace sea la misma, por ejemplo, un enlace glucosídico se puede cambiar por un enlace éter.

60 A modo de ejemplo, en un análogo de Lewis X, solo hay un amino azúcar (GlcNAc), de modo que se cambia por Pet-NH-. También había una Fuc con unión alfa-O 1->4 al amino azúcar y una Gal con unión beta-O 1->3 al mismo azúcar. El análogo sería, Fuc alfa, unida a través de su carbono C-1 a un grupo que comprende Pet, el último está unido al carbono C-1 de Gal beta. En ambos azúcares mantenidos, el sustituyente de C-5 se podría cambiar o incluso eliminar (los azúcares serían entonces pentosas más que hexosas). Además, cualquiera de los hidroxilos de C-2, C-3 y C-4 se podría cambiar por tiol o halógeno.

Se debe advertir que los análogos de Lewis X también serían análogos de Lewis-a.

Sales farmacéuticamente aceptables

Los análogos de ligandos de la presente invención también incluyen sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos divulgados. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitadas a, sales de sodio, potasio, calcio y magnesio.

Hidratos de carbono

El término “hidrato de carbono” (azúcar) incluye monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, así como sustancias derivadas de los monosacáridos por reducción del grupo carbonilo (alditoles), mediante oxidación de uno o más grupos terminales a ácido carboxílico o mediante cambio de uno o más grupos hidroxilo por un átomo de hidrógeno, un grupo amino, un grupo tiol o grupos heteroatómicos similares. También incluye derivados de los anteriores.

Monosacáridos

Los monosacáridos parentales son aldehídos polihidroxi ($H[CHOH]_n-CHO$) o cetonas polihidroxi ($H-[CHOH]_n-CO-[CHOH]_m-H$) con tres o más átomos de carbono. El término “unidad de monosacárido”, “unidad de hidrato de carbono” o “unidad de azúcar” se refiere a un residuo de un monosacárido, incluyendo los derivados de monosacáridos contemplados aquí.

Cada unidad de monosacárido es preferiblemente una triosa (por ejemplo, gliceraldehído), tetrosa (por ejemplo, eritrosa, treosa), pentosa (por ejemplo, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa), hexosa (por ejemplo, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa), heptosa u octosa. Más preferiblemente es una pentosa o hexosa.

Cada unidad de monosacárido puede ser una aldosa (que tiene un grupo carbonilo aldehído o carbonilo aldehídico potencial) o una cetosa (que tiene un grupo carbonilo cetona o carbonilo cetónico potencial). (La fructosa es un ejemplo de una cetosa). La unidad de monosacárido puede contener además más de un grupo carbonilo (o carbonilo potencial) y por lo tanto puede ser una dialdosa, dicetosa o aldocetosa. El término “grupo carbonilo aldehídico potencial” se refiere al grupo hemiacetal que surge del cierre del anillo y el homólogo cetónico (la estructura hemiacetal).

La unidad de monosacárido puede ser un hemiacetal o hemiacetal cíclico. Las formas cíclicas con un anillo de tres miembros son oxirosas, con cuatro oxetosas, con cinco furanosas, con seis, piranosas, con siete, septanosas, con ocho, octavirus etcétera. Los localizadores de las posiciones del cierre del anillo pueden variar. Nótese que en los azúcares cíclicos más comunes, el anillo consiste en un oxígeno de anillo, siendo los átomos restantes del anillo carbono; por tanto, en piranosa, hay un oxígeno de anillo y cinco carbonos de anillo.

La unidad de monosacárido puede ser además un desoxiazúcar (grupo alcoholico hidroxilo cambiado por hidrógeno), amino azúcar (grupo alcoholico hidroxilo cambiado por grupo amino), un tio azúcar (grupo alcoholico hidroxilo cambiado por un tiol, o $C=O$ cambiado por $C=S$, o un oxígeno de anillo de la forma cíclica cambiado por azufre), un seleno azúcar, un teluro azúcar, un aza azúcar (carbono de anillo cambiado por nitrógeno), un imino azúcar (oxígeno del anillo cambiado por nitrógeno), un fosfano azúcar (oxígeno del anillo cambiado por fósforo), un fosfa azúcar (carbono del anillo cambiado por fósforo), un monosacárido C-sustituido (hidrógeno en un átomo de carbono no terminal cambiado por carbono), un monosacárido insaturado, un alditol (grupo carbonilo cambiado por grupo $CHOH$), ácido aldónico (grupo aldehídico cambiado por grupo carboxilo), un ácido cetoaldónico, un ácido urónico, un ácido aldárico, etcétera. Los amino azúcares incluyen glicosilaminas, en las que el grupo hidroxilo hemiacetal se cambia.

Los derivados de estas estructuras incluyen derivados O-sustituidos, en los que el hidrógeno del hidroxilo alcoholico se cambia por alguna otra cosa. Los cambios posibles incluyen alquilo, acilo, fosfato, fosfonato, fosfinato y sulfato. Asimismo, los derivados de amino azúcares incluyen derivados N-sustituidos y los derivados de tio azúcares incluyen derivados S-sustituidos.

El ácido siálico, también conocido como ácido N-acetil neuramínico (NANA), es de interés particular. Es el azúcar terminal en varios epítomos glucídicos asociados a tumor.

Combinaciones

Se puede usar cualquiera de los análogos de ligandos glucídicos de la presente invención en combinación entre sí, con otros ligandos glucídicos (incluyendo, pero no limitado a, los ligandos glucídicos de referencia y otros análogos de los mismos) y otros agentes farmacéuticos. Cuando se usa el análogo del ligando como un agente inmunológico, se puede usar en combinación con otros agentes inmunológicos. Los agentes inmunológicos incluyen antígenos (incluyendo tanto inmunógenos como haptenos), adyuvantes y otras moléculas inmunomoduladoras (incluyendo citoquinas).

Se puede usar cualquiera de los análogos del lípido A de la presente invención en combinación entre sí, con otros análogos de lípido A, con moléculas naturales de lípido A y otros agentes farmacéuticos. Los últimos pueden ser agentes inmunológicos.

ES 2 343 788 T3

Una combinación puede ser un conjugado covalente, un conjugado no covalente, una mezcla sencilla o el uso tal que todos los elementos de la combinación sean activos simultáneamente en el sujeto al que se administran. La actividad simultánea se puede, pero no es necesario, alcanzar mediante administración simultánea. Los compuestos pueden ser activos simultáneamente incluso si no se administran de forma simultánea, por ejemplo, se administra el compuesto A con una semivida larga antes que el compuesto B con semivida corta, pero A está aún presente en el cuerpo a un nivel eficaz cuando se administra B.

Inmunógeno

El inmunógeno de la presente invención es una molécula, que comprende al menos un epítipo de células B o T asociado a enfermedad, como se define posteriormente, y que, cuando se administra de forma adecuada a un sujeto (que, en algunos casos, puede significar asociado con un liposoma o con una célula presentadora de antígeno), provoca una respuesta inmune humoral y/o celular que es protectora contra la enfermedad.

La presente invención contempla

- (1) el uso de los análogos de lípido A divulgados para estimular la inmunidad innata,
- (2) el uso de los análogos de lípido A divulgados como adyuvante de la respuesta inmune específica para un inmunógeno administrado y
- (3) el uso de un inmunógeno que comprende al menos uno de los análogos de ligandos glucídicos divulgados para provocar una respuesta inmune específica, con o sin el uso de los análogos de lípido A/Pet divulgados como adyuvantes. (En el caso (3), el análogo de ligando glucídico comprende un epítipo glucídico asociado a enfermedad como se define más adelante).

Si el epítipo es un epítipo glucídico, puede ser un análogo de un epítipo natural que contiene al menos un amino azúcar, en el que al menos un amino azúcar se cambia por una unidad Pet aminada.

Epítipo

Los epítipos de la presente invención pueden ser epítipo de células B o de células T y pueden ser de cualquier naturaleza química, incluyendo sin limitación péptidos, hidratos de carbono, lípidos, glicopéptidos y glicolípidos. El epítipo puede ser idéntico a un epítipo natural o una forma modificada de un epítipo natural.

Un término tal como “epítipo MUC1”, sin calificación adicional, se pretende que abarque, no sólo un epítipo nativo de MUC1, sino también un epítipo mutante que es sustancialmente idéntico a un epítipo nativo. Tal epítipo mutante debe dar reacción cruzada con un epítipo MUC1 nativo. Asimismo, un término tal como “epítipo asociado a tumor” incluye tanto epítipos nativos como mutantes, pero el epítipo mutante debe dar reacción cruzada con el epítipo asociado a tumor nativo.

Epítipos de células B

Los epítipos de células B son epítipos reconocidos por células B y por anticuerpos. Los epítipos peptídicos de células B típicamente tienen al menos cinco aminoácidos, con más frecuencia al menos seis aminoácidos, aún con mayor frecuencia al menos siete u ocho aminoácidos de longitud, y pueden ser continuos (“lineal”) o discontinuos (“conformacional”) (el último está formado por el plegamiento de una proteína para poner en proximidad física partes no contiguas de la secuencia primaria de aminoácidos). Los epítipos de células B también pueden ser epítipos glucídicos.

Epítipos de células T

El epítipo de células T, si hay alguno, puede ser cualquier epítipo de células T que sea al menos sustancialmente el mismo que el epítipo de células T de un antígeno incluyendo un hapteno, que se asocia con una enfermedad o un proceso adverso en un grado tal que podría ser profiláctica o terapéuticamente útil para estimular o potenciar una respuesta celular inmune a ese epítipo. Tales enfermedades y afecciones incluyen, pero no están limitadas a, enfermedades parasíticas tales como esquistosomiasis y leishmania, infecciones fúngicas tal como candidiasis, infecciones bacterianas tal como lepra, infecciones víricas tales como infección de VIH y cánceres, especialmente tumores sólidos. Por supuesto, cuanto mayor sea el grado de especificidad del epítipo para la enfermedad o proceso adverso asociados, más probable será que la estimulación de una respuesta inmune a ese epítipo esté libre de efectos secundarios.

El epítipo debe, por supuesto, ser sensible al reconocimiento por receptores de células T de modo que se pueda producir una respuesta de células T. Para péptidos, los epítipos de células T pueden interactuar con moléculas de MHC de clase I o clase II. Los epítipos de clase I normalmente de 8 a 15, con más frecuencia 9-11 aminoácidos de longitud. Los epítipos de clase II normalmente tienen 5-24 (un 24-mero es el péptido más largo que puede encajar en un surco de clase II), con más frecuencia 8-24 aminoácidos. Si el inmunógeno es mayor que estos tamaños, el sistema inmune lo procesará en fragmentos de un tamaño más adecuado para la interacción con moléculas de MHC de clase I o II.

ES 2 343 788 T3

Los epítomos glucídicos de células T pueden ser tan pequeños como una única unidad de azúcar (por ejemplo, Tn), Preferiblemente no son mayores de cinco azúcares.

5 Se conocen muchos epítomos de células T. En la técnica se reconocen varios métodos de identificar epítomos de células T adicionales. En general, estos implican preparar una molécula que potencialmente proporciona un epítomo de célula T y caracterizar la respuesta inmune a esa molécula. Los métodos para caracterizar la respuesta inmune se discuten más adelante en esta sección.

10 La referencia a un epítomo CTL como que está “restringido” por un alelo particular de moléculas de MHC de clase I, tal como HLA-A1, indica que tal epítomo se une y presenta por la forma alélica en cuestión. No significa que dicho epítomo no se pudiera unir y presentar también por una forma alélica diferente de MHC, tal como HLA-A2, HLA-A3, HLA-B7 o HLA-B44.

15 *Epítomos asociados a enfermedad y específicos de enfermedad*

Una enfermedad es un estado clínico adverso producida por la infección o parasitación por un virus, organismo unicelular u organismo multicelular, o por el desarrollo o proliferación de células cancerosas (tumoraes).

20 El organismo unicelular puede ser cualquier patógeno o parásito unicelular, incluyendo una bacteria, hongo o protozoo. El organismo multicelular puede ser cualquier patógeno o parásito, incluyendo un protozoo, gusano o artrópodo. Los organismos multicelulares incluyen tanto endoparásitos como ectoparásitos. Es más probable que los endoparásitos provoquen una respuesta inmune, pero, al nivel que pueden provocar una respuesta inmune protectora, los ectoparásitos y sus antígenos están dentro del alcance de la presente invención.

25 Se puede decir que un epítomo se asocia directamente con una enfermedad vírica si está presentado por una partícula vírica o si está codificado por el genoma vírico y se expresa en una célula infectada.

Se puede decir que un epítomo se asocia directamente con una enfermedad producida por un organismo unicelular o multicelular si está presentado por un antígeno intracelular, de superficie o secretado del organismo causante.

30 Se puede decir que un epítomo se asocia directamente con un tumor particular si está presentado por un antígeno intracelular, de superficie o secretado de dicho tumor. No necesita ser presentado por todas las líneas celulares del tipo de tumor en cuestión, o por todas las células de un tumor particular, o a lo largo de la vida entera del tumor. No necesita ser específico del tumor en cuestión. Se puede decir que un epítomo está “asociado a tumor” en general si se asocia de tal manera con cualquier tumor (cáncer, neoplasia).

40 Los tumores pueden ser de origen mesenquimatoso o epitelial. Los cánceres incluyen cánceres de colon, recto, cuello uterino, mama, pulmón, estómago, útero, piel, boca, lengua, labios, laringe, riñón, vejiga, próstata, cerebro y células sanguíneas.

Un epítomo se puede asociar indirectamente con una enfermedad si el epítomo es de un antígeno que se produce o sobreproduce específicamente por células infectadas del sujeto o que se produce o sobreproduce específicamente por otras células del sujeto en respuesta específica, pero no inmunológica a la enfermedad, por ejemplo, un factor angiogénico que se sobreexpresa por las células cercanas como resultado de las sustancias reguladoras secretadas por un tumor.

50 El término “epítomo asociado a enfermedad” también incluye cualquier epítomo no natural que sea suficientemente similar a un epítomo asociado de forma natural con la enfermedad en cuestión de modo que los anticuerpos o células T que reconocen el epítomo natural de la enfermedad también reconozcan el epítomo similar no natural. Comentarios similares aplican a epítomos asociados con enfermedades particulares o clases de enfermedad.

Se puede decir que un epítomo es específico a una fuente particular (tal como un organismo causante de una enfermedad o, más en particular, un tumor), si se asocia con más frecuencia con esa fuente que con otras fuentes, a un nivel detectable y clínicamente útil. No se requiere la especificidad absoluta, siempre que aún se obtenga un efecto profiláctico, terapéutico o diagnóstico útil.

60 En el caso de un epítomo “específico de un tumor específico”, el epítomo se asocia con mayor frecuencia con ese tumor que con otros tumores o con células normales. Preferiblemente, debe haber una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,05$) entre su frecuencia de aparición en asociación con el tumor en cuestión y su frecuencia de aparición en asociación con (a) células normales del tipo del que deriva el tumor y (b) al menos otro tipo de tumor. Se puede decir que un epítomo es “específico de tumor” en general si se asocia con mayor frecuencia con tumores (de cualquiera o todos los tipos) que con células normales. No necesita asociarse con todos los tumores.

65 El término “epítomo específico de tumor” también incluye cualquier epítomo no natural que sea suficientemente similar a un epítomo natural específico del tumor en cuestión (o como sea apropiado, específico a tumores en general) de modo que los anticuerpos o células T estimulados por el epítomo similar serán esencialmente tan específicos como los CTL estimuladas por el epítomo natural.

ES 2 343 788 T3

En general, la especificidad tumor contra normal es más importante que la especificidad tumor contra tumor ya que (dependiendo de la vía de administración y el tejido normal particular afectado), mayor especificidad en general produce menos efectos secundarios. La especificidad tumor contra tumor es más importante en usos diagnósticos en oposición a los terapéuticos.

El término “específico” no se pretende que connote especificidad absoluta, simplemente una diferencia clínicamente útil en probabilidad de aparición en asociación con un patógeno o tumor más que en un sujeto normal correspondiente.

En una forma de realización, el epítipo es un epítipo asociado a parásito, tal como un epítipo asociado con leishmania, malaria, tripanosomiasis, babesiosis o esquistosomiasis. En otra forma de realización, el epítipo es un epítipo vírico, tal como un epítipo asociado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de Epstein-Barr (EBV) o hepatitis.

El epítipo también se puede asociar con un antígeno bacteriano, tal como un antígeno de la bacteria de la tuberculosis, *Staphylococcus*, *E. coli* o *Shigella sonnei*.

En otra forma de realización, el epítipo se asocia con un cáncer (tumor), incluyendo pero no limitado a, cánceres del aparato respiratorio (pulmón, tráquea, laringe), aparato digestivo (boca, garganta, estómago, intestinos), aparato excretor (riñón, vejiga, colon, recto), sistema nervioso (cerebro), aparato reproductor (ovario, útero, cuello uterino), aparato glandular (mama, hígado, páncreas, próstata), piel, etc. Los dos grupos principales de cánceres son sarcomas, que son de origen mesenquimatoso y afectan a tales tejidos como huesos y músculos, y carcinomas, que son de origen epitelial y producen la gran mayoría de cánceres glandulares de mama, estómago, útero, piel y lengua. Los sarcomas incluyen fibrosarcomas, linfosarcomas, osteosarcomas, condrosarcomas, rabdosarcomas y liposarcomas. Los carcinomas incluyen adenocarcinomas, carcinomas de células basales y carcinomas escamosos.

Los epítipos asociados a cáncer incluyen, pero no están limitados a, epítipos peptídicos tales como los de p53 mutante, el producto génico del oncogén Ras con mutación puntual, her 2/neu, c/erb2 y la proteína nuclear MUC1, y epítipos glucídicos tales como sialil Tn (STn), TF, Tn, CA 125, sialil Le^x, sialil Le^a y P97.

Identificación de epítipos naturales

Los epítipos naturales se pueden identificar mediante un proceso de división y prueba. Se empieza con una proteína que se sabe que es antigénica o inmunogénica. A continuación se prueba la actividad inmunológica de fragmentos de la proteína. Estos fragmentos se pueden obtener mediante tratamiento de la proteína con un agente proteolítico o, si se conoce la secuencia peptídica, se pueden preparar sintéticamente péptidos más pequeños correspondientes a subsecuencias de la proteína. Los fragmentos probados pueden abarcar la secuencia completa de la proteína o solo una parte de la misma, y pueden ser contiguos, solapantes o separados.

Si cualquiera de los fragmentos es inmunológicamente activo, se pueden someter los fragmentos activos mismos a análisis de división y prueba, y el proceso puede continuar hasta que se identifiquen las secuencias inmunológicamente activas de longitud mínima. Este planteamiento se puede usar para identificar epítipos de células B o de células T, aunque los ensayos sean por supuesto diferentes. Geysen enseña el cribado sistemático de la actividad inmunológica de todos los fragmentos adyacentes o solapantes de oligopéptidos posibles (pref. de 6-10 aa) de una proteína particular para identificar epítipos lineales. Véase WO 84/03564.

También es posible predecir la localización de epítipos peptídicos de células B o células T si está disponible una secuencia de aminoácidos. Los epítipos de células B tienden a estar en regiones de alta hidrofiliidad local media. Véase Hopp y Wood, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 78: 3824 (1981); Jameson y Wolf, CABIOS, 4: 181 (1988). Se pueden predecir los epítipos de células T en base a secuencias consenso conocidas para péptidos que se unen a moléculas de MHC de clase I de células de un haplotipo particular. Véase, por ejemplo, Slingluff, W098/33810, especialmente pp. 15-16; Parker, *et al.*, “Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side chains”, J. Immunol. 152: 163 (1994).

Los epítipos de células T naturales se pueden recuperar disociándolos de sus complejos con moléculas de MHC de clase I y después secuenciándolos, por ejemplo, mediante técnicas de espectrometría de masas.

En términos generales, además de los epítipos que son idénticos a los epítipos naturales específicos de enfermedad o tumor, la presente invención abarca epítipos que son diferentes pero sustancialmente idénticos a tales epítipos y por tanto específicos de enfermedad o tumor por derecho propio. También incluye epítipos que no son sustancialmente idénticos al epítipo natural, pero que sin embargo dan reactividad cruzada con el último debido a la similitud en la conformación tridimensional.

Epítipos peptídicos

Un epítipo peptídico se considera sustancialmente idéntico a un epítipo peptídico de referencia (por ejemplo, un epítipo natural) si tiene al menos el 10% de actividad inmunológica del epítipo de referencia se diferencia del epítipo de referencia en no más de una sustitución no conservadora.

Haptenos glucídicos; epítomos

El hapteno glucídico de la presente invención es un hidrato de carbono que comprende (y preferiblemente es idéntico a) un epítomo glucídico, pero que no provoca una respuesta inmune humoral por sí mismo.

5

Normalmente, un hapteno glucídico no será un polisacárido, ya que un polisacárido normalmente es lo suficientemente grande para ser inmunogénico por derecho propio. El límite entre un oligosacárido y un polisacárido no es fijo, sin embargo, se define un oligosacárido como que consiste en de 2 a 20 unidades de monosacárido (azúcar).

10 El hapteno puede ser un monosacárido (sin unión glucosídica a otra de tales unidades) o un oligosacárido. Si es un oligosacárido, preferiblemente no tiene más de 10 unidades de azúcar.

Los epítomos glucídicos asociados a tumores son de interés particular.

15 Se pueden conjugar una variedad de hidratos de carbono según la presente invención, para usar particularmente en detectar y tratar tumores. Los haptenos Tn, T, sialil Tn y sialil (2->6)T son particularmente preferidos.

En particular, para detectar y tratar tumores, los tres tipos de epítomos glucídicos asociados a tumores que se expresan mucho en cánceres comunes humanos se conjugan con compuestos aminados. Estos incluyen particularmente las cadenas de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2, las ganglio cadenas asociadas a cáncer y glicoesfingolípidos neutros.

20

Los ejemplos de cadenas de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2 son como sigue: Lewis a, Lewis a dimérico, Lewis b, Lewis b/Lewis a, Lewis x, Lewis, y, Lewis a/Lewis x, Lewis x dimérico, Lewis y/Lewis x, trifucosil Lewis y, trifucosil Lewis b, sialosil Lewis x, sialosil Lewis y, sialosil Lewis x dimérico, Tn, sialosil Tn, sialosil TF, TF. Los ejemplos de ganglio cadenas asociadas a cáncer son como sigue: GM3, GD3, GM2, GM4, GD2, GM1, GD-1a, GD-1b. Los esfingolípidos neutros incluyen globotriosa, globotetraosa, globopentaosa, isoglobotriosa, isoglobotetraosa, mucotriosa, mucotetraosa, lactotriosa, lactotetraosa, neolactotetraosa, gangliotriosa, gangliotetraosa, galabiosa y 9-O-acetil-GD3.

25

30 Numerosos antígenos de significación clínica llevan determinantes glucídicos. Un grupo de tales antígenos comprende las mucinas asociadas a tumor (Roussel, *et al.*, *Biochimie* 70, 1471, 1988).

En general, las mucinas son glicoproteínas encontradas en saliva, jugos gástricos, etc., que forman soluciones viscosas y actúan como lubricantes o protectores en las superficies externas e internas del cuerpo. Las mucinas son típicamente de alto peso molecular (con frecuencia >1.000.000 de dalton) y extensamente glicosiladas. Las cadenas de glicanos de las mucinas están O-unidas (a residuos de serina o treonina) y pueden ascender a más del 80% de la masa molecular de la glicoproteína. Las mucinas se producen por las células epiteliales ductales y por tumores del mismo origen y se pueden secretar, o unirse a células como proteínas integrales de membrana (Burchell, *et al.*, *Cancer Res.*, 47, 5476, 1987; Jerome, *et al.*, *Cancer Res.*, 51, 2908, 1991).

35

Los tejidos cancerosos producen mucinas anómalas que se sabe están relativamente menos glicosiladas que sus homólogos normales (Hull, *et al.*, *Cancer Commun.*, 1, 261, 1989). Debido a alteraciones funcionales de la maquinaria de glicosilación de proteínas en células cancerosas, las mucinas asociadas a tumor típicamente contienen glicanos cortos, incompletos. De esta manera, mientras que la mucina normal asociada con los glóbulos grasos de la leche humana consiste principalmente en el glicano tetrasacárido, gal β 1-4 glcNAcp1-6(gal β 1-3) gal NAc- α y sus análogos sialilados (Hull, *et al.*), el hapteno Tn asociado a tumor consiste sólo en el residuo de monosacárido, α -2-acetamido-3-desoxi-D-galactopiranosil y el hapteno T en el disacárido β -D-galactopiranosil-(1-3) α -acetamido-2-desoxi-D-galactopiranosil. Otros haptenos de mucinas asociadas a tumor, como los haptenos sialil-Tn y sialil-(2-6)T, surgen de la unión de residuos terminales de sialilo a los glicanos cortos Tn y T (Hanisch, *et al.*, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 370, 21, 1989; Hakomori, *Adv. Cancer Res.*, 52:257, 1989; Torben, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 45 666, 1980; Samuel, *et al.*, *Cancer Res.*, 50, 4801, 1990).

40

45

Los antígenos T y Tn (Springer, *Science*, 224, 1198, 1984) se encuentran en forma inmunorreactiva en membranas de la superficie externa de la mayoría de las células de carcinomas primarios y sus metástasis (>90% de todos los carcinomas humanos). Como marcadores de cáncer, T y Tn permiten la detección inmunohistoquímica temprana y el pronóstico de invasividad de algunos carcinomas (Springer). Recientemente, se ha identificado la presencia del hapteno sialil-Tn en tejidos tumorales como un parámetro pronóstico desfavorable (Itzkowitz, *et al. Cancer*, 66, 1960, 1990; Yonezawa, *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 98 167, 1992). Tres tipos diferentes de antígenos glucídicos asociados a tumor se expresan mucho en cánceres humanos comunes. Los haptenos T y Tn están incluidos en las cadenas de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2. Además, las ganglio cadenas asociadas a cáncer y glicoesfingolípidos se expresan en una variedad de cánceres humanos.

50

Los determinantes de glicano alterados mostrados por las mucinas asociadas a cáncer son reconocidos como no propio o extraño por el sistema inmune del paciente (Springer). En efecto, en la mayoría de los pacientes, se observa una respuesta autoinmune fuerte al hapteno T. Estas respuestas se pueden medir fácilmente y permiten la detección de carcinomas con mayor sensibilidad y especificidad, más temprano de lo que ha sido posible anteriormente. Por último, el grado de expresión de T y Tn con frecuencia se correlaciona con el grado de diferenciación de los carcinomas (Springer).

55

60

ES 2 343 788 T3

Aparece una extensa discusión de los haptenos glucídicos en Wong, USP 6.013.779. Se pueden incorporar una variedad de hidratos de carbono a un inmunógeno glicopeptídico sintético, según la presente invención, para su uso particularmente en la detección y tratamiento de tumores. Los haptenos, Tn, T, sialil Tn y sialil (2-->6)T son particularmente preferidos. En particular, para detectar y tratar tumores, los tres tipos de epítomos glucídicos asociados a tumor que se expresan mucho en cánceres humanos comunes se conjugan a compuestos aminados. Estos incluyen particularmente la cadena de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2, ganglio cadenas asociadas a cáncer y glicosfingolípidos neutros.

Los ejemplos de las cadenas de la serie lacto de tipo 1 y tipo 2 son como sigue:

10

CADENAS DE LA SERIE LACTO DE TIPO 1 Y TIPO 2

Lewis a:

Fuc α 1

↓

4

Gal β 1-3GlcNAc β 1-

15

20

Lewis a dimérico:

Fuc α 1

Fuc α 1

↓

↓

4

4

Gal β 1-3GlcNAc β 1-Gal β 1-3GlcNAc β 1-

25

30

Lewis b:

Fuc α 1

↓

4

Gal β 1-3GlcNAc β 1-

2

↑

Fuc α 1

35

40

Lewis b/Lewis a:

Fuc α 1

Fuc α 1

↓

↓

4

4

Gal β 1-3GlcNAc β 1-Gal β 1-3GlcNAc β 1-

2

↑

Fuc α 1

45

50

55

Lewis x:

Gal β 1-4GlcNAc β 1-

3

↑

Fuc α 1

60

65

ES 2 343 788 T3

Fuc α 1

|

5 Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-

2

3

|

|

10 Fuc α 1

Fuc α 1

15 Sialosil Le^x:

NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-

3

20 |
Fuc α 1

25 Sialosil Le^a:

Fuc α 1

30 |
4

NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-

35

40 Sialosil Le^x dimérico:

NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-

3

3

45 | |
Fuc α 1 Fuc α 1

50 Tn: GalNAc α 1-

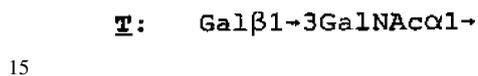
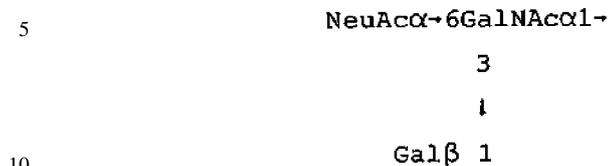
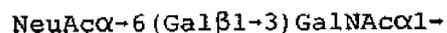
55 Sialosil-Tn: NeuAc α -6GalNAc α 1-

60 Sialosil-T:

60

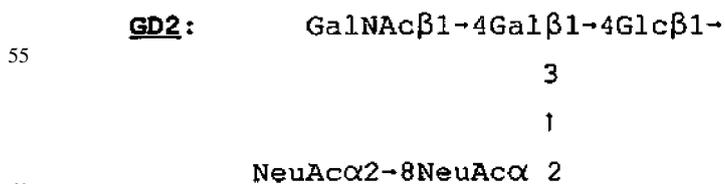
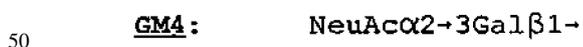
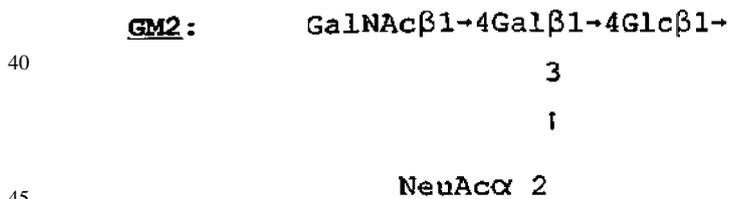
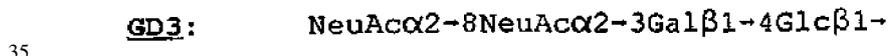
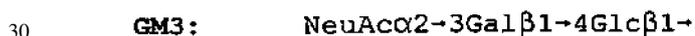
65

ES 2 343 788 T3



20 Los ejemplos de ganglio cadenas asociadas a cáncer que se pueden conjugar con compuestos aminados según la presente invención son como sigue:

25 GANGLIO CADENAS ASOCIADAS A CÁNCER



65

ES 2 343 788 T3

GM1: Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

3

5

1

NeuAc α 2

10

GD-1a: NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

3

15

1

NeuAc α 2

20

GD-1b: Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

3

25

1

NeuAc α 2 \rightarrow 8NeuAc α 2

30

Además de lo anterior, también se pueden conjugar glicoesfingolípidos neutros con compuestos aminados según la presente invención:

35

GLICOESFINGOLÍPIDOS NEUTROS SELECCIONADOS

40

Globotriosa: Gal α \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

45

Globotetraosa: GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

50

Globopentaosa: GalNAc α 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

55

Isoglobotriosa: Gal α \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

60

Isoglobotetraosa: GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

Mucotriosa: Gal β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

65

Mucotetraosa: Gal β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow

ES 2 343 788 T3

| | | |
|----|--------------------------|---|
| | Lactotriosa: | GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow |
| 5 | Lactotetraosa: | GalNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow |
| 10 | Neolactotetraosa: | Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow |
| 15 | Gangliotriosa: | GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow |
| 20 | Gangliotetraosa: | Gal β 1 \rightarrow GlcNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow |
| 25 | Galabiosa: | Gal α \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow |
| 30 | 9-O-acetil-GD3: | 9-O-Ac-NeuAc α 2 \rightarrow 8NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow |

Immunoconjugados

El inmunógeno de la presente invención puede ser un immunoconjugado en el que uno o más epítomos se unen con otros grupos químicos para crear una molécula con propiedades inmunológicas diferentes, tal como capacidad aumentada para provocar una respuesta inmune humoral. Por ejemplo, se pueden conjugar uno o más epítomos a un soporte macromolecular, tal como albúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH) o povidexano. O se pueden unir varios epítomos a un núcleo de lisina ramificado, tal como un péptido MAP-4-. O simplemente varios epítomos se pueden conjugar juntos usando algún otro enlazador o andamiaje molecular.

Adyuvantes

En general se entiende que un antígeno sintético de bajo peso molecular puede ser débilmente inmunógeno, lo que es el mayor obstáculo para el éxito de una vacuna completamente sintética. Una manera de mejorar la inmunogenicidad del tal antígeno sintético es distribuirlo en el medio de un adyuvante.

Como se sabe convencionalmente en la técnica, los adyuvantes son sustancias que actúan junto con estímulos antigénicos específicos para aumentar la respuesta específica al antígeno. Se cree que un adyuvante ideal estimula no específicamente el sistema inmune del huésped, que tras el posterior encuentro con cualquier antígeno extraño puede producir una respuesta inmune fuerte y específica a ese antígeno extraño. Tal respuesta inmune fuerte y específica, que también se caracteriza por su memoria, se puede producir sólo cuando se activan los linfocitos T (células T) del sistema inmune.

La blastogénesis de células T y la producción de IFN-gamma son dos parámetros importantes para medir la respuesta inmune. Experimentalmente, la blastogénesis de células T mide la síntesis de ADN que se relaciona directamente con la proliferación de células T, que a su vez es el resultado directo de la activación de células T. Por otra parte, IFN-gamma es una citoquina principal que secretan las células T cuando se activan. Por consiguiente, tanto la blastogénesis de células T como la producción de INF-gamma indican activación de células T, lo que sugiere la capacidad de un adyuvante en ayudar al sistema inmune del huésped para inducir una respuesta inmune fuerte y específica a cualquier antígeno basado en proteína.

El compuesto se considera un adyuvante si aumenta significativamente ($p=0,05$) el nivel de blastogénesis de células T o la producción de interferón gamma en respuesta a al menos una combinación liposoma/inmunógeno relativo al nivel provocado por el inmunógeno solo. Preferiblemente, realiza ambos. Preferiblemente, el aumento es al menos del 10%, más preferiblemente al menos del 50%, aún más preferiblemente, al menos del 100%.

Preferiblemente, la toxicidad de los compuestos lipídicos de la presente invención no es más del 50% de la del producto natural lípido A; más preferiblemente es menos del 10% de la del último.

En la técnica se conocen un gran número de adyuvantes, incluyendo adyuvante completo de Freund, saponina, DETOX (Ribi Immunochemicals), Montanide ISA-51, -50 y -70, QS-21, monofosforil lípido A y análogos de los mismos. Se puede presentar un adyuvante lipídico en el contexto de un liposoma.

Las presentes vacunas liposomales se pueden formular de forma ventajosa con un adyuvante. Por ejemplo, monofosforil lípido A (MPLA) es un adyuvante eficaz que produce presentación aumentada de antígeno liposomal a linfocitos T específicos Alving, C.R., *Immunobiol.*, 187:430-446 (1993). El experto en la materia reconocerá que los adyuvantes basados en lípidos, tales como lípido A y derivados de los mismos, también son adecuados. También se ha mostrado que un muramil dipéptido (MDP), cuando se incorpora en liposomas, aumenta la adyuvanticidad (Gupta RK *et al.*, *Adjuvants-A balance between toxicity and adjuvanticity*, *Vaccine*, 11, 293-306 (1993)).

El uso de un adyuvante no se requiere para la inmunización.

10 *Formulaciones de liposomas*

Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos. Véase, por ejemplo, Bakker-Woudenberg *et al.*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Supl.1): S61 (1993) y Kim, *Drugs*, 46: 618 (1993). Debido a que los liposomas se pueden formular con moléculas lipídicas básicas que también se encuentran en las membranas celulares naturales, en general los liposomas se pueden administrar de forma segura y son biodegradables.

Los liposomas son partículas globulares formadas por el autoensamblaje físico de lípidos polares, que definen la organización de membranas en liposomas. Los liposomas se pueden formar como vesículas unilamelares o multilamelares de varios tamaños. Tales liposomas, aunque constituidos de moléculas pequeñas que no tienen propiedades inmunogénicas por sí mismas, se comportan como partículas macromoleculares y muestran características inmunogénicas fuertes.

Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares y pueden variar en tamaño con diámetros que varían desde alrededor de 0,02 microm a mayores de alrededor de 10 microm. Se pueden encapsular una variedad de agentes en liposomas. Los agentes hidrofóbicos se reparten en las bicapas y los agentes hidrofílicos se reparten dentro del/de los espacio(s) acuoso(s) interno(s). Véase, por ejemplo, Machy *et al.*, *Liposomes in Cell Biology and Pharmacology* (John Libbey, 1987) y Ostro *et al.*, *American J. Hosp. Pharm.* 46: 1576 (1989).

Los liposomas se pueden adsorber a virtualmente cualquier tipo de célula y después liberar un agente incorporado. De forma alternativa, el liposoma se puede fusionar con la célula diana, por lo cual el contenido del liposoma se vacía en la célula diana. De forma alternativa, el liposoma puede ser endocitado por células que son fagocíticas. A la endocitosis le sigue la degradación intralosomal de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados. Scherphof *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 446: 368 (1985).

Otros liposomas adecuados que se usan en los métodos de la invención incluyen vesículas multilamelares (MLV), vesículas oligolamelares (OLV), vesículas unilamelares (UV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), vesículas unilamelares de tamaño medio (MUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), vesículas multivesiculares (MVV), vesículas uni u oligolamelares hechas mediante el método de la evaporación en fase inversa (REV), vesículas multilamelares hechas por el método de la evaporación de fase inversa (MLV-REV), vesículas plurilamelares estables (SPLV), MLV congeladas y descongeladas (FATMLV), vesículas preparadas por métodos de extrusión (VET), vesículas preparadas mediante prensa francesa (FPV), vesículas preparadas mediante fusión (FUV), vesículas de deshidratación-rehidratación (DRV) y burbujosomas (BSV). El experto en la materia reconocerá que los métodos para preparar estos liposomas se conocen bien en la técnica. Véase, *Colloidal Drug Delivery Systems*, vol. 66 (J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., 1994).

Una "formulación liposomal" es una vesícula lipídica creada *in vitro* en la que se puede incorporar un agente farmacéutico, tal como un antígeno de la presente invención, o a la que se puede unir uno. De esta manera, "liposomalmente unido" se refiere a un agente que se incorpora parcialmente en o se une a un liposoma. El inmunógeno de la presente invención puede ser un antígeno liposomalmente unido que no sería un inmunógeno, sino por dicho liposoma, o puede ser inmunogénico incluso en un estado sin liposoma. Se pueden incorporar varios agentes diferentes en o unir al mismo liposoma, o se pueden asociar diferentes agentes con diferentes liposomas y administrar los liposomas por separado o juntos a un sujeto.

Una molécula que contienen lípidos se puede incorporar a un liposoma porque la parte lipídica se integrará espontáneamente en la bicapa lipídica. De esta manera, un agente que contiene lípidos se puede presentar en la "superficie" de un liposoma. De forma alternativa, se puede encapsular un agente dentro de un liposoma.

La formación de un liposoma requiere uno o más lípidos. Se puede usar cualquier lípido que, solo o en combinación, pueda formar una estructura de bicapa de liposoma. Normalmente, estos lípidos incluirán al menos un fosfolípido. Los fosfolípidos pueden ser fosfolípidos de fuentes naturales, fosfolípidos naturales modificados, fosfolípidos semisintéticos, fosfolípidos totalmente sintéticos o fosfolípidos (necesariamente sintéticos) con grupos de cabeza no naturales. Los fosfolípidos de mayor interés son fosfatidilclinas, fosfatidil fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilgliceroles, ácidos fosfatídicos y fosfatidilinositoles.

El liposoma puede incluir lípidos neutros, cargados positivamente y/o cargados negativamente. La fosfatidilcolina es un fosfolípido neutro. El fosfatidilglicerol es un glicolípido cargado negativamente. El cloruro de N-[1-(2,3-

ES 2 343 788 T3

dioléilox)propil]-N,N,N-trimetilamonio es un lípido sintético cargado positivamente. Otro es 3-beta-[N-(N',N'')-dimetilaminoetano)-carbamoil]-colesterol.

5 Normalmente, los lípidos comprenderán uno o más grupos de ácido grasos. Estos pueden ser saturados o insaturados y variar en número de carbonos, normalmente de 12-24 carbonos. Los fosfolípidos de interés particular son aquellos con los siguientes ácidos grasos: C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 (alfa y gamma), C20:0, C20:1, C20:3, C20:4, C20:5, C22:0, C22:5, C22:6 y C24:0, donde el primer número se refiere a número total de carbonos en la cadena de ácido graso y el segundo al número de dobles enlaces. Los ácidos grasos de fuentes de mamífero o vegetales tienen todos números pares de átomos de carbono y sus insaturaciones están espaciadas a intervalos de 3
10 carbonos, cada uno con un grupo metileno intermedio.

El colesterol reduce la permeabilidad de bicapas “de estado líquido-cristalino”.

15 Un liposoma puede incluir lípidos con una afinidad especial para células diana particulares. Por ejemplo, la lactosilceramida tiene una afinidad específica para hepatocitos (y tal vez también para células cancerosas hepáticas).

En una formulación de liposoma preferida, los lípidos componentes incluyen fosfatidilcolina. Más preferiblemente también incluyen colesterol y aún más preferiblemente, también fosfatidilglicerol. Aprovechando las propiedades de autoensamblaje de los lípidos, se pueden unir uno o más inmunógenos a los lípidos polares que a su vez se convierten en parte de la partícula de liposoma. Cada inmunógeno comprende uno o más determinantes antigénicos (epítomos).
20 Estos epítomos pueden ser epítomos de células B (reconocidos por anticuerpos) o epítomos de células T (reconocidos por células T). El liposoma puede actuar como adyuvante de la respuesta inmune provocada por los inmunógenos asociados. Es probable que sea más eficaz que un adyuvante que se mezcla simplemente con un inmunógeno, ya que tendrá mayor concentración eficaz local.

25 Además, se puede unir un hapteno en lugar del inmunógeno mencionado anteriormente. Como un inmunógeno, un hapteno comprende un determinante antigénico, pero por definición es demasiado pequeño para provocar una respuesta inmune por sí mismo (típicamente, los haptenos son menores de 5.000 dalton). En este caso, el grupo lipídico puede actuar no sólo como adyuvante, sino también como un soporte inmunogénico, el conjugado del hapteno y el lípido
30 actúa como un inmunógeno sintético (es decir, una sustancia contra la que se puede inducir una respuesta inmune humoral y/o celular).

Incluso si el lípido no actúa como soporte inmunogénico, el hapteno incluido en el liposoma puede aún actuar como un antígeno sintético (es decir, una sustancia que es reconocida por un componente del sistema inmune humoral o celular, tal como un anticuerpo o células T). El término “antígeno” incluye tanto haptenos como inmunógenos.
35

De esta manera, en algunas formas de realización, la invención contempla un liposoma cuya membrana comprende un análogo de lípido A como se divulga aquí y al menos un epítomo de células B o células T. El epítomo puede estar acompañado de un lipopéptido, glicolípido o glicolipopéptido.
40

La lipidación de un inmunógeno normalmente facilitará la incorporación del inmunógeno a un liposoma, que a su vez puede mejorar la presentación inmune del inmunógeno. Para la incorporación más eficaz, preferiblemente al menos un grupo fuertemente lipofílico del inmunógeno debe ser similar en tamaño a al menos a uno de los componentes lipídicos del liposoma. Por ejemplo, el tamaño debe estar en el intervalo del 50%-200% del tamaño del componente
45 lipídico de referencia del liposoma. El tamaño se puede medir contando el número de átomos no hidrógeno de cada uno, calculando el peso molecular de cada uno o calculando (con la ayuda de modelos moleculares en 3D) el volumen molecular o la dimensión mayor de cada uno.

Preferiblemente, el inmunógeno lipidado comprende un grupo lipofílico que ayuda a la respuesta inmune humoral o celular al inmunógeno.
50

De forma diferente a las preparaciones bacterianas de adyuvante, un análogo sintético de lípido A contribuye a un lípido estructuralmente bien definido para la membrana del liposoma. Tales estructuras definidas no solo reducen la carga de reafirmar los componentes “activos” de membrana después de la formulación, sino que también contribuye
55 a la definición de la membrana del liposoma. Tales liposomas se pueden designar como “formulaciones de vacunas totalmente sintéticas” que contienen un análogo sintético de lípido A como adyuvante y un antígeno que contiene un lípido sintético.

60 *Caracterización de la respuesta inmune*

La respuesta inmune mediada por células se puede ensayar *in vitro* o *in vivo*. El ensayo convencional *in vitro* es un ensayo de proliferación de células T. Se toma una muestra de sangre de un individuo que padece la enfermedad de interés, asociado con esa enfermedad o de un individuo vacunado. Las células T de este individuo deben por tanto estar cebadas para responder a una nueva exposición a ese antígeno mediante proliferación. La proliferación requiere
65 timidina debido a su papel en la replicación de ADN.

En términos generales, la proliferación de células T es mucho más extensa que la proliferación de células B y debe ser posible detectar una respuesta fuerte de células T incluso en una población de células no separada. Sin embargo,

es deseable la purificación de células T para que sea más fácil detectar una respuesta de células T. Se puede emplear cualquier método de purificar células T que sustancialmente no afecte negativamente a su proliferación específica de antígeno. En el procedimiento preferido, primero se obtendrían poblaciones completas de linfocitos mediante recogida (de sangre, el bazo o los ganglios linfáticos) en gradiente isopícnico a una densidad específica de 1,07, es decir, separaciones en gradientes de Ficoll-Hypaque o Percoll. Esta población mixta de células se podría purificar más a una población de células T a través de varios medios. La separación más sencilla se basa en la unión de poblaciones de células B y monocitos/macrófagos a una columna de lana de nailon. La población de células T pasa a través de la lana de nailon y se puede obtener una población de células T pura en >90% en un único paso. Otros métodos implican el uso de anticuerpos específicos para antígenos de células B y/o de monocitos en presencia de proteínas del complemento para lisar las poblaciones que no son de células T (selección negativa). Aún otro método es una técnica de selección positiva en la que se une un anticuerpo anti-célula T (CD3) a una matriz de fase sólida (tal como bolas magnéticas) uniendo de esta manera las células T y dejando que se separen (por ejemplo, magnéticamente) de la población que no es de células T. Estas se pueden recuperar de la matriz mediante separación mecánica o química.

Una vez obtenida una población de células T purificada se cultiva en presencia de células presentadoras de antígeno irradiadas (macrófagos esplénicos, células B, células dendríticas todas presentes). (Estas células se irradian para prevenir que respondan e incorporen timidina tritiada). Las células T viables (100.000-400.000 por pocillo en 100 μ l de medio suplementado con IL2 a 20 unidades) se incuban después con los péptidos de prueba u otros antígenos durante un periodo de 3 a 7 días con los antígenos de prueba a concentraciones desde 1 a 100 μ g/ml.

Al final del periodo de estimulación del antígeno se puede medir una respuesta de varias maneras. Primero se pueden recoger los sobrenadantes sin células y probar la presencia de citoquinas específicas. La presencia de α -interferón, IL2 o IL12 es indicativa de una respuesta de población Th cooperadora de tipo 1. La presencia de IL4, IL6 e IL10 juntas son indicativas de una respuesta inmune T cooperadora de tipo 2. Así este método permite la identificación del subconjunto de células T cooperadoras.

Un segundo método denominado blastogénesis implica añadir timidina tritiada al cultivo (por ejemplo, 1 μ curio por pocillo) al final del periodo de estimulación del antígeno y dejar que las células incorporen el metabolito radio-marcado durante 4-16 horas antes de recoger en un filtro para contaje de centelleo. El nivel de la timidina radioactiva incorporado es una medida de las actividades de replicación de las células T. Se usan antígenos negativos o pocillos control sin antígeno para calcular la respuesta blastogénica en términos de un índice de estimulación. Este es CPM de prueba/CPM del control. Preferiblemente el índice de estimulación alcanzado es al menos 2, más preferiblemente al menos 3, aún más preferiblemente 5, lo más preferiblemente al menos 10.

También se puede ensayar CMI *in vivo* en un animal experimental estándar, por ejemplo, un ratón. El ratón se inmuniza con un antígeno cebador. Después de esperar a que las células T respondan, los ratones se provocan mediante inyección en la almohadilla plantar del antígeno de prueba. La respuesta DTH (la hinchazón de ratones de prueba se compara con la de ratones controles inyectados con, por ejemplo, solución salina.

Preferiblemente, la respuesta es al menos 0,10 mm, más preferiblemente al menos 0,15 mm, aún más preferiblemente al menos 0,20 mm, lo más preferiblemente al menos 0,30 mm.

La respuesta inmune humoral, *in vivo*, se mide sacando sangre de los ratones inmunizados y ensayando la presencia en la sangre de anticuerpos que se unan al antígeno de interés. Por ejemplo, los antígenos de prueba se pueden inmovilizar e incubar con las muestras, capturando así los anticuerpos afines y los anticuerpos capturados se miden después incubando la fase sólida con anticuerpos anti-isotípicos marcados.

Preferiblemente, la respuesta inmune humoral, si se desea, es al menos tan fuerte como la representada por un título de anticuerpo de al menos 1/100, más preferiblemente al menos 1/1000, aún más preferiblemente al menos 1/10.000.

50 *Análogos de lípido A como agentes inmunoestimulantes*

Se pueden usar análogos de lípido A que tienen actividades agonísticas de LPS/lípido A como agentes inmunes estimuladores. Son potencialmente útiles como agentes inmunoterapéuticos para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, por ejemplo, infecciones y cánceres. Como se demuestra aquí, estos análogos de lípido A son potentes adyuvantes de vacunas. Un adyuvante inmunoestimulador estimula la producción de citoquinas requeridas para la respuesta de anticuerpos específica de antígeno y respuestas inmunes mediadas por células incluyendo linfocitos citotóxicos, en el huésped inmunizado.

Se pueden formular los compuestos de la presente invención con un soporte farmacéuticamente aceptable para inyección o ingestión. El soporte farmacéuticamente aceptable es un medio que no interfiere con la actividad inmunomoduladora del principio activo y no es tóxico para el huésped al que se administra. Los soportes farmacéuticamente aceptables incluyen sin limitación, emulsiones de aceite en agua o agua en aceite, composiciones acuosas, liposomas, microbolas y microsomas. Como adyuvantes de vacuna, se pueden formular junto con antígenos para proporcionar respuestas inmunes más fuertes y mejorar la eficacia de la vacuna. Típicamente, se formula un antígeno en combinación o por separado con compuestos adyuvantes inmunoestimuladores tal como los descritos en la presente invención, para proporcionar la composición farmacéutica. En otras formulaciones, se puede unir covalentemente un antígeno a un grupo amino, carboxilo, hidroxilo y/o fosfato de los compuestos adyuvantes de la presente invención.

Los antígenos pueden derivar de organismos patógenos y no patógenos, virus y hongos, o puede ser el organismo entero. Más específicamente, el agente antigénico se puede seleccionar del grupo que consiste en: (1) virus, bacterias, micoplasmas, hongos y protozoos vivos, matados por calor o químicamente atenuados; (2) fragmentos, extractos, subunidades, metabolitos y construcciones recombinantes de (1); (3) fragmentos, subunidades, metabolitos y construcciones recombinantes de proteínas y glicoproteínas de mamíferos; (4) antígenos asociados a tumor y específicos de tumor; y (5) ácidos nucleicos.

Por tanto, la composición terapéutica puede utilizar cualquier antígeno o componente de vacuna adecuado en combinación con un compuesto inmunoestimulante de la presente invención como adyuvante. Tales composiciones terapéuticas pueden comprender adecuadamente proteínas, péptidos, glicopéptidos y glicolípidos que son farmacéuticamente activos para enfermedades y afecciones tales como cánceres, malaria, viruela, carbunco y SARS (síndrome respiratorio agudo repentino).

Las vías de administración pueden comprender el uso de cualquier medio y/o método adecuado para distribuir el adyuvante inmunoestimulador, vacuna que contiene adyuvante o adyuvante y/o antígeno al huésped. Las vías de administración pueden incluir, pero no limitadas a, métodos de administración parenteral, tal como inyección subcutánea (SC), administración transcutánea, intranasal (IN), oftálmica, transdérmica, intramuscular (IM), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP), intravaginal, pulmonar y rectal, así como administración no parenteral, por ejemplo oral.

Los agentes inmunoestimuladores de la presente invención se pueden administrar útilmente al huésped con otros agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades dirigidas en terapia combinada para alcanzar mejor eficacia. Por ejemplo, se pueden usar en combinación con antibióticos, agentes antivíricos y agentes antiinflamatorios para proporcionar mejor tratamiento para infecciones y enfermedades autoinmunes. La formulación que comprende los compuestos inmunoestimuladores de la presente invención puede incluir componentes adicionales tales como solución salina, aceite, escualeno y otros compuestos inmunoestimuladores tales como análogos de muramyl péptidos, ADN bacteriano, análogos de oligonucleótidos CpG, QS-21 (un adyuvante inmunoestimulador derivado de planta) y análogos de lípido A no de la divulgación de la presente invención.

Análogos de lípido A como antagonistas de endotoxina bacteriana

Los análogos de lípido A con actividad antagonística de LPS/lípido A se pueden usar para el control de los trastornos patofisiológicos mediados por LPS. Tras la infección de bacterias Gram negativas en seres humanos, la endotoxina bacteriana, lipopolisacárido (LPS), se libera en las corrientes sanguíneas. Las respuestas inflamatorias agudas a LPS o su principio activo lípido A producen la liberación de citoquinas y otros mediadores celulares, incluyendo el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interlequina-1 (IL-1), IL-6 y leucotrienos de monocitos y macrófagos. A niveles extremos, se sabe que estas citoquinas y mediadores celulares desencadenan muchos sucesos patofisiológicos incluyendo fiebre, choque, hipotensión e insuficiencia de órganos (R. C. Bone, *Clin. Microbiol. Rev.* 1993, 6, 57). Estos sucesos en general se denominan síndrome séptico. La septicemia es mortal y mata decenas de miles de personas cada año solo en EE. UU.

Una estrategia para controlar los trastornos mediados por LPS es prevenir la unión de LPS/lípido A a los receptores con competidores inactivos (antagonistas) de LPS/lípido A. Se espera que los análogos de lípido A divulgados aquí, debido a su similitud estructural a las moléculas de lípido A natural, se unan al receptor de unión de LPS, receptor de tipo Toll 4 (TLR4), pero sin desencadenar la liberación incontrolada de citoquinas inflamatorias por el sistema inmune. Como los antagonistas de LPS/lípido A, tales análogos de lípido A pueden inhibir la producción de citoquinas inducida por LPS y conferir así beneficios en controlar trastornos patofisiológicos mediados por LPS.

Como antagonistas de LPS para neutralizar la toxicidad de endotoxina bacteriana, se espera que tales composiciones de lípido A muestren mayores beneficios terapéuticos cuando se administran en fases tempranas de infecciones bacterianas. Además, tales análogos de lípido A se podrían administrar junto con antibióticos comunes para aligerar la carga del huésped producida por las infecciones. Brevemente, los análogos de lípido A descritos aquí como antagonistas de LPS son agentes terapéuticos útiles para el tratamiento o prevención de trastornos mediados por LPS resultantes de infecciones bacterianas de Gram negativas. Tales trastornos incluyen, sin limitación, fiebre, inflamación generalizada, coagulación intravascular diseminada, hipotensión, insuficiencias renales agudas, síndrome de dificultad respiratoria aguda, destrucción hepatocelular e insuficiencia cardíaca.

Otra forma de realización de la aplicación de los análogos de lípido A divulgados aquí es suprimir la producción de virus mediada por LPS. LPS estimula potentemente la producción de virus que residen en monocitos o macrófagos (Ponerantz *et al. J. Exp. Med.* 1990, 127, 253). En el caso del VIH-1, la producción vírica aumentada probablemente proviene de la activación de células tanto por una activación directa por LPS como por un aumento en los niveles de TNF- α mediado por LPS. La activación celular fomenta la unión aumentada de factores que actúan en trans al sitio de unión de NF- κ B en VIH-1, que a su vez produce una transcripción y replicación víricas aumentadas (Duh *et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 85, 5974). De esta manera, como antagonistas de LPS, los análogos de lípido A divulgados aquí pueden inhibir un aumento en la replicación de VIH-1 mediado por LPS. De forma similar, estos análogos de lípido A se pueden usar para suprimir la activación de cualquier virus cuya replicación está controlada directa o indirectamente por una región reguladora de NF- κ B. Tales virus incluyen, sin limitación, citomegalovirus o virus del herpes. Además, se ha implicado a LPS en la activación del virus de la gripe (Nain *et al., J. Immunol.* 1990, 145, 1921) y se ha sugerido que una liberación aumentada de TNF- α está relacionada con las complicaciones observadas

de infecciones de gripe y bacterianas combinadas. Por tanto los análogos de lípido A con actividades antagonísticas de LPS divulgados aquí se pueden usar para suprimir también la activación del virus de la gripe. Brevemente, las composiciones de la presente invención pueden proporcionar agentes terapéuticos útiles para el tratamiento o prevención de empeoramiento de infecciones víricas latentes o activas mediado por LPS, por ejemplo, infección con VIH-1, citomegalovirus, virus del herpes simple y virus de la gripe.

Sujetos, preparaciones y métodos farmacéuticos

Los solicitantes se refieren aquí a la discusión en las pp. 36-42 de WO98/33810.

Sujetos

Los receptores de las vacunas de la presente invención pueden ser cualquier animal vertebrado que pueda adquirir inmunidad específica a través de una respuesta inmune humoral o celular.

Entre los mamíferos, los receptores preferidos son mamíferos de los ordenes Primates (incluyendo seres humanos, simios antropomorfos y monos), Artiodactyla (incluyendo caballos, cabras, vacas, ovejas y cerdos), Rodentia (incluyendo ratones, ratas, conejos y hámsteres) y Carnivora (incluyendo gatos y perros). Entre las aves, los receptores preferidos son pavos, pollos y otros miembros del mismo orden. Los receptores más preferidos son los seres humanos.

El sujeto animal preferido de la presente invención es un mamífero primate. Mediante el término “mamífero” se quiere decir un individuo que pertenece a la clase Mammalia que, por supuesto, incluye a los seres humanos. La invención es particularmente útil en el tratamiento de sujetos humanos, aunque se pretende también para usos veterinarios. Mediante el término “primate no humano” se quiere decir cualquier miembro del suborden Anthrooidea excepto para la familia Hominidae. Tales primates no humanos incluyen la superfamilia Ceboidea, familia Cebidae (los monos del nuevo mundo incluyendo capuchinos, monos aulladores, monos araña y monos ardilla) y la familia Callithricidae (incluyendo los titíes); la superfamilia Cercopithecoidea, familia Caercopithecidae (incluyendo los macacos, mandriles, babuinos, monos narigudos, cercopitecos mona y los monos hanumán sagrados de la India) y la superfamilia Hominoidea, familia Pongidae (incluyendo gibones, orangutanes, gorilas y chimpancés). El mono Rhesus es un miembro de los macacos.

Composiciones farmacéuticas

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención comprenden al menos un inmunógeno en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmune protectora. La respuesta puede ser humoral, celular o una combinación de las mismas. La composición puede comprender una pluralidad de inmunógenos.

Al menos un inmunógeno será un glicopéptido que es inmunogénico por sí o un glicopéptido que es inmunogénico como resultado de su incorporación a un liposoma.

La composición preferiblemente comprende además un liposoma. Los liposomas preferidos incluyen los identificados en Jiang, *et al.*, WO/2001/036433, presentada el 15 de noviembre, 2000 (nuestro expediente JIANG3A-PCT) y Longenecker, *et al.*, 08/229.606, presentada el 12 de abril 12, 1994 (nuestro expediente LONGENECKER5-USA y WO/1995/027505, presentada el 12 de abril, 1995 (nuestro expediente LONGENECKER5-PCT).

La composición puede comprender células presentadoras de antígeno y en este caso el inmunógeno se puede pulsar en las células, antes de la administración, para una presentación más eficaz.

La composición puede contener agentes auxiliares o excipientes que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Berkow *et al.*, eds., *The Merck Manual*, 15ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1987; Goodman *et al.*, eds., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Pharmacology and Therapeutics*, 3ª edición, ADIS Press, LTD., Williams y Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Katzung, ed. *Basic and Clinical Pharmacology*, quinta edición, Appleton y Lange, Norwalk, Conn. (1992).

Una composición puede comprender además un adyuvante para potenciar no específicamente la respuesta inmune. Algunos adyuvantes potencian tanto la respuesta inmune humoral como la celular y otros son específicos para una o la otra. Algunos potenciarán una e inhibirán la otra. La elección de adyuvante por lo tanto depende de la respuesta inmune deseada.

Una composición puede incluir inmunomoduladores, tales como citoquinas que favorecen o inhiben una respuesta inmune humoral o celular, o anticuerpos inhibidores contra tales citoquinas.

Una composición farmacéutica según la presente invención puede comprender además al menos un compuesto quimioterapéutico contra el cáncer, tal como el seleccionado del grupo que consiste en un anti-metabolito, un antibiótico péptido bleomicina, un alcaloide podofilina, un alcaloide vinca y un agente alquilante, un antibiótico, cisplatino o una nitrosourea. Una composición farmacéutica según la presente invención puede comprender además o adicionalmente al menos un compuesto quimioterapéutico vírico seleccionado de gamma globulina, amantadina, guanidina, hidroxiben-

cimidazol, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , tiosemicarbonas, metisazona, rifampina, ribvirina, un análogo de pirimidina, un análogo de purina, foscarnet, ácido fosfonoacético, aciclovir, didesoxinucleótidos o ganciclovir. Véase, por ejemplo, Katzung, *supra*, y las referencias citadas allí en las páginas 798-800 y 680-681, respectivamente.

5 Los agentes antiparasíticos incluyen agentes adecuados para su uso contra artrópodos, helmintos (gusanos redondos, lombrices intestinales, ascáride, anquilostoma, gusanos acintados, tricocéfalos y Schistosoma) y protozoos (incluyendo amebas y organismos de malaria, toxoplasmoide y tricomonades). Los ejemplos incluyen tiabenzol, varias piretrinas, praziquantel, niclosamida, mebendazol, cloroquina HCl, metronidazol, yodoquinol, pirimetamina, mefloquina HCl e hidroxicloroquina HCl.

10

Fines farmacéuticos

Un fin de la invención es proteger sujetos contra una enfermedad. El término “protección”, como en “protección de una infección o enfermedad”, como se usa aquí, abarca “prevención”, “supresión” o “tratamiento”. “Prevención”
15 implica la administración de una composición farmacéutica *antes de la inducción* de la enfermedad. “Supresión” implica la administración de la composición *antes de la aparición clínica* de la enfermedad. “Tratamiento” implica la administración de la composición protectora *después de la aparición* de la enfermedad. El tratamiento puede ser de mejora o curativo.

20 Se entenderá que en medicina humana y veterinaria, no es posible siempre distinguir entre “prevenir” y “suprimir” ya que el hecho o hechos inductor final puede ser desconocido, latente o el paciente no lo descubre hasta bastante después de la aparición del suceso o sucesos. Por lo tanto, es común usar el término “profilaxis” como distinto de “tratamiento” para abarcar tanto “prevenir” como “suprimir” como se define aquí. El término “protección”, como se usa aquí, se pretende que incluya “profilaxis”. Véase, por ejemplo, Berker, *supra*, Goodman, *supra*, Avery, *supra* y
25 Katzung, *supra*.

La “protección” proporcionada no necesita ser absoluta, es decir, no es necesario prevenir o erradicar totalmente la enfermedad, siempre que haya una mejora estadísticamente significativa ($p=0,05$) relativa a una población control. La protección puede estar limitada a aliviar la gravedad o rapidez del inicio de los síntomas de la enfermedad. Un agente
30 que proporcione protección a un grado menor que los agentes competitivos aún puede tener valor si los otros agentes son ineficaces para un individuo particular, si se puede usar en combinación con otros agentes para mejorar el nivel de protección o si es más seguro que los agentes competitivos.

Se puede determinar la eficacia de un tratamiento comparando la duración, gravedad, etc., de la enfermedad después del tratamiento con la de un grupo control sin tratar, preferiblemente ajustado en términos de estado de la enfermedad.
35

La eficacia de una profilaxis normalmente se evaluará comparando la incidencia de la enfermedad en el grupo de tratamiento con la incidencia de la enfermedad en un grupo control, donde se considera que los grupos de tratamiento y control tienen el mismo riesgo, o donde se ha hecho una corrección para las diferencias de riesgo esperadas.
40

En general, la profilaxis se dará a aquellos considerados con mayor riesgo para la enfermedad en virtud de los antecedentes familiares, antecedentes personales o exposición elevada al agente causante.

Administración farmacéutica

Se puede administrar al menos un agente protector de la presente invención por cualquier medio para alcanzar el fin deseado, usando una composición farmacéutica como se ha descrito previamente.

50 La administración puede ser oral o parenteral y, si es parenteral, local o sistémica. Por ejemplo, la administración de tal composición puede ser por varias vías parenterales tal como vías subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica o bucal. La administración parenteral puede ser mediante inyección rápida o mediante perfusión gradual durante el tiempo. Un modo preferido de usar una composición farmacéutica de la presente invención es mediante aplicación subcutánea, intramuscular o intravenosa. Véase, por ejemplo, Berker,
55 *supra*, Goodman, *supra*, Avery, *supra* y Katzung, *supra*.

Una pauta típica para prevenir, suprimir o tratar una enfermedad o afección que se puede aliviar mediante una respuesta inmune por inmunoterapia activa específica, comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica como se describe anteriormente, administrada como un tratamiento único o repetido como
60 dosis potenciadoras o de recuerdo, durante un periodo de hasta e incluyendo entre una semana y alrededor de 24 meses.

Se entenderá que la dosis eficaz dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si hay alguno, frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. No se pretende que los intervalos de dosis eficaces proporcionados posteriormente limiten la invención y representan intervalos preferidos de dosis. Sin embargo, la dosis más preferida se ajustará al sujeto individual, como entiende y determina el experto en la materia, sin experimentación excesiva. Esto típicamente implicará el ajuste de una dosis estándar, por ejemplo, reducción de la dosis si el paciente pesa poco. Véase, por ejemplo, Berkow *et al.*, eds., *The Merck Manual*, 15ª edición, Merck and

Co., Rahway, N.J., 1987.; Goodman *et al.*, eds., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Pharmacology and Therapeutics*, 3ª edición, ADIS Press, LTD., Williams y Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, *Pharmacology*, Little, Brown and Co., Boston, (1985); Chabner *et al.*, *supra*; De Vita *et al.*, *supra*; Salmon, *supra*;
 5 Schroeder *et al.*, *supra*; Sartorelli *et al.*, *supra*; y Katsung, *supra*.

Antes del uso en seres humanos, primero se evaluará la seguridad y eficacia de un fármaco en animales de laboratorio. En estudios clínicos en seres humanos, se empezaría con una dosis que se espera sea segura en seres humanos, basado en los datos preclínicos para el fármaco en cuestión y en dosis acostumbradas para fármacos análogos (si hay
 10 alguno). Si esta dosis es eficaz, se puede disminuir la dosis, para determinar la dosis eficaz mínima, si se desea. Si esta dosis es ineficaz, se aumentará con cuidado, controlando a los pacientes para signos de efectos secundarios. Véase, por ejemplo, Berkow *et al.*, eds., *The Merck Manual*, 15ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1987.; Goodman *et al.*, eds., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Pharmacology and Therapeutics*, 3ª edición,
 15 ADIS Press, LTD., Williams y Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, *Pharmacology*, Little, Brown and Co., Boston, (1985).

La dosis total requerida para cada tratamiento se puede administrar en dosis múltiples (que pueden ser iguales o diferentes) o en una dosis única, según un programa de inmunización, que puede estar predeterminado o ad hoc.
 20 El programa se selecciona de modo que sea inmunológicamente eficaz, es decir, de modo que sea suficiente para provocar una respuesta inmune eficaz al antígeno y por tanto, posiblemente junto con otros agentes, proporcionar protección. Las dosis adecuadas para lograr esto se definen como "dosis terapéuticamente eficaces". (Nótese que un programa puede ser inmunológicamente eficaz incluso aunque una dosis individual, si se administra por sí misma, no fuera eficaz y el significado de "dosis terapéuticamente eficaz" se interpreta mejor en el contexto del programa de
 25 inmunización). Las cantidades eficaces para este uso dependerán, por ejemplo, de la composición peptídica, el modo de administración, el estado y gravedad de la enfermedad que se trata, el peso y estado general de salud del paciente y el juicio del médico.

Típicamente, la dosis diaria de un principio activo de un fármaco, para un ser humano adulto de 70 kg, está en el
 30 intervalo de 10 nanogramos a 10 gramos. Para inmunógenos, una dosis diaria más típica para tal paciente está en el intervalo de 10 nanogramos a 10 miligramos, más probablemente de 1 microgramo a 10 miligramos. Sin embargo, la invención no está limitada a estos intervalos de dosis.

Se debe tener presente que las composiciones de la presente invención en general se pueden emplear en estados
 35 serios de enfermedad, es decir, en situaciones de riesgo para la vida o potencialmente de riesgo para la vida. En tales casos, en vista de la minimización de sustancias extrañas y la naturaleza relativamente no tóxica de los péptidos, es posible y el médico puede sentir que es deseable administrar un exceso sustancial de estas composiciones peptídicas.

Las dosis se pueden dar a cualquier intervalo que sea eficaz. Si el intervalo es demasiado corto, se puede producir
 40 inmunoparálisis u otros efectos secundarios. Si el intervalo es demasiado largo, la inmunidad puede sufrir. El intervalo óptimo puede ser más largo si las dosis individuales son mayores. Los intervalos típicos son 1 semana, 2 semanas, 4 semanas (o un mes), 6 semanas, 8 semanas (o dos meses) y un año. La conveniencia de administrar dosis adicionales y de aumentar o disminuir el intervalo, se puede reevaluar de forma continua, en vista de la inmunocompetencia del paciente (por ejemplo, el nivel de anticuerpos a los antígenos relevantes).

Están disponibles varios métodos para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980), Patentes de EE. UU. Nos. 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

La forma farmacéutica apropiada dependerá de la enfermedad, el inmunógeno y la vía de administración; las
 50 posibilidades incluyen comprimidos, cápsulas, pastillas, pastas dentales, supositorios, inhalantes, soluciones, pomadas y depósitos parenterales. Véase, por ejemplo, Berker, *supra*, Goodman, *supra*, Avery, *supra* y Ebadi, *supra*.

El antígeno se puede distribuir de una manera que aumente, por ejemplo, distribuyendo el materialmente antigé-
 55 nico en el compartimento intracelular de modo que se produzca la "vía endógena" de presentación del antígeno. Por ejemplo, el antígeno se puede atrapar en un liposoma (que se fusiona con la célula) o incorporar en la proteína de la cubierta de un vector vírico (que infecta la célula).

Otro planteamiento, aplicable cuando el antígeno es un péptido, es inyectar ADN desnudo que codifica el antígeno
 60 en el huésped, por vía intramuscular. El ADN se internaliza y expresa.

También es posible cebar PBL autólogos con las composiciones de la presente invención, confirmar que los PBL
 han manifestado la respuesta deseada y después administrar los PBL o un subconjunto de los mismos al sujeto.

65 Ejemplos

General: Los puntos de fusión no se corrigieron. Todas las reacciones sensibles al aire y la humedad se realizaron en atmósfera de nitrógeno. Se adquirieron THF, DMF y diclorometano anhídridos de Aldrich y otros solventes secos se

ES 2 343 788 T3

prepararon de la manera normal. Los solventes de grado ACS se adquirieron de Fisher y se usaron para cromatografía sin destilación. Las placas de TLC (gel de sílice 60 F₂₅₄, espesor 0,25 mm, Merck) y gel de sílice flash 60 (35-75 mm) para cromatografía en columna se compraron de Rose Scientific, Canadá. Los espectros de ¹H y ³²P se registraron en espectrofotómetros Bruker AM 300 MHz o Varian Unity 500 MHz o Bruker DRX 600 MHz con TMS como estándar interno para cambios químicos de protón. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin Elmer 241 a temperatura ambiente (20-22°C). Los datos del análisis de elementos se obtuvieron del laboratorio microanalítico en la Universidad de Alberta. Los análisis de espectrometría de masas por electroespray se realizaron en espectrómetros de masa MS50B o MSD1 SPC.

10 Ejemplo 1

Preparación del compuesto 8

Se disolvieron el compuesto 6 (312 mg, 0,65 mmol), 7 (200 mg, 0,44 mmol), DCC (136 mg, 0,66 mmol) y DMAP (27 mg, 0,22 mmol) en diclorometano seco (5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El sólido se filtró y se lavó con acetato de etilo (5 ml). El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía flash (hexano: acetato de etilo, 8:1) para dar 8 (398 mg, 98%). TLC: R_f=0,69 (hexano: acetato de etilo, 3:1). [α]_D²²=+32,0 (c 0,5, cloroformo). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,25 (m, 38 H, 19 CH₂), 1,52 (m, 4 H, 2 CH₂), 2,16 (t, J=7,5 Hz, 2 H, CH₂), 2,50 (dd, J=16,0, 6,0 Hz, 1 H, CHH), 2,63 (dd, J=16,0, 6,0 Hz, 1 H, CHH), 3,71 (dd, J=9,5, 9,5 Hz, 1 H, H-4), 3,78 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-6a), 3,94 (m, 1 H, H-5), 3,98-4,08 (m, 2 H, H-2, CHHCH=CH₂), 4,21 (m, 1 H, CHHCH=CH₂), 4,29 (dd, J=10,0, 5,0 Hz, 1 H, H-6b), 4,69, 4,76 (2 d, J=12,0 Hz, cada uno 1 H, Troc-CH₂), 4,94 (d, J=3,6 Hz, 1 H, H-1), 5,16 (m, 1 H, lípido-3-H), 5,30 (m, 2 H, CH=CH₂), 5,39 (dd, J=9,5, 9,5 Hz, 1 H, H-3), 5,42 (d, J=10,0 Hz, 1 H, NH), 5,53 (s, 1 H, CHPh), 5,90 (m, 1 H, CH=CH₂), 7,30-7,35 (m, 15 H, Ar-H). Análisis, calculado para C₄₇H₇₄Cl₃NO₁₀ (919,46): C, 61,40; H, 8,11; N, 1,52. Determinado: C, 61,40; H, 8,19; N, 1,58.

Ejemplo 2

30 *Preparación del compuesto 9*

A una solución de 8 (1,45 g, 1,60 mmol) en THF seco (20 ml) se añadieron tamices moleculares (4 A, 3,0 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 20 minutos. Se añadió cianoborohidruro de sodio (1,0 g, 15,96 mmol) y la mezcla se enfrió a 0°C. Se añadió gota a gota una solución de HCl (g)/Et₂O lentamente hasta que no se desprendió gas. La mezcla se echó luego en una solución saturada de bicarbonato de sodio (50 ml) y se extrajo con diclorometano (100 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de cloruro de sodio (20 ml) y se secaron con sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice (inicialmente con hexano: acetato de etilo, 5:1, y luego 4:1) para dar 9 (1,23 g, 85%). TLC: R_f=0,20 (hexano: acetato de etilo, 4:1). [α]_D²⁰=+47,5 (c 1,0, CHCl₃). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,25 (br s, 38 H, 19 CH₂), 1,50 (m, 4 H, 2 CH₂), 2,28 (t, J=7,5 Hz, 2 H, CH₂), 2,48 (dd, J=14,0, 4,0 Hz, 1 H), 2,58 (dd, J=14,0, 7,5 Hz, 1 H), 3,27 (d, J=3,5 Hz, 1 H, OH), 3,70-3,86 (m, 4 H), 3,92-4,03 (m, 2 H), 4,58 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,64 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,66 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,76 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,92 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,13 (m, 2 H), 5,19-5,31 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,40 (d, J=9,5 Hz, 1 H, NH), 5,88 (m, 1 H, CH₂=CH), 7,30 (m, 5 H, Ar-H). ES-MS calculada para C₄₇H₇₆Cl₃NO₁₀: 919,5. Determinada: 920,8 (M+H).

Ejemplo 3

Preparación del compuesto 10

Al compuesto 9 (1,20 g, 1,30 mmol) en diclorometano seco (20 ml) se añadió 1H-tetrazol (273 mg, 3,90 mmol) y dibencil diisopropilfosfaramidita (900 mg, 0,875 ml, 2,61 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se enfrió a 0°C. Se añadió ácido m-cloroperbenzoico (m-CPBA, 1,63 g, 55%, 5,22 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a 0°C. La mezcla se echó luego en hidrogenosulfato de sodio al 10% (40 ml) y se extrajo con diclorometano (40 ml x 3). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (20 ml), se secó con sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía flash repetida (inicialmente hexano: acetato de etilo 4:1 y luego 3:1). TLC: R_f=0,31 (hexano: acetato de etilo, 3:1) para dar 10 (1,33 g, 86%). [α]_D²⁰=+35,0 (c 1,0, CHCl₃). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,24 (br s, 38 H, 19 CH₂), 1,50 (m, 4 H, 2 CH₂), 2,17 (t, J=7,0 Hz, 2 H, CH₂), 2,41 (dd, J=16,5, 5,5 Hz, 1 H), 2,51 (dd, J=16,5, 7,5 Hz, 1 H), 3,66 (dd, J=11,0, 4,5 Hz, 1 H), 3,74 (dd, J=11,0, 2,0 Hz, 1 H), 3,91 (m, 1 H), 4,00 (m, 2 H), 4,20 (m, 1 H), 4,44 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,53 (m, 1 H, H-4), 4,54 (d, J=12,0, 1 H), 4,63 (d, J=12,0, 1 H), 4,88-4,95 (m, 5 H), 5,11 (m, 1 H), 5,20-5,32 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,35 (dd, J=10,5, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 5,41 (d, J=9,5 Hz, 1 H, NH), 5,88 (m, 1 H, CH₂=CH), 7,30 (m, 15 H, Ar-H). ES-MS calculada para C₆₁H₈₉Cl₃NO₁₃P: 1179,6, determinada: 1181,0 (M+H).

65

ES 2 343 788 T3

Ejemplo 4

Preparación del compuesto 11

5 Se resuspendió hexafluorofosfato de [bis(metildifenilfosfina)](1,5-ciclooctadieno) iridio (I) (14 mg, 0,0165 mmol) en THF seco (5 ml) y se burbujeó gas hidrógeno durante 5 minutos para dar una solución amarillenta, que se añadió a la solución de 10 (1,30 g, 1,10 mmol) en THF seco (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron luego agua (0,5 ml) y N-bromosuccinimida (NBS, 294 mg, 1,62 mmol) y la reacción se agitó durante 1 hora más. El resto obtenido de la eliminación del solvente se disolvió en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (20 ml x 2). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (hexano: acetato de etilo, 2:1) para dar 11 (950 mg, 76%). TLC: $R_f=0,31$ (acetato de etilo: hexano, 1:2). $[\alpha]_D^{20}=+17,5$ (c 1,0, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,24 (br s, 38 H, 19 CH_2), 1,50 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,18 (t, $J=7,0$ Hz, 2 H, CH_2), 2,39 (m, 2 H, CH_2), 3,59 (dd, $J=11,0, 6,0$ Hz, 1 H), 3,71 (dd, $J=11,0, 1,5$ Hz, 1 H), 3,94 (m, 1 H), 4,16 (m, 1 H), 15 4,40 (m, 3 H), 4,49 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,65 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,72 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,90 (m, 4 H), 5,09 (m, 1 H), 5,39 (t, $J=3,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,37 (dd, $J=10,0, 9,5$ Hz, 1 H, H-3), 5,70 (d, $J=9,5$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 15 H, Ar-H). ES-MS calculada para $\text{C}_{58}\text{H}_{85}\text{Cl}_3\text{NO}_{13}\text{P}$: 1139,5. Determinada: 1141,0 (M+H).

20 Ejemplo 5

Preparación del compuesto 12

25 A una solución de 11 (920 mg, 0,81 mmol) en diclorometano seco (10 ml), se añadieron tricloroacetnitrilo (2 ml) y DBU (4 gotas). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío (no a sequedad). El residuo se purificó mediante cromatografía flash (hexano: acetato de etilo, 4:1, 3,5: 1 y 3:1, con trietilamina al 0.5%) para dar 12 (700 mg, 68%). TLC: $R_f=0,36$ (hexano: acetato de etilo, 3:1). $[\alpha]_D^{20}=+12,5$ (c 0,4, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,24 (br s, 38 H, 19 CH_2), 1,50 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,19 (t, $J=7,0$ Hz, 2 H, CH_2), 2,46 (m, 2 H, CH_2), 3,71 (m, 2 H), 4,04 (m, 1 H), 4,15 (ddd, $J=1,0, 8,5, 3,5$ Hz, 1 H, H-2), 4,43 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,52 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,61 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,71 (ddd, $J=9,5, 9,5, 9,5$ Hz, 1 H, H-4), 4,77 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,94 (m, 4 H), 5,12 (m, 1 H), 4,39 (dd, $J=10,0, 9,5$ Hz, 1 H, H-3), 5,65 (d, $J=8,5$ Hz, 1 H, NH), 6,47 (d, $J=3,5$ Hz, 1 H, H-1), 7,32 (m, 15 H, Ar-H), 8,72 (s, 1 H, NH). ES-MS calculada para $\text{C}_{60}\text{H}_{85}\text{Cl}_6\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}$: 1282,4. Determinada: 1284,0 (M+H).

35 Ejemplo 6

Preparación del compuesto 14

40 El compuesto 13 (672 mg, 2,97 mmol) se disolvió en acetonitrilo seco (10 ml) y se añadieron 2,2-dimetoxipropano (560 mg, 0,66 ml, 5,35 mmol) y ácido p-toluenosulfónico (56 mg, 0,279 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se añadió trietilamina (0,5 ml) para extinguir la reacción. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía flash (hexano/acetato de etilo, 2:1) para dar 14 (614 mg, 82%). $R_f=0,67$ (hexano/acetato de etilo, 1:2). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1,41 (s, 3 H, CH_3), 1,42 (s, 3 H, CH_3), 2,40 (br s, 1 H, OH), 3,59 (s, 2 H, CH_2), 3,69 (s, 2 H, CH_2), 3,74 (s, 4 H, 2 CH_2), 4,55 (s, 2 H, CH_2Ph), 7,30 (m, 5 H, Ar-H).

Ejemplo 7

Preparación del compuesto 15

55 Se disolvió el compuesto 14 (572 mg, 2,26 mmol) en piridina seca (3 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (5,7 mg, 2,71 mmol) y la mezcla se agitó durante 3 horas. Se añadió más cloruro de p-toluenosulfonilo (430 mg, 2,26 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después se añadió metanol (1 ml) para extinguir la reacción y el solvente se eliminó al vacío mediante codestilación con tolueno. El residuo se disolvió en diclorometano (100 ml) y se lavó con NaHCO_3 saturado (acuoso) (30 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (30 ml) y la fase orgánica combinada se secó con sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (hexano/acetato de etilo, 5:1) para dar 15 (930 mg, 98%). $R_f=0,65$ (hexano/acetato de etilo, 2:1). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1,30 (s, 3 H, CH_3), 1,40 (s, 3 H, CH_3), 2,42 (s, 3 H, CH_3), 3,35 (s, 2 H, CH_2), 3,63 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 3,72 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 4,20 (s, 4 H, 2 CH_2), 4,50 (s, 2 H, CH_2Ph), 7,30 (m, 7 H, Ar-H), 7,78 (m, 2 H, Ar-H). ES-MS calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6\text{S}$: 420,2; determinada: 443,2 (M + Na).

65

ES 2 343 788 T3

Ejemplo 8

Preparación del compuesto 16

5 Se disolvió el compuesto 15 (907 mg, 2,16 mmol) en tolueno (30 ml) y se añadieron NaHCO₃ saturado (acuoso) (30 ml), azida de sodio (561 mg, 8,63 mmol) y el catalizador de transferencia de fase ALIQUAT (433 mg, 0,49 ml, 1,08 mmol). La mezcla se sometió a reflujo durante 16 horas y se añadió más azida de sodio (1,40 g, 21,60 mmol). La reacción siguió durante 24 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (30 ml x 3). La fase orgánica combinada se lavó con agua (30 ml), se secó con sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (hexano/acetato de etilo, 8:1) para dar 16 (440 mg, 70%) y el material de partida 15 (163 mg, 18%). $R_f=0,34$ (hexano/acetato de etilo, 6:1). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): d = 1,42 (s, 6 H, 2 CH₃), 3,40 (s, 2 H, CH₂), 3,52 (s, 2 H, CH₂), 3,64 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 3,73 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 4,50 (s, 2 H, CH₂Ph), 7,30 (m, 5 H, Ar-H). ES-MS calculada para C₁₅H₂₁N₃O₃: 291,2; determinada: 314,1 (M + Na). ES-MS calculada para C₁₅H₂₁N₃O₃: 291,2; determinada: 314,1 (M + Na).

Ejemplo 9

Preparación del compuesto 17

25 Se disolvió el compuesto 16 (40 mg, 0,137 mmol) en ácido acético (10 ml) y se añadió polvo de zinc (1,0 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y el sólido se filtró y se lavó con ácido acético (10 ml). El filtrado se concentró al vacío. El residuo se disolvió en dioxano-NaHCO₃ saturado (acuoso) (2:1, 6 ml, pH 8-9) y se añadió 2,2,2-tricloroetoilclorofornato (123 mg, 0,08 ml, 0,568 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El dioxano se eliminó después al vacío y se añadió agua (10 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (10 ml x 3) y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (hexano/acetato de etilo, 4:1) para dar 17 (28 mg, 47%). $R_f=0,17$ (hexano/acetato de etilo, 6:1). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): d = 1,39 (s, 3 H, CH₃), 1,41 (s, 3 H, CH₃), 3,32 (d, J = 6,0 Hz, 2 H, CH₂), 3,54 (s, 2 H, CH₂), 3,67 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 3,75 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 4,57 (s, 2 H), 4,72 (s, 2 H), 5,50 (t, J = 6,0 Hz, 1 H, NH), 7,35 (m, 5 H, Ar-H). ES-MS calculada para C₁₈H₂₄Cl₃NO₅: 439,1; determinada: 462,1 (M + Na), 464,1 (M + Na, ³⁷Cl).

Ejemplo 10

Preparación del compuesto 18

40 Se disolvió el compuesto 17 (18,3 mg, 0,0417 mmol) en ácido acético-agua (4:1, 10 ml) y se trató a 60°C durante 45 minutos. El solvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía flash (hexano/acetato de etilo, 1:1) para dar 18 (15 mg, 90%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): d = 3,03 (t, J = 6,5 Hz, 2 H, 2 OH), 3,43 (s, 2 H, CH₂), 3,44 (d, J = 6,5 Hz, 2 H, CH₂NH), 3,51 (d, J = 6,5 Hz, 4 H, 2 CH₂OH), 4,55 (s, 2 H), 4,73 (s, 2 H), 5,35 (t, J = 6,5 Hz, 1 H, NH), 7,35 (m, 5 H, Ar-H). ES-MS calculada para C₁₅H₂₀Cl₃NO₅: 399,0; determinada: 422,0 (M + Na), 424,0 (M + Na, ³⁷Cl).

Ejemplo 11

Preparación del compuesto 19

50 A una solución de 12 (620 mg, 0,484 mmol) y 18 (750 mg, 1,936 mmol) en diclorometano seco (15 ml) se añadieron tamices moleculares (4A, 2,0 g) y la mezcla se agitó en nitrógeno durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió una solución de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf) (0,01 M en diclorometano) (3,0 ml) gota a gota en 5 minutos. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se añadió una solución saturada de bicarbonato de sodio (10 ml) para extinguir la reacción. El tratamiento final acuoso normal y la cromatografía flash (hexano/acetona, 2,8:1 y 2:1) produjeron 19 (590 mg, 81) como una mezcla diastereoisomérica en una relación de alrededor de 1:1. $R_f=0,27$ (hexano/acetona, 2,5:1). $[\alpha]_D^{20}=-7,6$ (c 0,8, cloroformo). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): d = 0,88 (t, J = 6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,25 (br s, 36 H, 18 CH₂), 1,45 (m, 2 H, CH₂), 1,58 (m, 2 H, CH₂), 1,68 (m, 2 H, CH₂), 2,23 (t, J = 7,5 Hz, 2 H, CH₂), 2,41 (m, 2 H, CH₂), 3,10 (m, 0,5 H), 3,30-3,62 (m, 7,5 Hz), 3,68-3,83 (m, 2 H), 4,40-4,56 (m, 7 H), 4,65-4,80 (m, 5 H), 4,90 (m, 5 H), 5,19 (m, 2 H), 5,53 (d, J = 9,0 Hz, 0,5 H, NH), 5,72 (m, 1,5 H, NH), 7,30 (m, 20 H, Ar-H). ES-MS calculada para C₇₃H₁₀₃C₁₆N₂O₁₇P: 1520,5; determinada: 1543,5 (M + Na, 42), 1544,4 (M + Na, isótopo ¹³C, 34), 1545,5 (M + Na, isótopo ³⁷Cl, 100).

65

ES 2 343 788 T3

Ejemplo 12

Preparación del compuesto 20

5 Se disolvió el compuesto 19 (450 mg, 0,30 mmol) en ácido acético (50 ml) y se añadió polvo de zinc (4,0 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y el sólido se filtró. El sólido se lavó adicionalmente con ácido acético (50 ml) y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano (150 ml) y la solución se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (20 ml). La fase acuosa se volvió a lavar con diclorometano (20 ml x 2). La fase orgánica combinada se secó con sulfato de sodio y se concentró al vacío para dar el intermedio diamina (346 mg). Se agitó una mezcla de la diamina (346 mg) y ácido lipídico 7 (545 mg, 1,20 mmol) y DCC (371 mg, 1,80 mmol) en diclorometano seco (10 ml) a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadió agua (0,05 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos. El sólido se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado con lecho de sulfato de sodio. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía flash (hexano/acetona, 5:1 y 4,5:1) para dar 20 (390 mg, 64%). $R_f=0,20$ (hexano/acetona, 4:1). $[\alpha]_D^{20}=-9,4$ (c 0,5, cloroformo). 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$): d = 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,25-1,50 (m, 112 H, 56 CH_2), 1,58 (m, 11 H), 1,71-1,81 (m, 3 H), 1,97 (m, 1 H, OH), 2,21 (t, J = 7,5 Hz, 2 H, CH_2), 2,24-2,63 (m, 10 H, 5 CH_2), 3,06 (dd, J = 14,0, 5,0 Hz, 0,5 H), 3,17 (dd, J = 14,0, 6,0 Hz, 0,5 H), 3,30-3,40 (m, 3 H), 3,43-3,53 (m, 2 H), 3,57-3,63 (m, 2,5 H), 3,67-3,80 (m, 2 H), 3,87 (m, 1 H), 3,97 (m, 0,5 H), 4,35 (d, J = 8,0 Hz, 0,5 H, H-1), 4,38-4,53 (m, 5 H), 4,65 (d, J = 8,0 Hz, 0,5 H, H-1), 4,90 (m, 4 H), 5,07-5,24 (m, 4 H), 6,04 (d, J = 8,5 Hz, 0,5 H, NH), 6,38 (d, J = 7,5 Hz, 0,5 H, NH), 6,65 (dd, J = 6,5, 6,5 Hz, 0,5 H, NH), 6,79 (dd, J = 7,0, 6,0 Hz, 0,5 H, NH), 7,30 (m, 20 H, Ar-H). ES-MS calculada para $C_{123}H_{205}N_2O_{19}P$: 2045,5; determinada: 2068,5 (M + Na, 63), 2069,5 (M + Na, isótopo ^{13}C , 100).

Ejemplo 13

Preparación del compuesto 21

30 A una solución del compuesto 20 (220 mg, 0,108 mmol) en diclorometano seco (5 ml) se añadieron dibencil diisopropilfosforamidita (74,3 mg, 74,3 μ l, 0,215 mmol) y 1H-tetrazol (22,7 mg, 0,324 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se enfrió a 0°C. Se añadió ácido m-cloroperbenzoico (m-CPBA, 55%, 118 mg, 0,379 mmol) y la mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos. La mezcla se diluyó con diclorometano (100 ml) y se lavó con una solución acuosa de bisulfito de sodio (10%, 20 ml) y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (20 ml). La fase orgánica combinada se lavó luego con una solución saturada de bicarbonato de sodio (20 ml) y la fase acuosa se volvió a lavar con diclorometano (20 ml). La fase orgánica combinada se secó después con sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash repetida (hexano/acetona, 5:1 y después 4,5:1, diclorometano/metanol, 100:1 y después 100:1,5; hexano/acetato de etilo, 2:1 y después 1,5:1) para dar 21 (200 mg, 80%) como mezcla diastereoisomérica en una relación de alrededor de 1:1. R_f (mancha superior) = 0,29 y R_f (mancha inferior) = 0,25 (hexano/acetona, 3:1). $[\alpha]_D^{20}$ (mezcla 1:1) = -7,6 (c 0,5, cloroformo). 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): d = 0,87 (t, J = 6,5 Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,30 (m, 108 H, 54 CH_2), 1,48-1,70 (m, 18 H), 2,10-2,53 (m, 11 H), 2,90-3,35 (m, 5 H), 3,55 (m, 2 H), 3,75-3,90 (m, 4 H), 4,00 (m, 1 H), 4,36-4,52 (m, 6 H), 4,85-5,01 (m, 8 H), 5,08-5,22 (m, 4 H), 6,30 (m, 1 H, NH), 6,88 (d, J = 8,5 Hz, 0,5 H, NH), 7,00 (d, J = 8,0 Hz, 0,5 H, NH), 7,30 (m, 30 H, Ar-H). ES-MS calculada para $C_{137}H_{218}N_2O_{22}P$: 2305,5; determinada: 2328,5 (M + Na, 78), 2329,5 (M + Na, isótopo ^{13}C , 100).

Ejemplo 14

Preparación del compuesto 1

50 El compuesto 20 (96 mg, 0,047 mmol) se disolvió en THF-HOAc (10:1, 77 ml) y se añadió paladio sobre carbón (100 mg). La mezcla se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 24. El sólido se filtró luego y se lavó con cloroformo/metanol (1:1, 30 ml). El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía flash (cloroformo/metanol/agua, 9:1:0 y después 4:1:0,1) para dar 1 que se liofilizó de tert-butanol para dar el producto como un polvo blanco (80 mg, 100%). $R_f=0,16$ (cloroformo/metanol/agua/ácido acético, 6:1:0,1:0,1). $[\alpha]_D^{20}=-6,5$ (c 0,2, cloroformo). 1H RMN (600 MHz, $CDCl_3-CD_3OD$, 1:1): d = 0,89 (t, J = 6,5 Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,26 (m, 114 H, 57 H), 1,60 (m, 12 H, 6 CH_2), 2,30 (m, 6 H, 3 CH_2), 2,37 (dd, J = 15,0, 6,0 Hz, 1 H), 2,45 (dd, J = 15,0, 7,0 Hz, 1 H), 2,50 (dd, J = 15,0, 5,0 Hz, 1 H), 2,54 (dd, J = 15,0, 8,0 Hz, 1 H), 2,57 (dd, J = 15,0, 5,0 Hz, 1 H), 2,67 (dd, J = 15,0, 7,0 Hz, 1 H), 3,04 (dd, J = 14,0, 6,0 Hz, 1 H), 3,18 (dd, J = 14,0, 6,0 Hz, 1 H), 3,25 (d, J = 10,0 Hz, 1 H), 3,29 (d, J = 10,0 Hz, 1 H), 3,36 (m, 3 H), 3,37 (d, J = 10,0 Hz, 1 H), 3,64 (d, J = 10,0 Hz, 1 H), 3,77 (br d, J = 12,0 Hz, 1 H), 3,89 (dd, J = 10,0, 9,0 Hz, 1 H), 3,96 (br d, J = 12,0 Hz, 1 H), 4,25 (m, 1 H, H-4), 4,43 (d, J = 8,5 Hz, 1 H, H-1), 5,07 (dd, H = 10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3), 5,17 (m, 2 H), 5,23 (m, 1 H). ES-MS calculada para $C_{95}H_{181}N_2O_{13}P$: 1685,3; determinada: 1686,3 (M + H), 1708,3 (M + Na), 1730,3 (M + 2Na - H).

65

ES 2 343 788 T3

Ejemplo 15

Preparación del compuesto 2

5 De una manera similar a lo descrito para 1, el compuesto 21 (104 mg, 0,045 mmol) se trató con paladio sobre carbón (100 mg) en THF-HOAc (10:1, 77 ml) en una atmósfera de hidrógeno durante 20 horas para dar 2 (77 mg, 96%) después de purificación por cromatografía flash (cloroformo/metanol/agua, 9:1:0 y después 6:4:0,5). $R_f=0,50$ (cloroformo/metanol/agua, 6:4:0,5). $[\alpha]_D^{20}=-3,0$ (c 0,2, cloroformo). $^1\text{H RMN}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 1:1): d = 0,89 (t, J = 6,5 Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,25 (m, 114 H, 57 CH_2), 1,60 (m, 12 H, 6 CH_2), 2,30 (m, 6 H, 3 CH_2), 2,37-
10 2,70 (m, 6 H, 3 CH_2), 3,03 (d, J = 14,0 Hz, 0,5 H), 3,13 (d, J = 14,0 Hz, 0,5 H), 3,24 (d, J = 14,0 Hz, 0,5 H), 3,27 (d, J = 14,0 Hz, 0,5 H), 3,29-3,36 (m, 2 H), 3,45 (br s, 1 H), 3,55-3,95 (m, 6 H), 4,06-4,32 (m, 2 H), 5,14-5,27 (m, 4 H). ES-MS calculada para $\text{C}_{95}\text{H}_{181}\text{N}_2\text{O}_{19}\text{P}$: 1685,3; determinada: 1686,3 (M + H), 1708,3 (M + Na), 1730,3 (M + 2Na - H).

15 Ejemplo 16

Preparación del compuesto 22

20 A dipentaeritritol (2,0 g, 7,87 mmol) en DMF seco (10 mL) se añadieron dimetil acetal de benzaldehído (4,79 g, 4,7 ml, 31,46 mmol) y ácido toluenosulfónico (150 mg, 0,78 mmol) y la mezcla se agitó a 50°C durante 1 hora. La TLC (metanol: diclorometano, 8:92) mostró un producto y una impureza superior, que se pensó eran otros sitios -OH también sustituidos. Para hidrolizar la impureza superior, se añadió trietilamina (5 gotas) para neutralizar, se evaporó el DMF a alto vacío y se añadió metanol. La segunda TLC mostró que la mancha superior había desaparecido. La mezcla
25 se concentró para limpiar el jarabe y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (metanol: diclorometano, 5:95) para dar 22 (1,91 g, 57%) como una mezcla de tres estereoisómeros. TLC: $R_f = 0,38$ (mancha superior) y $R_f = 0,34$ (mancha inferior) (metanol al 7% en diclorometano). $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 3,21, 3,31, 3,39$ (3 s, 4 H); 3,28, 3,32, 3,46, 3,51 (4 br s, 2 H, 2 OH); 3,68, 3,69, 3,75 (3 d, J = 12,0 Hz, 4 H); 3,81, 3,92, 3,98 (3 s, 4 H); 4,10 (m, 4 H); 5,39, 5,41, 5,43 (3 s, 2 H, 2 CHPh), 7,38 (m, 6 H, Ar-H); 7,50 (m, 4 H, Ar-H). Mediante cromatografía
30 repetida (metanol/diclorometano, elución en gradiente del 1% al 10%), la mancha inferior se separó para dar un único componente. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) para la mancha inferior: $\delta = 2,50$ (br s, 2 H, 2 OH), 3,45 (br s, 4 H), 3,73 (d, J = 12,0 Hz, 4 H), 3,97 (s, 4 H), 4,13 (d, J = 12,0 Hz, 4 H), 5,43 (s, 2 H, 2 CHPh), 7,37 (m, 6 H, Ar-H), 7,49 (m, 4 H, Ar-H).

35 Ejemplo 17

Preparación del compuesto 23

40 Se añadió hidruro de sodio (0,426 g, 17,7 mmol) a DMF seco (35 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadió 22 (1,524 g, 3,54 mmol, disuelto en 15 ml de DMF) gota a gota y la mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos para la formación de alcóxido. Se añadió gota a gota n-1-bromotetradecano (3,16 ml, 10,6 mmol, disuelto en 5 ml de DMF) a la mezcla y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La TLC (hexano: acetato de etilo, 15:1) mostró una cantidad considerable de impureza inferior que se pensó era monosustitución del brazo lipídico. Se añadieron otros 2 equivalentes
45 de hidruro de sodio (0,21 g) y 2 equivalentes de n-1-bromotetradecano (2,1 mL) y la mezcla se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Se añadió más DMF (40 ml) a la mezcla en suspensión y la reacción continuó durante 16 horas más a 50°C. El exceso de NaH se extinguió con agua (3 ml) y la mezcla de reacción se neutralizó con HCl (conc.). El DMF se evaporó, con coevaporación con tolueno (2 x 30 ml). El residuo se disolvió en cloruro de sodio saturado (100 mL), se extrajo con diclorometano (3 x 100 mL) y se volvió a lavar con cloruro de sodio saturado (30 mL). Se secó
50 con sulfato de sodio y se concentró. El sólido se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 15:1) para dar 23 (2,09, 72%). La TLC indicó dos manchas, que se separaron. La mancha superior contiene dos componentes y la mancha inferior es un único compuesto.

23 (mancha superior): TLC: $R_f = 0,43$ (hexano: acetato de etilo, 15:1). $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,88$ (t, J = 6,5 Hz, 6 H, 2 CH_3); 1,26 (br s, 44 H, 22 CH_2); 1,54 (m, 4 H, 2 CH_2); 3,23, 3,24, 3,33 (3 s, 4 H); 3,34, 3,37, 3,45 (3 t, J = 6,5 Hz, 4 H); 3,71, 3,72, 3,81 (3 s, 4 H); 3,90 (m, 4 H); 4,10 (m, 4 H); 5,41, 5,43 (2 s, 2 H, CHPh), 7,35 (m, 6 H, Ar-H); 7,49 (m, 4 H, Ar-H).

23 (mancha inferior): TLC: $R_f = 0,36$ (hexano: acetato de etilo, 15:1). $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,88$ (t, J = 6,5 Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,26 (br s, 44 H, 22 CH_2), 1,58 (m, 4H, 2 CH_2), 3,23 (s, 4 H), 3,47 (t, J = 6,5 Hz, 4 H, 2 OCH_2CH_2), 3,72 (s, 4 H), 3,87 (d, J = 11,5 Hz, 4 H), 4,11 (d, J = 11,5 Hz, 4 H), 5,43 (s, 2 H, 2 CHPh), 7,36 (m, 6 H, Ar-H), 7,49 (m, 4 H Ar-H).

65

ES 2 343 788 T3

Ejemplo 18

Preparación del compuesto 24

5 A una solución de 23 (0,611 g, 0,742 mmol) en THF seco (20 mL) se añadieron tamices moleculares (4 Å, 2 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió cianoborohidruro de sodio (0,932 g, 14,84 mmol) en partes y la mezcla se enfrió a 0°C. Se añadió TFA (3,40 ml, 29,68 mmol) disuelto en THF (60 mL) gota a gota lentamente durante 45 minutos y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla se filtró sobre celite y el THF se evaporó al vacío. La mezcla se disolvió en una solución saturada de bicarbonato de sodio
10 (75 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de cloruro de sodio (50 mL) y se secaron con sulfato de sodio y se concentraron a un jarabe amarillo. El jarabe se purificó mediante cromatografía (elución en gradiente con hexano: acetato de etilo de 5:1 a 3:1) para dar el compuesto 24 (364 mg, 59%). TLC: $R_f = 0,19$ (hexano: acetato de etilo, 4:1). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,89$ (t, $J = 6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,27 (br s, 44 H, 22 CH_2), 1,52 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,97 (br s, 2 H, 2 OH), 3,36 (t, $J = 6,5$ Hz, 4 H, 2 OCH_2CH_2), 3,44 (s, 8 H), 3,48 (s, 4 H), 3,69 (br s, 4 H), 4,49 (s, 4 H, 2 CH_2Ph), 7,30 (m, 10 H, Ar-H).

Ejemplo 19

20 Preparación del compuesto 25

Al compuesto 24 (247 mg, 0,299 mmol) en diclorometano seco (5 ml) se añadieron 1H-tetrazol (0,136 g, 1,194 mmol) y dibencil diisopropilfosforamidita (0,310 g, 0,3 ml, 0,896 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y la formación del complejo se comprobó mediante TLC (hexano: acetato de etilo, 4:1, que muestra
25 24 consumido). La mezcla se enfrió después a 0°C y se añadió ácido m-cloroperbenzoico lentamente produciendo la formación de gas. Después de 30 minutos, la mezcla se echó en hidrogenosulfito de sodio al 10% (40 ml) y se extrajo con diclorometano (3 x 40 ml). La fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (20 ml), se secó con sulfato de sodio y se concentró a un jarabe amarillo. El jarabe se purificó mediante cromatografía repetida (hexano: acetato de etilo, 3:1; hexano: acetona, 6:1) para dar 25 (248 mg, 62%). TLC: $R_f = 0,21$ (hexano: acetato de etilo, 2:1). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,88$ (t, $J = 6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,22 (br s, 22 H, 11 CH_2), 1,24 (br s, 22 H, 11 CH_2), 1,44 (m, 4 H, 2 CH_2), 3,26 (t, $J = 6,5$ Hz, 4 H, 2 OCH_2CH_2), 3,32 (s, 4 H), 3,34 (s, 4 H), 3,40 (s, 4 H), 4,07 (d, $J = 3,5$ Hz, 4 H), 4,38 (s, 4 H), 4,99 (d, $J = 8,0$ Hz, 8 H, 4 CH_2Ph), 7,30 (m, 30 H, Ar-H).

35 Ejemplo 20

Preparación del compuesto 3

A una solución de 25 (150 mg, 0,111 mmol) en THF-HOAc (10:1, 90 mL) se añadió paladio sobre carbono (5%,
40 105 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno durante 16 horas. La TLC (cloroformo: metanol: agua: ácido acético, 4:1:0,1:0,1) indicó hidrogenación parcial. Se añadieron THF-HOAc (60 mL) y Pd/C (100 mg) adicionales a la mezcla y se dejó agitar a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno durante una segunda noche. La TLC (cloroformo: metanol: hidróxido de amonio: agua, 1:1:8%:8%) indicó fundamentalmente producto. El sólido se filtró y el filtrado se concentró a alto vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía (cloroformo: metanol: hidróxido de amonio: agua, 4:6:6%:6% a 1:1:8%:8%) para dar 3 como sal de amonio. El producto se redisolvió en CHCl_3 -MeOH- H_2O (1:1:8%) y se pasó a través de una pequeña columna de intercambio iónico (IR-120, forma Na^+) para dar 3 (44 mg, 47%) como sal de sodio. TLC: $R_f = 0,41$ (cloroformo: metanol: hidróxido de amonio: agua, 1:1:8%:8%). ES-MS calculada para $\text{C}_{38}\text{H}_{80}\text{O}_{13}\text{P}_2$: 806,5. Determinada: 805,5 (M-H) y 827,5 (M+Na-2H) (modo negativo). $^1\text{H RMN}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 1:1) para la sal de sodio: $\delta = 0,89$ (t, $J = 6,5$ Hz, 6H, 2 CH_3), 1,27 (br s, 44 H, 22 CH_2), 1,54 (m, 4 H, 2 OCH_2CH_2), 3,35-3,43 (m, 8 H), 3,45 (m, 1 H), 3,50 (m, 2 H), 3,53-3,59 (m, 3 H), 3,66-3,71 (m, 2 H), 3,77-3,83 (m, 4 H). $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 1:1) para la sal de amonio: $\delta = 0,89$ (t, $J = 7,0$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,27 (br s, 44 H, 22 CH_2), 1,55 (m, 4 H, 2 CH_2), 3,37-3,45 (m, 12 H), 3,57-3,65 (m, 4 H), 3,81-3,90 (m, 4 H).

55 Ejemplo 21

Preparación del compuesto 26

60 Se disolvió el compuesto 2 (9,50 g, 22,08 mmol) en piridina seca (57 mL). Se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (TsCl, 7,16 g, 37,54 mmol) a 0°C al recipiente de reacción. La reacción se calentó a temperatura ambiente de forma natural y se agitó durante la noche. Se añadió otra parte de cloruro de tosilo (TsCl, 5,46 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La solución se concentró al vacío. El residuo se codestiló con tolueno. El producto crudo se disolvió en acetato de etilo (600 mL) y se transfirió a un embudo de separación. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (300 mL). La fase acuosa se volvió a lavar con acetato de etilo
65 (300 mL) y la fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 3:1 y después 2:1) para dar 26 (9,18 g, 59%). TLC: $R_f = 0,25$ (hexano: acetato de etilo, 3:1). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 2,41 (s, 3 H, CH_3), 2,44 (s, 3 H, CH_3), 3,27

ES 2 343 788 T3

(s, 2 H), 3,70 (s, 2 H), 3,73 (d, J=12,0 Hz, 2 H), 3,80 (d, J=12,0 Hz, 2 H), 3,87 (s, 2 H), 3,93 (d, J=12,0 Hz, 2 H), 4,00 (d, J=12,0 Hz, 2 H), 4,32 (s, 2 H), 5,30 (s, 2 H, CHPh), 5,41 (s, 1 H, CHPh), 7,28-7,48 (m, 14 H, Ar-H), 7,81 (m, 4 H, Ar-H).

5

Ejemplo 22

Preparación del compuesto 27

10 El compuesto 26 (9,12 g, 12,91 mmol) se disolvió en tolueno (150 ml). Se añadieron bicarbonato de sodio saturado (150 mL), catalizador de transferencia de fase ALIQUAT™ (1 mL) y azida de sodio (33,58 g, 516,47 mmol) al recipiente de reacción. La solución se calentó a 110°C y se agitó durante la noche. Se añadieron más ALIQUAT™ (1 mL) y azida de sodio (16,79 g) y la mezcla se agitó a 110°C durante otras 4 horas. La reacción fue incompleta. La solución se enfrió a temperatura ambiente y el tratamiento final acuoso normal produjo un jarabe que se purificó.

15

El filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 5:1 y 4:1) para dar 27 (2,58 g) y el intermedio monoazida sustituido (3,73 g). El intermedio monoazida sustituido (3,73 g) se hizo reaccionar en tolueno (40 mL) con una solución saturada de bicarbonato de sodio (40 mL), aliquat (1 mL) y azida de sodio (16,34 g) a 110°C durante 7 días y se obtuvo más 27 (1,81 g), produciendo un rendimiento total del 71%. TLC: R_f = 0,63 (hexano: acetato de etilo, 3:1). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) para un isómero: δ 3,30 (s, 4 H), 3,78 (d, J=12,0 Hz, 4 H), 3,90 (s, 4 H), 4,10 (d, J=12,0 Hz, 4 H), 5,40 (s, 2 H, 2 CHPh), 7,34-7,48 (m, 10 H, Ar-H).

20

Ejemplo 23

25

Preparación del compuesto 28

Al compuesto diazido 27 (0,783 g, 1,629 mmol) en metanol (8 ml) se añadieron gota a gota 1,3-propanoditiol (3,27 mL, 32,586 mmol) y trietilamina (4,54 mL, 32,586 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La TLC (hexano: acetato de etilo, 2:1) mostró que la reacción era completa. La muestra de reacción se rotoevaporó y el ditiol se coevaporó con cloroformo (2 x 200 mL). El residuo se purificó mediante cromatografía flash para dar 28 (0,322 g, rendimiento combinado del 46%). TLC: R_f = 0,29 (metanol: diclorometano: agua: hidróxido de amonio, 9:1,5:0,1:0,1). C₂₄H₃₂N₂O₅ (428,23). ES-MS (modo positivo, m/z) determinado: 429 (M+H). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 2,60 (s, 2 H), 3,15 (s, 2 H), 3,35 (s, 2 H), 3,70 (d, J=12,0 Hz, 2 H), 3,77 (s, 4 H), 3,81 (d, J=12,0 Hz, 2 H), 4,09 (d, J=12,0 Hz, 4 H), 5,40 (s, 2 H), 7,32-7,47 (m, 10 H).

35

Ejemplo 24

Preparación del compuesto 29

El compuesto 28 (0,160 g, 0,376 mmol) se disolvió en diclorometano seco (10 mL). Se añadieron 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 0,465 g, 2,254 mmol) y ácido dilipídico 7 (0,513 g, 1,128 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente 60 horas. Las TLC (cloroformo: metanol: agua: hidróxido de amonio, 9:1,7:0,1:0,1; metanol: diclorometano, 5:95; hexano: acetato de etilo, 3:1) mostraron que la reacción era completa. El exceso de DCC se extinguió con agua (unas gotas) y se agitó durante 15 minutos. La mezcla de reacción se filtró a través de bolas de Na₂SO₄ 2X y el precipitado se lavó con diclorometano. Se rotoevaporó a un jarabe amarillento crudo. El jarabe se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 3:1) para dar 29 (0,324 g, rendimiento del 66%). C₈₀H₁₃₆N₂O₁₁ (1301,01). ES-MS (modo positivo, m/z) determinado: 1302 (M+H), 1324 (M+Na). ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, J=6,5 Hz, 12 H, 4 CH₃), 1,25 (br s, 80 H), 1,60 (m, 8 H), 2,25 (m, 4 H), 2,46 (m, 2 H), 2,58 (m, 2 H), 3,06 (s, 2 H), 3,14 (m, 2 H), 3,63 (m, 2 H), 3,72-3,80 (m, 6 H), 3,94-4,02 (m, 4 H), 5,18 (m, 1 H), 5,26 (m, 1 H), 5,38 (s, 1 H), 5,43 (s, 1 H), 6,08 (t, J=7,0 Hz, 1 H, H), 7,30-7,46 (m, 10 H), 7,84 (t, J=6,5 Hz, 1 H, NH).

50

Ejemplo 25

Preparación del compuesto 30

A una solución de 29 (0,300 g, 0,229 mmol) en THF anhídrido (10 mL) se añadieron tamices moleculares (4 Å, 1 g) y cianoborohidruro de sodio (0,287 g, 4,593 mmol). La mezcla se agitó a 0°C en una atmósfera de nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió gota a gota éter-HCl (sat.) hasta que dejó de burbujear (1-2 mL). La TLC (hexano: acetato de etilo, 6:4) mostró algo de apertura del mono-anillo. Se añadieron otros 20 equivalentes (0,287 g) de cianoborohidruro de sodio y se añadió gota a gota éter-HCl (2 mL). La mezcla se filtró sobre celite y el THF se rotoevaporó a alto vacío. La mezcla se disolvió en solución saturada de bicarbonato de sodio (75 ml) y se extrajo con diclorometano (3 x 75 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de cloruro de sodio (50 ml) y se secaron con sulfato de sodio y se concentraron a un jarabe amarillo. El jarabe se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 6:4) para dar el compuesto 30 (0,212 g, 71%). TLC: R_f = 0,17 (hexano: acetato de etilo, 6:4). C₈₀H₁₄₀N₂O₁₁ (1304,04). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 12 H, 4 CH₃), 1,25 (br s, 80 H),

65

ES 2 343 788 T3

1,60 (m, 8 H), 1,94 (br s, 2 H), 2,25 (m, 4 H), 2,43 (m, 4 H), 3,08 (m, 3 H), 3,22 (m, 2 H), 3,33 (m, 5 H), 3,40-3,57 (m, 4 H), 3,68 (m, 1 H), 3,78 (m, 1 H), 4,43 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,48 (s, 2 H), 4,51 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 5,16 (m, 2 H), 6,73 (m, 1 H), 6,85 (m, 1 H, NH), 7,30 (m, 10 H).

5 Ejemplo 26

Preparación del compuesto 31

10 Al compuesto 30 (0,237 g, 0,181 mmol) en diclorometano anhídrido (5 mL) se añadió tetrazol (0,076 g, 1,089 mmol) y se añadió gota a gota dibencil diisopropilfosfamidita (0,250 g, 0,24 ml, 0,724 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y la formación del complejo se comprobó con TLC (hexano: acetato de etilo, 6:4). Se añadieron otros 3 equivalentes (0,038 g) de tetrazol y 2 equivalentes (0,125 mg) de fosforamidita. La TLC
15 después de 2 horas mostró que el material de partida se había consumido por completo. La mezcla se enfrió después a 0°C y se añadió lentamente ácido 3-cloroperbenzoico (0,312 g, 1,81 mmol) produciendo la formación de gas. Después de 30 minutos, la mezcla se echó sobre hidrogenosulfito de sodio al 10% (40 ml) y se extrajo con diclorometano (3 x 40 ml). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (20 ml), se secó con sulfato de sodio y se concentró a un jarabe amarillo. El jarabe se purificó mediante cromatografía repetida (hexano: acetato de etilo, 7:3; hexano: acetona, 4:1) para dar 31 (198 mg, 60%). TLC: $R_f = 0,28$ (hexano: acetato de etilo, 3:1). $C_{108}H_{166}N_2O_{17}P_2$ (1825,16). ES-MS (modo negativo m/z) determinado: 1861 (M+Cl). 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 12 H, 4 CH_3), 1,25 (br s, 80 H), 1,55 (m, 8 H), 2,21 (2 t, J=6,5 Hz, cada uno 2 H), 2,39 (m, 4 H), 3,10 (m, 2 H), 3,16 (m, 4 H), 3,31 (m, 6 H), 3,95 (m, 4 H), 4,37 (m, 4 H), 4,98 (m, 8 H), 5,19 (m, 2 H), 7,08 (t, J=6,0 Hz, 2 H, 2 NH), 7,22-7,31 (m, 30 H).

25 Ejemplo 27

Preparación del compuesto 4

30 A una solución de 31 (28 mg, 0,015 mmol) en THF destilado-AcOH (10:1, 75 mL) se añadió paladio sobre carbono (10%, 75 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno durante 16 horas. La TLC (cloroformo: metanol: hidróxido de amonio: agua, 2:3:0,5:0,5) indicó principalmente producto. El sólido se filtró por gravedad y el filtrado se concentró a alto vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash usando como soporte Iatrobeas (cloroformo: metanol, 9:1 a cloroformo: metanol: agua, 5:3:0,3) para dar 4 (18 mg, rendimiento del
35 95%). TLC: $R_f = 0,20$ (cloroformo: metanol: agua, 4:2:0,3). $C_{66}H_{130}N_2O_{17}P_2$ (1284,88). ES-MS (modo negativo, m/z) determinado: 1284 (M-H). 1H RMN (600 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$, 1:1): δ 0,85 (t, J=6,5 Hz, 12 H, 4 CH_3), 1,28 (br s, 80 H), 1,62 (m, 8 H), 2,30 (m, 4 H), 2,50-2,63 (m, 4 H), 3,03-3,15 (m, 4 H), 3,20-3,31 (m, 6 H), 3,34-3,38 (m, 2 H), 3,70-3,78 (m, 4 H), 5,28 (m, 2 H).

40 Ejemplo 28

Inducción de secreción de citoquinas por análogos de lípido A

45 Se incubaron células adherentes aisladas de sangre periférica humana en medio RPMI-1640 completo, en presencia de GM-CSF e IL-4. Después de tres días de incubación, se añadieron los análogos de lípido A a una concentración de 10 $\mu g/mL$. Después de 24 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se determinó la presencia de las citoquinas usando kits de ELISA. Se midieron los niveles de TNF-alfa, IL-6 e IL-8 y se enumeran en la tabla 1 (véase también la figura 14).

50

TABLA 1

*Patrón de secreción de citoquinas in vitro de células adherentes humanas activadas con imitadores sintéticos de lípido A 1, 2 o lípido A R595**

55

| | TNF-alfa (pg/mL) | IL-6 (pg/ml) | IL-8 (pg/ml) |
|---------------|------------------|--------------|--------------|
| 1 | 9723 | 21016 | 97980 |
| 2 | 4591 | 14097 | 72868 |
| lípido A R595 | 5490 | 19424 | 82612 |
| Medio | 263 | 17 | 99 |

65

* Lípido A R595 es el producto natural lípido A aislado de *Salmonella minnesota*, R595 (Avanti Polar Lipids, Inc.)

ES 2 343 788 T3

Ejemplo 29

Ratones inmunizados con vacunas liposomales

5 Se inmunizaron grupo de ratones C57-Black por vía subcutánea con el vacuna liposomal BLP25 que contenía de 0,2-200 μg de lipopéptido 25-mero basado en MUC1 como antígeno, que tiene la secuencia peptídica de H₂N-STAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPK(Pal)G-OH, y de 0,1-100 μg (la mitad de peso del antígeno lipopeptídico) de análogo de lípido A por dosis. Nueve días después de la inyección de las vacunas, los ratones se sacrificaron y se cogieron los linfocitos de los ganglios linfáticos con drenaje (respuesta local) o de los bazos (respuesta sistémica) para
10 determinar la respuesta inmune en cada grupo. Los linfocitos tomados de los ratones inmunizados se incubaron en cultivos *in vitro* en presencia del antígeno de recuerdo basado en MUC1 BP1-151, que tiene la secuencia peptídica H₂N-STAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPK-OH.

15 Ejemplo 30

Medida de la proliferación de células T

Se evaluó la proliferación de células T usando un ensayo estándar de incorporación de ³H timidina. Brevemente, se
20 añadieron linfocitos de ganglios linfáticos inguinales pasados por lana de nailon de cada ratón a un cultivo que contenía 10⁶ esplenocitos singénicos nativos tratados con mitomicina C, que sirven como células presentadoras de antígeno (CPA). A cada pocillo se añadieron 20 μg del péptido de recuerdo basado en MUC1 BP1-151, H₂N-STAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPK-OH para control positivo; y los cultivos que no contenían antígeno o péptido BP1-72, que tiene la secuencia peptídica H₂N-EAIQPGCIGGPKGLPGLPGP-OH, se usaron como control negativo. El cultivo se
25 incubó durante 72 horas en un volumen total de 250 μl /pocillo, seguido por la adición de 1 μCi de ³H-timidina en un volumen de 50 μl . Las placas se incubaron durante 18-20 horas adicionales. Las células se recogieron y se midió la incorporación de [³H]dTh mediante un contador de centelleo líquido. Los resultados de la proliferación de células T correspondientes a varias vacunas liposomales con adyuvantadas con imitador de lípido A 1, 2 o lípido A R595 se muestran en la tabla 2 y la figura 15.

30

TABLA 2

35 *Respuesta de proliferación de células T específicas de antígeno después de inmunización de ratones C57BL/6 con una dosis de vacuna liposomal BLP25. La dosis contiene 0,2 μg de antígeno lipopeptídico 25-mero basado en MUC1 y 0,1 μg de análogo de lípido A (1, 2 y lípido A R595) como adyuvante*

| Compuesto | CPM (cuentas por minuto) | DE |
|-----------------|--------------------------|------------|
| 1 | 14831 | ± 2475 |
| 2 | 20793 | ± 2505 |
| lípido A R595 | 11920 | ± 3630 |
| Solución salina | 320 | ± 292 |

50 Ejemplo 31

Inhibición del crecimiento tumoral por vacunas liposomales adyuvantadas con imitadores sintéticos de lípido A

Se provocaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con células tumorales MC38-MUC1 en el día 0. El día 7, 14 y 21 se inmunizaron los grupos de ratones por vía intradérmica con la vacuna liposomal BLP25 que contenía 200
55 μg /dosis del antígeno lipopeptídico 25-mero basado en MUC1 y 100 μg /dosis de imitador sintético de lípido A 1, 2 o lípido A R595. El día 34, se tomaron los diámetros del tumor (longitud y anchura) con un compás calibrador y el tamaño del tumor se expresó en mm² (longitud x anchura). Los datos se muestran en la tabla 3 y la figura 16.

60

65

TABLA 3

Inmunoterapia activa específica de ratones que tienen el tumor MC-38 MUC1 inmunizados por vía intradérmica con la vacuna liposomal BLP25 que contiene análogos de lípido A (1, 2 y lípido A R595). La dosis de la vacuna contiene 200 µg de lipopéptido BLP25 y 100 µg de análogo de lípido A como adyuvante

| Compuesto | Tamaño del tumor (mm ²) |
|-----------------|-------------------------------------|
| 1 | 284 |
| 2 | 298 |
| lípido A R595 | 287 |
| Solución salina | 539 |

Referencias

- Aguilera**, Begona; **Romero-Ramírez**, Lorenzo; **Abad-Rodríguez**, José; **Corrales**, Guillermo; **Nieto-Sampedro**, Manuel; **Fernández Mayoralas**, Alfonso. *J. Med. Chem.* 1998, *41*, 4599-4606.
- Armspach**, Dominique; **Cattalini**, Marco; **Constable**, Edwin C.; **Housecroft**, Catherine E.; **Phillips**, David. Boron-rich Metallo-dendrimers - Mix-and-match Assembly of Multifunctional Metallosuperomolecules, *Chem. Commun.* 1996, 1823-1824.
- Cheng**, Xiao Hong; **Diele**, Siegmund; **Tschierske**, Carsten. Molecular Design of Liquid-Crystalline Block Molecules: Semifluorinated Pentaerythritol Tetrabenzoates Exhibiting Lamellar, Columnar, and Cubic Mesophases, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, *39*, 592-595.
- Christ**, W. J.; **Asano** O.; **Robidoux**, A. L. C.; **Perez**, M.; **Wang**, Y.; **Dubuc**, G. R.; **Gavin**, W. E.; **Hawkins**, L. D.; **McGuinness**, P. D.; **Mullarkey**, M.; **Lewis**, M. D.; **Kishi**, Y.; **Kawata**, T.; **Bristol**, J. R.; **Rose**, J. R.; **Rosignol**, D. P.; **Kobayashi**, S.; **Hishinuma**, I.; **Kimura**, A.; **Asakawa**, N.; **Karayama**, K.; **Yamatsu**, I. *Science*, 1995, *268*, 80-83.
- Dunn**, T. Jeffrey; **Neumann**, William L.; **Gogic**, Milorad M.; **Woulfe**, Steven R. Versatile Methods for the Synthesis of Differentially Functionalized Pentaerythritol Amine Derivatives, *J. Org. Chem.* 1990, *55*, 6368-6373.
- Farcy**, Nadia; **Muynck**, Hilde De; **Madder**, Annemieke; **Hosten**, Noel; **Clercq**, Pierre J. De. A Pentaerythritol-Based Molecular Scaffold for Solid-Phase Combinatorial Chemistry, *Org. Lett.* 2001, *3*, 4299-4301.
- Hawkins**, L. D.; **Ishizaka**, S. T.; **McGuinness**, P.; **Zhang**, H.; **Gavin**, W.; **DeCosta**, B.; **Meng**, Z.; **Yang**, H.; **Mullarkey**, M.; **Young**, D. W.; **Yang**, H.; **Rosignol**, D. P.; **Nault**, A.; **Rose**, J.; **Przetak**, M.; **Chow**, J. C.; **Gusovsky**, F. J. *Pharmacol. Exp. Ther.* 2002, *300*, 655-661.
- Imoto**, M.; **S. Kusumoto**, T. **Shiba**, E. T. **Rietschel**, C. **Galanos** y O. **Lüderitz**, *Tetrahedron Lett.* 1985, *26*, 907-908.
- Johnson**, D. A.; **Sowell**, C. G.; **Johnson**, C. L.; **Livesay**, M. T.; **Keegan**, D. S.; **Rhodes**, M. J.; **Ulrich**, J. T.; **Ward**, J. R.; **Cantrell**, J. L.; **Brookshire**, V. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999, *9*, 2273-2278.
- Kotani**, S. *et al.*, *Infect. Immun.* 1986, *52*(3), 872-884.
- Kuzdzal**, Scott A.; **Monnig**, Curtis A.; **Newkome**, George R.; **Moorefield**, Charles N. Dendrimer Electrokinetic Capillary Chromatography: Unimolecular Micellar Behaviour of Carboxylic Acid Terminated Cascade Macromolecules, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1994, 2139-2140.
- Kutuzova**, G. D.; **Albrecht**, R. M.; **Erickson**, C. M.; **Qureshi**, N. *J. Immunol.* 2001, *167*, 482-489.
- Lien**, E.; **Chow**, J. C.; **Hawkins**, L. D.; **McGuinness**, P. D.; **Miyake**, K.; **Espeviks**, T.; **Gusovsky**, F.; **Golenbock**, D. T. *J. Biol. Chem.* 2001, *276*, 1873-1880.
- Nantz**, Michael H.; **Nberle**, Alfred M. Pentaerythritol Lipid Derivatives and Nucleic-Acid Complexes, *Patente de EE. UU.*, 2001, 6316421.
- Ranganathan**, Darshan; **Samant**, Manoj P.; **Karle**, Isabella L. Self-Assembling, Cystine-Derived, Fused Nanotubes based on Spirane Architecture: Design, Synthesis, and Crystal Structure of Cystinospiranes., *J. Am. Chem. Soc.* 2001, *123*, 5619-5624.

Rietschel, E. T.; Brade, H.; Holst, O.; Brade, L.; MüllerLoennies, S.; Mamat, U.; Zähringer, U.; Beckmann, R.; Seydel, U.; Brandenburg, K.; Ulmer, A. J.; Mattern, T.; Heine, H.; Schletter, J.; Hauschildt, S.; Loppnow, H.; Schönbeck, U.; Flad, H.-D.; Schade, U. F.; Di Padova, F.; Kusumoto, S.; Schumann, R. R. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996, *216*, 39.

5 **Schromm, A. B.; Brandenburg, K.; Loppnow, H.; Moran, A. P.; Koch, M. H. J.; Rietschel, E. T.; Seydel, U.** *Eur. J. Biochem.* 2000, *267*, 2008.

Seydel, U.; Oikawa, M.; Fukase, K.; Kusumoto, S.; Brendenburg, K. *Eur. J. Biochem.* 2000, *267*, 3032.

10 **Seydel, U.; B. Lindner, H.-W. Wollenveber y E. T. Rietschel,** *Eur. J. Biochem.* 1984, *145*, 505-509.

Takada, H.; Kotani, S. *CRC Critic. Rev. Microbiol.* 1989, *16*, 477-523.

15 **Toefper, Alexander; Kretzschmar, Gerhard; Bartnik, Eckart.** *Tetrahedron Lett.* 1995, *36*, 9161-9164.

Toefper, Alexander; Kretzschmar, Gerhard; Bartnik, Eckart; Seiffge, Dirk. *Patente de EE. UU.* 6136790, 2000.

20 **Wörl, Ralf; Köster, Hubert.** Synthesis of New Liquid Phase Carriers for Use in Large Scale Oligonucleotide Synthesis in Solution, *Tetrahedron*, 1999, 2941-2956.

Zuany-Amorim, C.; Hastewell, J.; Walker, C. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2002, *1*, 797-807.

Stryer, *Biochemistry*, 2ª Ed. W. H. Freeman and Co., Nueva York, p74, 1981.

25 **Christian H. R. Raetz,** *Patente International*, WO 86/05687, 1986.

30 E. Th. **Rietschel, L. Brade, B. Lindner y U. Zähringer**, 1992. Biochemistry of lipopolysaccharides. En: pp.3-41, D. C. **Morrison y J. L. Ryan** (eds.), Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Volumen I, Molecular Biochemistry and Cellular Biology, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.

H. **Takada y S Kotani**, 1992. Structure-function relationships of Lipid-A. En: pp.107-134. *ibid*

35 M. **Imoto, S. Kusumoto, T. Shiba, E. T. Rietschel, C. Galanos y O. Lüderitz,** *Tetrahedron Lett.* 1985, *26*, 907-908. (1985a)

M. **Imoto, H. Yoshimura, N. Sakaguchi, S. Kusumoto, T. Shiba,** *Tetrahedron Lett.* 1985, *26*, 1545-1548. (1985b)

40 E. T. **Rietschel, H.-W. Wollenweber, H. Brade, U. Zähringer, B. Lindner, U. Seydel, H. Bradaczek, G. Barnickel, H. Labishinski y P. Giesbrecht.** 1984. Structure and conformation of the lipid A component of lipopolysaccharides, pp. 187-220. *En* E. R. Rietschel (ed.), Handbook of Endotoxin, vol. 1. Chemistry of endotoxin. Elsevier Science Publishers, Ámsterdam. (1984a)

45 E. T. **Rietschel, H.-W. Wollenweber, R. Russa, H. Brade y J. Zähringer.** *Rev. Infect. Dis.* 1984, *6*, 432-438. (1984b)

U. **Seydel, B. Lindner, H.-W. Wollenweber y E. T. Rietschel,** *Eur. J. Biochem.* 1984, *145*, 505-509.

50 S. M. **Strain, I. M. Armitage, L. Anderson, K. Takayama, N. Qureshi y C. R. H. Raetz.** *J. Biol. Chem.* 1985, *260*, 16089-16098.

H. **Takada, S Kotani,** *CRC Critic. Rev. Microbiol.* 1989, *16*, 477-523.

55 E. **Ribi, K. Amano, J. L. Cantrell, S. M. Schwartzman, R. Parker y K. Takayama,** *Cancer Immunol. Immunother.* 1982, *12*, 91102.

S. **Kotani et al,** *Infect. Immun.* 1986, *52(3)*, 872-884. (1986a)

S. **Kotani et al,** *Infect. Immun.* 1986, *54*, 673. (1986b)

60 M. **Kiso, S. Tanaka, M. Tanahashi, Y. Fujishima, Y. Ogawa y A. Hasagawa,** *Carbohydr. Res.* 1986, *148*, 221.

Y. **Fujishima, K. Kigawa, Y. Ogawa, M. Kiso, A. Hasagawa,** *Carbohydr. Res.* 1987, *167*, 317.

65 D. **Charon, R. Chaby, A. Malinvaud, M. Mondange y L. Szabó,** *Biochemistry*, 1985, *24*, 2736.

W. J. **Christ et al,** *Science*, 1995, *268*, 80-83.

ES 2 343 788 T3

K. Sato *et al*, *Infect. Immun.* 1995, *63*, 2859-2866.

Georges H. Werner y Pierre Jones, *Eur. J. Biochem.* 1996, *242*, 1-19.

5 K. Takayama, N. Qureshi, E. Ribí y J. L. Cantrell, *Rev. Infect. Dis.* 1984, *6*, 439-443.

Keat R. Myerr, Alex T. Trachet, *patente de EE. UU.*, 4912094, 1990.

J. T. Ulrich y K. R. Myers, *Pharm. Biotechnol.* 1995, *6*, 495-524.

10

Martti Vaara, *Science*, 1996, *274* (8), 939-940.

15 H. Russell Onishi, Barbara A. Pelak, Lynn S. Gerckens, Lynn L. Silver, Frederick M. Kahan, Meng-Hsin Chen, Arthur A. Patchett, Susan M. Galloway, Sheryl A. Hyland, Matt S. Anderson, Christian R. H. Raetz, *Science*, 1996, *274* (8), 980-982.

R. C. Goldman, J. O. Capoblanco, C. C. Doran y A. G. Matthyse. *J. Gen. Microbiol.* 1992, *138*: 1527-1533.

R. C. Goldman, C. C. Doran, J. O. Capoblanco. *J. Bacteriol.* 1988, *170*: 2185-2192.

20

25 K. Takayama, N. Qureshi, E. Ribí, J. L. Cannell y K. Amano. 1983. Use of endotoxin in cancer immunotherapy and characterization of its nontoxic but active lipid A components. En: pp. 219-233. L. Anderson y F. M. Unger (eds.), Bacterial lipopolysaccharides, American Chemical Society, Washington, D. C. K. Von Esehen. 1992. Monophosphoryl lipid A and immunotherapy. En: D. C. Morrison y J. L. Ryan (eds.), Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Volumen II Immunopharmacology and pathophysiology, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.

M. P. Fink, *Crit. Care Med.* 1993, *21* Supl.: S32-S39.

30 W. J. Christ, T. Kawata, L. D. Hawkins, S. Kobayashi, O. Asano y D. P. Rossignol. *Patente europea* EP-536969-A2. Dement Publications. Ltd.

35 La cita de documentos aquí no se pretende como una admisión de que cualquiera de los documentos citados aquí sea técnica anterior pertinente o una admisión de que los documentos citados aquí se consideren material para la patentabilidad de cualquiera de las reivindicaciones de la presente solicitud. Todas las declaraciones referidas a la fecha o representación respecto a los contenidos de estos documentos se basan en la información de que dispone el solicitante y no constituye ninguna admisión respecto a la corrección de las fechas o contenidos de estos documentos.

40 Las reivindicaciones adjuntas se deben tratar como recitado no limitante de formas de realización preferidas.

La referencia a pasos de métodos conocidos, pasos de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es en manera alguna una admisión de que cualquier aspecto, descripción o forma de realización de la presente invención se divulgue, enseñe o sugiera en la técnica relevante.

45 La descripción anterior de formas de realización específicas revelará completamente la naturaleza general de la invención que otros pueden, aplicando el conocimiento en la materia (incluyendo los contenidos de las referencias citadas aquí), modificar y/o adaptar fácilmente para varias aplicaciones tales formas de realización específicas, sin experimentación excesiva, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, se pretende que tales adaptaciones y modificaciones estén dentro del significado y gama de equivalentes de las formas de realización divulgadas, basado en la enseñanza y directrices presentadas aquí. Se debe entender que la fraseología o terminología aquí es para el fin de descripción y no de limitar, de modo que la terminología o fraseología de la presente especificación la debe interpretar el experto en la materia a la luz de las enseñanzas y directrices presentadas aquí, en combinación con el conocimiento del experto en la materia.

55 Cualquier descripción de una clase o intervalo como que es útil o preferido en la práctica de la invención se debe considerar una descripción de cualquier subclase (por ejemplo, una clase divulgada con uno o más miembros divulgados omitidos) o subintervalo contenido en la misma, así como una descripción separada de cada miembro o valor individual en dicha clase o intervalo.

60 La descripción de un mínimo y la descripción separada de un máximo, donde el máximo es mayor que el mínimo, implica que en una forma de realización preferida se pueden combinar los dos para formar un intervalo completamente cerrado en los extremos. Si el máximo es igual al mínimo, se implica un valor preferido.

65 La descripción de formas de realización preferidas individualmente se debe considerar una descripción de cualquier combinación posible de tales formas de realización preferidas, excepto para combinaciones que son imposibles (por ejemplo, elecciones mutuamente excluyentes para un elemento de la invención) o que están expresamente excluidas por esta especificación.

ES 2 343 788 T3

El término “que comprende”, como se usa en las reivindicaciones, significa que los elementos posteriormente recitados se requieren, pero que se permite la inclusión de elementos adicionales si no están expresamente excluidos por alguna otra limitación.

5 La palabra “uno”, a menos que se califique de otra manera, implica “uno o más”.

Si una forma de realización de esta invención se divulga en la técnica anterior, la descripción de la invención se debe considerar que incluye la invención como se divulga aquí con tal forma de realización escindida.

10 La invención, como la contempla(n) el/los solicitante(s), incluye pero no está limitada al objeto expuesto en las reivindicaciones adjuntas y actualmente combinaciones no reivindicadas de los mismos. Además incluye tal objeto limitado adicionalmente, si no ya tal, al que supera una o más de las deficiencias divulgadas en la técnica anterior. Hasta el grado que cualquiera de las reivindicaciones invade el objeto divulgado o sugerido por la técnica anterior, el/los solicitante(s) contempla(n) la(s) invención(es) que corresponde(n) a tales reivindicaciones con el objeto invadido
15 escindido.

20

25

30

35

40

45

50

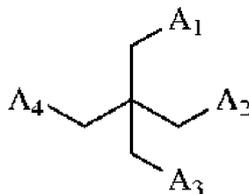
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que un análogo de lípido A de la estructura



donde al menos una de las ramas A1-A4 comprende un grupo fuertemente lipofílico, dicho grupo fuertemente lipofílico se define como un grupo que comprende al menos cinco átomos diferentes de hidrógeno para los que el logP predicho por el algoritmo de Meylan es al menos 3,

donde al menos una de las ramas A1-A4 comprende un equivalente fosfato que comprende un grupo seleccionado del grupo que consiste en $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, $-\text{OS}(=\text{O})(=\text{O})\text{O}-$ y $-\text{OB}(\text{OH})\text{O}-$, y

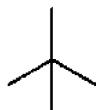
en donde (I) A1 es Y1R1, A2 es Y2R2, A3 es Y3R3 y A4 es Y4R4, cada uno de los espaciadores Y1-Y4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-\text{O}-$, $-\text{S}-$ y $-\text{NH}$ y donde cada uno de R1-R4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})\text{OH}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, $-\text{S}(=\text{O})(=\text{O})\text{OH}$, $-\text{B}(\text{OH})\text{OH}$ o un grupo orgánico, y/o (II) donde al menos uno de tales grupos fuertemente lipofílico que tiene un logP predicho, según el algoritmo de Meylan, de al menos cinco, y donde cada uno de A1-A4 es independientemente un grupo inorgánico u orgánico, o un grupo inorgánico diferente de hidrógeno,

con la condición de que si el compuesto no comprende una unidad de azúcar, al menos un equivalente fosfato comprenda un grupo $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}-$, $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{O}-$ ó $-\text{OB}(\text{OH})\text{O}-$,

donde dicho compuesto no es una molécula inmunoestimulante que comprende al menos una cadena de oligonucleótido que comprende (1) al menos una secuencia de nucleótidos que comprende una pluralidad de nucleótidos, cada nucleótido comprende una nucleobase y por tanto también comprende al menos una unidad de dinucleótido CxG o análogo de la misma, y (2) al menos un grupo lipofílico covalentemente incorporado, en donde dicha unidad CxG se define como un nucleótido que presenta la nucleobase citosina unida directamente a un nucleótido que presenta la nucleobase guanina.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto comprende cero o una unidad de azúcar.

3. El compuesto de la reivindicación 1 ó 2 en el que al menos una de las ramas A1-A4 comprende una unidad de azúcar o un segundo núcleo Pet,



4. El compuesto de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 que comprende una unidad Pet extra.

5. El compuesto de la reivindicación 4 que comprende no más de dos unidades Pet extra.

6. El compuesto de la reivindicación 1 que ni comprende un segundo núcleo Pet ni una unidad de azúcar, donde al menos un equivalente fosfato comprende un grupo seleccionado del grupo que consiste en $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}-$, $-\text{OS}(=\text{O})(=\text{O})\text{O}-$ y $-\text{OB}(\text{OH})\text{O}-$ y el compuesto no comprende ninguna nucleobase.

7. El compuesto de la reivindicación 1 en donde tres de R1-R4 son hidrógeno y, preferiblemente, (i) los tres A1-A4 correspondientes son $-\text{OH}$, o (ii) dos de los A1-A4 correspondientes son $-\text{OH}$ y el otro es $-\text{NH}_2$; en donde, deseablemente, el R1-R4 restante comprende un grupo fuertemente lipofílico.

8. El compuesto de la reivindicación 1 en donde dos de R1-R4 son hidrógeno y, preferiblemente, (i) los dos A1-A4 correspondientes son $-\text{OH}$, o (ii) uno de los A1-A4 correspondientes es $-\text{OH}$ y el otro es $-\text{NH}_2$; en donde, deseablemente, al menos uno, más deseablemente ambos, de los R1-R4 restantes comprende(n) un grupo fuertemente lipofílico.

ES 2 343 788 T3

9. El compuesto de la reivindicación 1 donde uno de R1-R4 es hidrógeno; en donde, deseablemente, al menos uno, más deseablemente todos, de los R1-R4 restantes comprende(n) un grupo fuertemente lipofílico.

5 10. El compuesto de la reivindicación 1 donde ninguno de R1-R4 es hidrógeno; en donde, deseablemente, al menos uno, más deseablemente todos, de los R1-R4 restantes comprende(n) un grupo fuertemente lipofílico.

11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en el que una unidad de azúcar está unida a un núcleo Pet mediante un grupo que comprende un equivalente fosfato.

10 12. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en el que dos núcleos Pet están unidos mediante un grupo que comprende un equivalente fosfato.

13. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en el que al menos un grupo fuertemente lipofílico está unido a una unidad de azúcar que a su vez está unida a un núcleo Pet.

15 14. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 donde cada uno de los espaciadores Y1-Y4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en -O- y -NH-.

20 15. El compuesto de la reivindicación 14 donde (a) cada uno de los espaciadores Y1-Y4 es -O-, o (b) tres de los espaciadores Y1-Y4 son -O- y el espaciador restante es -NH-.

16. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 que proporciona uno o dos equivalentes fosfatos.

25 17. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 donde cada equivalente fosfato es (a) -R'-C(O)OH, donde R' es un grupo alquilo sustituido o sin sustituir de 1-4 carbonos, o (b) se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OB(OH)OR, -OP(O)(OH)OR o -OS(O)(OH)OR, donde R es hidrógeno o un grupo alquilo sustituido o sin sustituir de 1-4 carbonos.

30 18. El compuesto de la reivindicación 17 donde (b) aplica y R es hidrógeno.

19. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde dicho equivalente fosfato comprende -OP(=O)(OH)O- y dicho equivalente fosfato preferiblemente es un grupo fosfono (-OP(=O)(OH)(OH)).

35 20. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde al menos un equivalente fosfato comprende -OS(=O)(=O)O-.

21. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde al menos un equivalente fosfato comprende -OB(OH)O-.

40 22. El compuesto de la reivindicación 17 donde (b) aplica y R es un grupo alquilo sustituido o sin sustituir de 1-4 carbonos; donde,

si R es un grupo sustituido, entonces las sustituciones preferiblemente son -OH o -NH₂; y donde, más preferiblemente, R es CH₂CH₂NH₂.

45 23. El compuesto de la reivindicación 17 donde (a) aplica y, preferiblemente, R' es -CH₂-.

24. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 7-23 que carece de unidad de azúcar pero comprende un segundo núcleo Pet.

50 25. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 7-23 que tiene una unidad de azúcar.

26. El compuesto según la reivindicación 25, cuya unidad de azúcar es una hexosa y/o un azúcar cíclico.

55 27. El compuesto según la reivindicación 25, cuya unidad de azúcar es una piranosa.

28. El compuesto según la reivindicación 25, cuya unidad de azúcar es un amino azúcar.

60 29. El compuesto según la reivindicación 25, cuya unidad de azúcar es una glucopiranosa o una glucosamina.

30. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 en el que se incorpora al menos un equivalente fosfato en la misma rama que comprende dicha unidad de azúcar.

65 31. El compuesto de la reivindicación 30 en que al menos un equivalente fosfato se une a dicha unidad de azúcar.

32. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 25-29 en el que se incorpora al menos un equivalente fosfato en una rama diferente a la que comprende dicha unidad de azúcar.

ES 2 343 788 T3

33. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 25-32 en el que al menos un grupo fuertemente lipofílico está unido a dicha unidad de azúcar.
34. El compuesto de la reivindicación 33 en el que una pluralidad de grupos fuertemente lipofílicos se unen a la unidad de azúcar, uno a cada uno de una pluralidad de carbonos de anillo diferentes de dicha unidad de azúcar.
35. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-34 donde al menos un grupo fuertemente lipofílico comprende al menos una cadena de carbono principal, tal como una, dos o tres cadenas de carbono principales, y en donde, preferiblemente, los grupos fuertemente lipofílicos del compuesto colectivamente proporcionan al menos dos cadenas de carbono principales, tal como tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho cadenas de carbono principales.
36. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-35 donde cada cadena de carbono principal tiene 10-20 carbonos, preferiblemente 12-16 carbonos.
37. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-36 donde las cadenas de carbono principales de los grupos fuertemente lipofílicos colectivamente proporcionan al menos 20 átomos de carbono, tal como al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80 o al menos 90 átomos de carbono.
38. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-37 donde las cadenas de carbono principales de los grupos fuertemente lipofílicos colectivamente proporcionan no más de 90 átomos de carbono, tal como no más de 80, no más de 70 o no más de 60 átomos de carbono.
39. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-38 donde la suma de los logP predichos para los grupos fuertemente lipofílicos es al menos 10, tal como al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50.
40. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-39 donde la suma de los logP predichos para los grupos fuertemente lipofílicos no es más de 60, tal como no más de 50, no más de 40 o no más de 30.
41. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-40 donde cada grupo fuertemente lipofílico está unido al resto del compuesto a través de un enlazador proximal seleccionado del grupo que consiste en -O-, -S- y -NH-; y preferiblemente, en al menos un grupo fuertemente lipofílico, el enlazador proximal se une directamente a una cadena de carbono principal de dicho grupo.
42. El compuesto de la reivindicación 41 donde en al menos un grupo fuertemente lipofílico, el grupo comprende un enlazador distal que no es una cadena de carbono principal, el enlazador proximal está unido al enlazador distal y el enlazador distal está unido al menos a una cadena de carbono principal;
- donde preferiblemente, el enlazador distal consiste en dos o más elementos independientemente seleccionados del grupo que consiste en alquilo de 1-5 átomos de carbono, -O-, -S-, -C(=O)-, -C(=S)-, -NH- y -N<, pero el/los átomo(s) del enlazador distal unido(s) directamente a cadena(s) de carbono principal(es) del grupo no es/son átomo(s) de carbono;
- donde, más preferiblemente, el enlazador distal es al menos trivalente.
43. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-42 donde al menos un grupo fuertemente lipofílico se une a través de un enlazador al carbono anomérico de la unidad de azúcar.
44. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-42 donde al menos un grupo fuertemente lipofílico se une a través de un enlazador al carbono de anillo de la unidad de azúcar, diferente del carbono anomérico, adyacente al heteroátomo del anillo.
45. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-42 donde al menos un grupo fuertemente lipofílico se une a través de un enlazador a un carbono de anillo de la unidad de azúcar no adyacente al heteroátomo.
46. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-42 donde al menos un grupo fuertemente lipofílico se une a través de un enlazador a un carbono de la unidad de azúcar diferente de un carbono de anillo.
47. El compuesto de las reivindicaciones 1-46 donde al menos una cadena de carbono principal empieza con -C(=O)-.
48. El compuesto de las reivindicaciones 1-47 donde al menos una cadena de carbono principal es una cadena alquílica.
49. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-48 donde al menos una cadena de carbono principal presenta un doble o triple enlace.
50. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-49 donde al menos una cadena de carbono principal está hidroxilada.

ES 2 343 788 T3

51. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-50 donde, en al menos un grupo fuertemente lipofílico, se suministra una cadena de carbono principal secundaria;

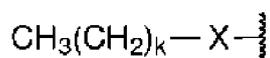
5 donde, preferiblemente, la cadena de carbono principal secundaria está -O-unida a una cadena de carbono principal primaria;

donde, más preferiblemente, la cadena de carbono principal secundaria está unida al carbono 3 de la cadena de carbono principal primaria.

10 52. El compuesto de la reivindicación 51 donde, en al menos un grupo fuertemente lipofílico, se proporciona una cadena de carbono principal terciaria.

15 53. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-52 donde al menos un grupo fuertemente lipofílico se selecciona del grupo que consiste en

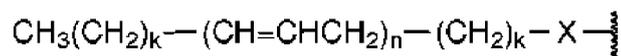
(i)



20

donde X es -CO- o -CH₂-, k es un número entero 4-30;

25 (ii)

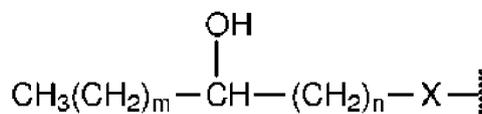


30

donde n es un número entero 0-6, k es un número entero 0-30 y 2k+3n es un número entero 4-30;

(iii)

35

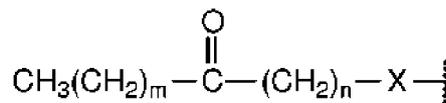


40

donde m y n son números enteros (0-6 para n y 0-30 para m) y m+n+1 es 4-30;

(iv)

45

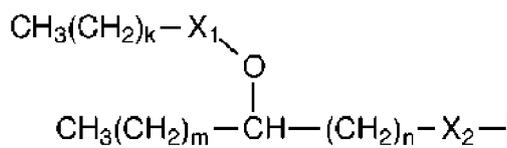


50

donde m+n+1 es 4-30;

(v)

55



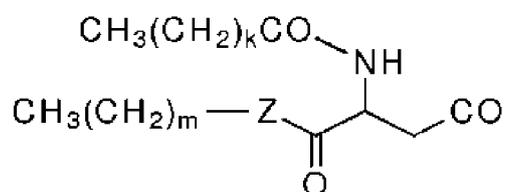
60

donde X₁ y X₂ son independientemente -CO- o -CH₂- y m+n+k+1 es 4-30;

65

(vi)

5



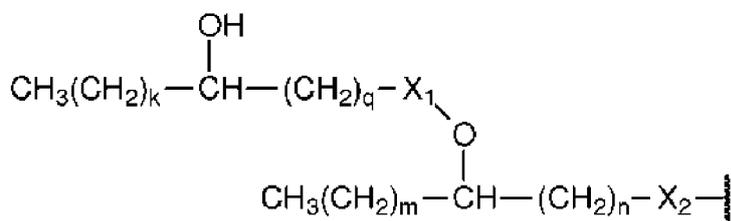
10

donde Z es -NH- o -O- y k+m+2 es 4-30;

15

(vii)

20



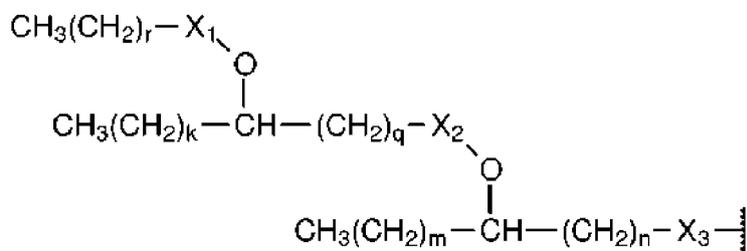
25

donde q es un número entero 0-6 y k+q+m+n es 4-30; y

30

(viii)

35



40

45

donde X₁, X₂ y X₃ son independientemente -CO- o -CH₂-, r es un número entero 0-6 y r+k+q+m+n es 5-30;

50

y donde, preferiblemente, todos los grupos fuertemente lipofílicos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en las estructuras (i)-(viii).

55

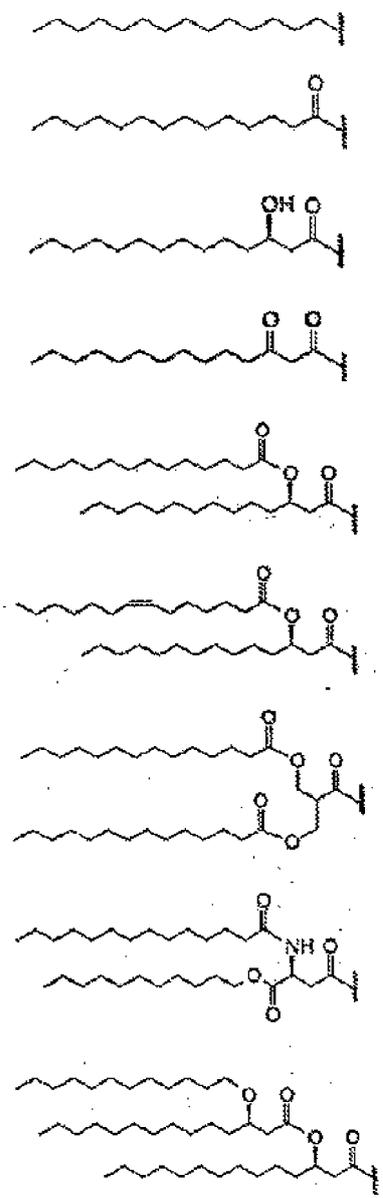
60

65

ES 2 343 788 T3

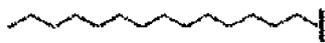
54. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-53 donde al menos un grupo fuertemente lipofílico se selecciona del grupo que consiste en las estructuras

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



y donde preferiblemente todos los grupos fuertemente lipofílicos se seleccionan, independientemente, del grupo que consiste en

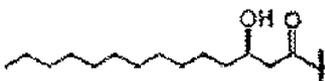
5



10



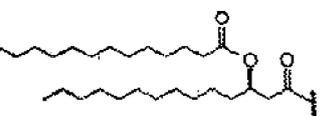
15



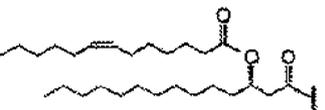
20



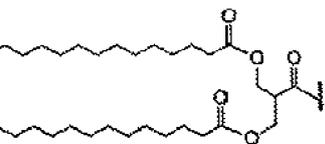
25



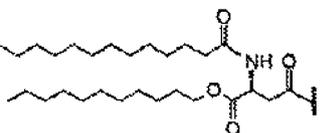
30



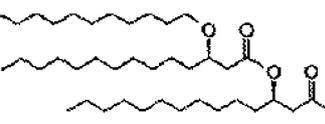
35



40



45

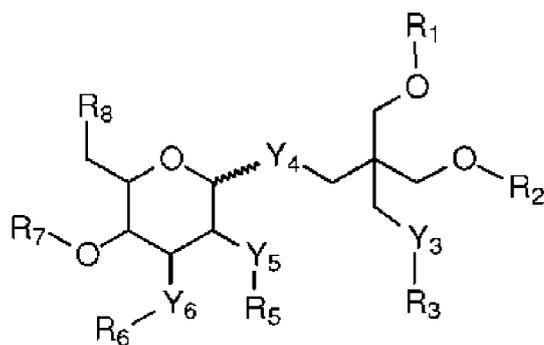


55. El compuesto de la reivindicación 1 en el que todos los grupos fuertemente lipofílicos son alifáticos.

50

56. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la siguiente estructura

55

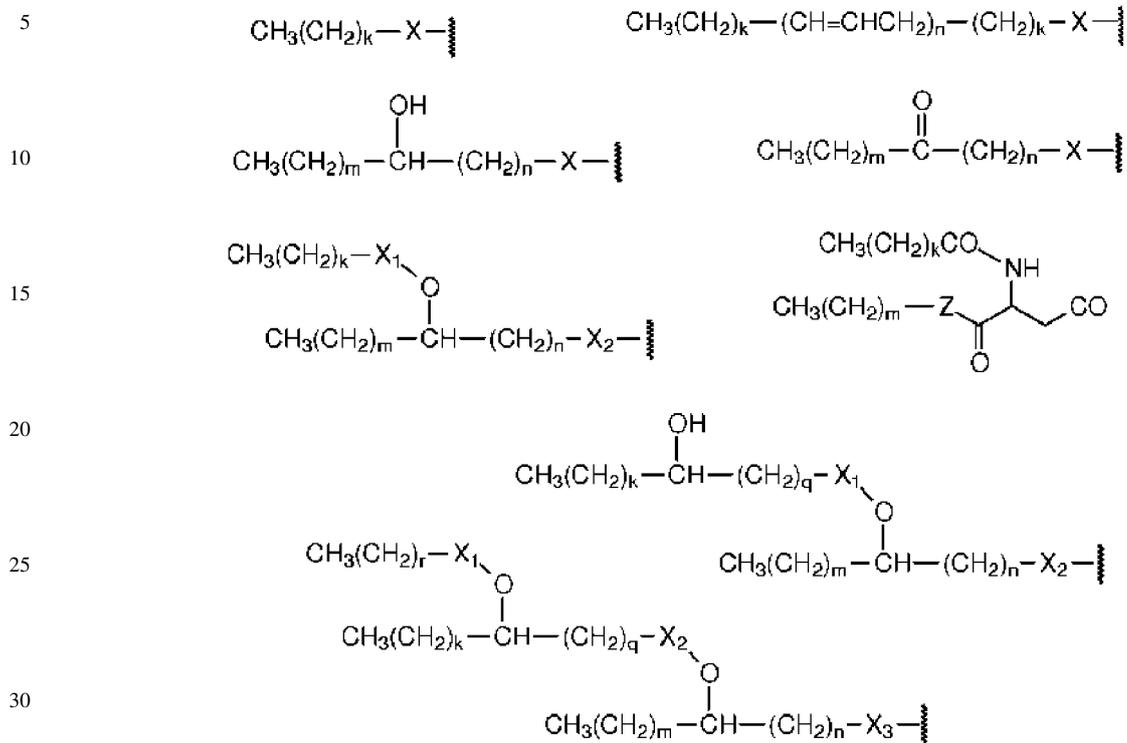


65

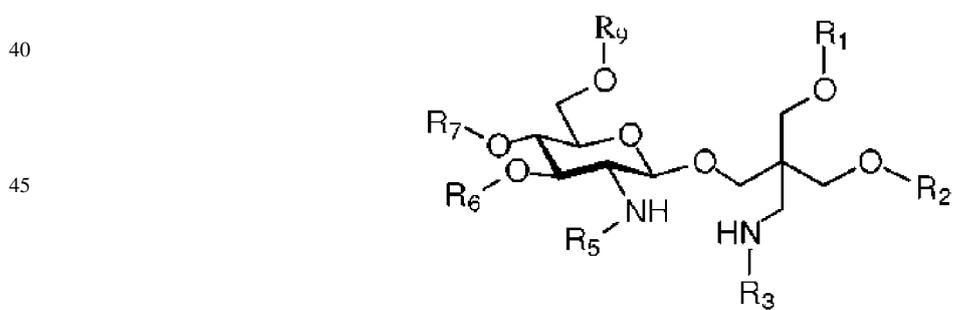
en donde el enlace glucosídico es α o β ; Y_3 , Y_5 e Y_6 son independientemente -O- o -NH-; Y_4 es -O- o -S-;

ES 2 343 788 T3

R₁, R₃, R₅ y R₆ son independientemente hidrógeno o un grupo lipofílico seleccionado del grupo que consiste en



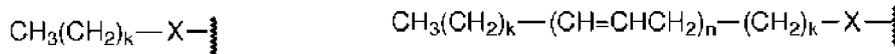
35 57. El compuesto de la reivindicación 56 donde la estructura se define adicionalmente como la siguiente



ES 2 343 788 T3

en donde R₁, R₃, R₅ y R₆ son independientemente hidrógeno o un grupo lipofílico seleccionado del grupo que consiste en

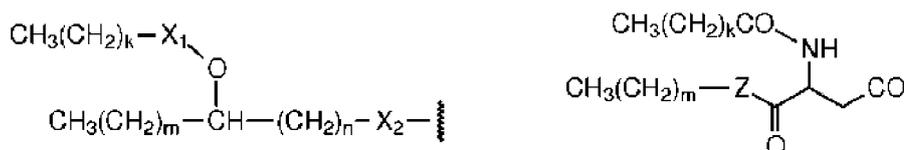
5



10

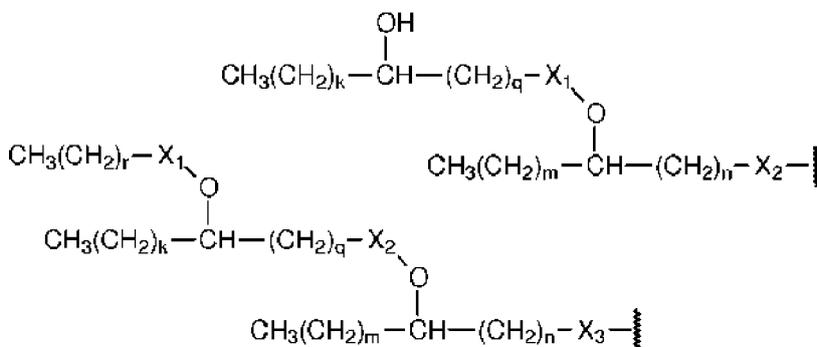


15



20

25



35

en donde X, X₁, X₂ y X₃ son independientemente -CO- o CH₂-; Z es -NH- o -O-; k, m y r son independientemente un número entero de 0 a 30 inclusive, n y q son independientemente un número entero de 0 a 6 inclusive;

40

al menos uno de R₁, R₃, R₅ y R₆ no es hidrógeno;

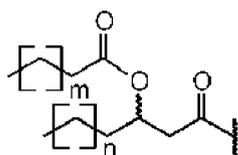
R₂ y R₇ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -P(O)(OH)₂, -SO₃H, -P(O)(OH)(OCH₂CH₂NH₂) y -CH₂COOH; y

45

R₉ es H o un grupo alquilo o acilo de 1 a 10 carbonos de longitud.

58. El compuesto de la reivindicación 57 en donde R₁ y R₉ son hidrógeno; R₂ es un hidrógeno o el grupo fosfona -P(O)(OH)₂; R₇ es el grupo fosfona -P(O)(OH)₂; y R₃, R₅ y R₆ son el mismo o diferentes grupos acilo de la siguiente estructura

50



55

60

en donde m y n se eligen independientemente de un número entero entre 6 y 10 inclusivo.

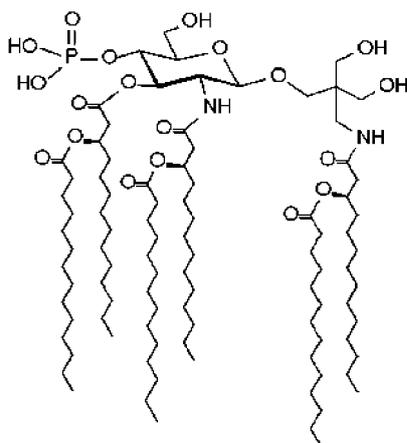
59. El compuesto de la reivindicación 58 donde R₃, R₅ y R₆ son idénticos.

65

ES 2 343 788 T3

60. El compuesto de la reivindicación 59 que tiene la siguiente estructura

5



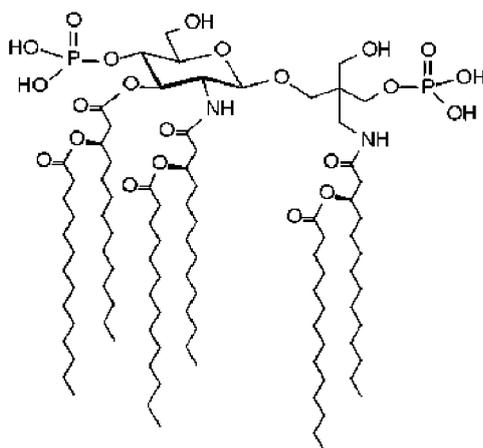
10

15

20

61. El compuesto de la reivindicación 59 que tiene la siguiente estructura

25



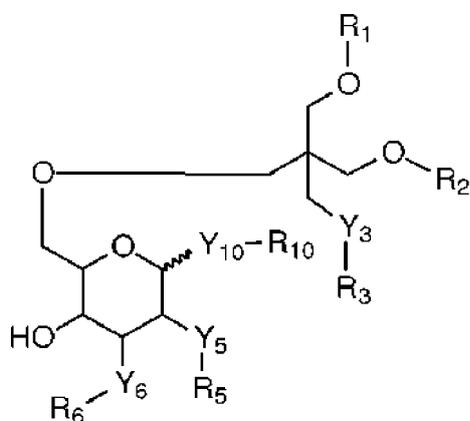
30

35

40

62. Un compuesto según la reivindicación 1 definido por la siguiente estructura:

45



50

55

60

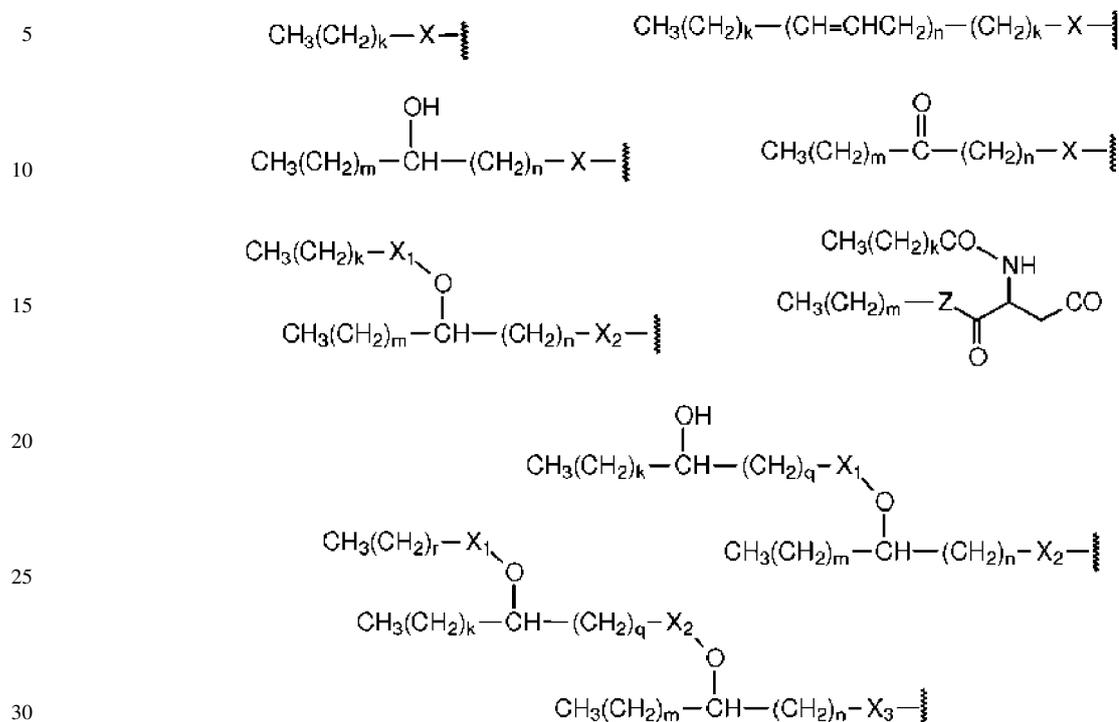
en donde Y₃, Y₅ e Y₆ son independientemente -O- o -NH-;

65

Y₁₀ se selecciona del grupo que consiste en -O-, -NH- y -S-;

ES 2 343 788 T3

R₁, R₃, R₅ y R₆ son independientemente hidrógeno o un grupo lipofílico seleccionado del grupo que consiste en



35 en donde X, X₁, X₂ y X₃ son independientemente CO o CH₂; Z es NH u O; k, m y r son independientemente un número entero de 0 a 30 inclusive, n y q son independientemente un número entero de 0 a 6 inclusive;

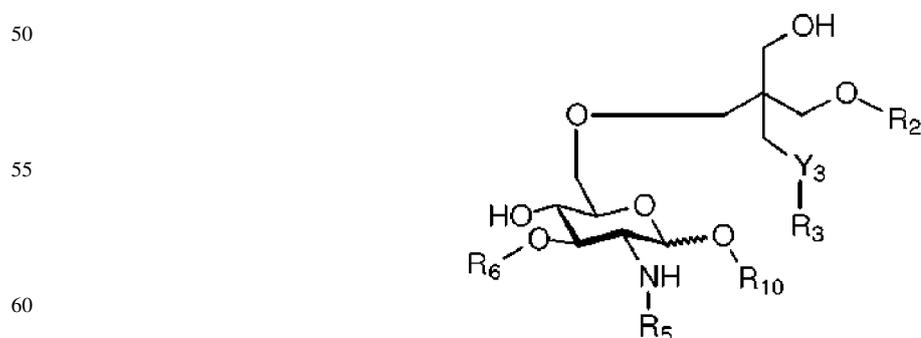
y al menos uno de R₁, R₃, R₅ y R₆ no es hidrógeno;

40 R₂ se selecciona del grupo que consiste en H, -P(O)(OH)₂, -SO₃H, -P(O)(OH)(OCH₂CH₂NH₂) y -CH₂COOH; y

R₁₀ se selecciona del grupo que consiste en H, -P(O)(OH)₂, -SO₃H, -P(O)(OH)(OCH₂CH₂NH₂), -CH₂COOH y un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono de longitud,

45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

63. Un compuesto de la reivindicación 62 donde la estructura se define adicionalmente como la siguiente

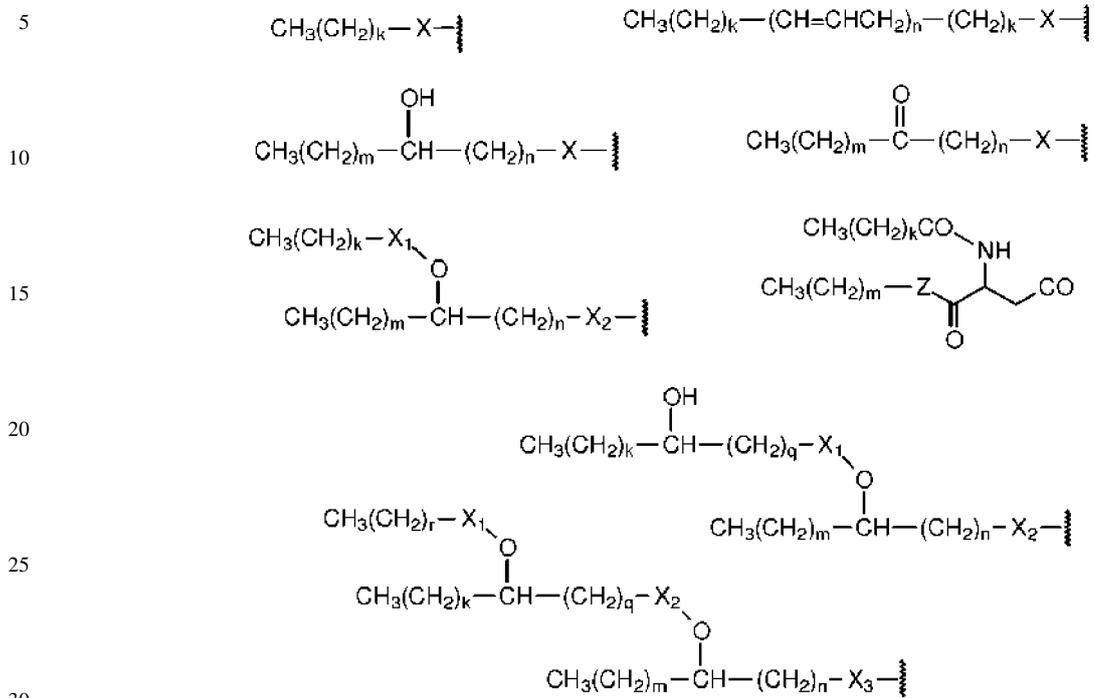


65 en donde R₂ y R₁₀ son independientemente hidrógeno o un grupo fosfónico (-P(O)(OH)₂), y al menos uno de ellos es el grupo fosfónico;

Y₃ es -O- o -NH-;

ES 2 343 788 T3

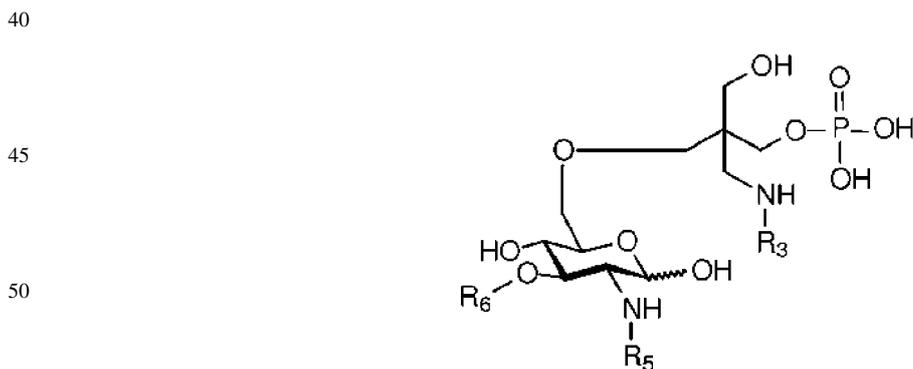
R₃, R₅ y R₆ son independientemente hidrógeno o un grupo lipofílico seleccionado del grupo que consiste en



en donde X, X₁, X₂ y X₃ son independientemente CO o CH₂; Z es NH u O; k, m y r son independientemente un número entero de 0 a 30 inclusive, n y q son independientemente un número entero de 0 a 6 inclusive;

y al menos uno de R₃, R₅ y R₆ no es hidrógeno.

64. El compuesto de la reivindicación 63 donde la estructura se define adicionalmente como la siguiente



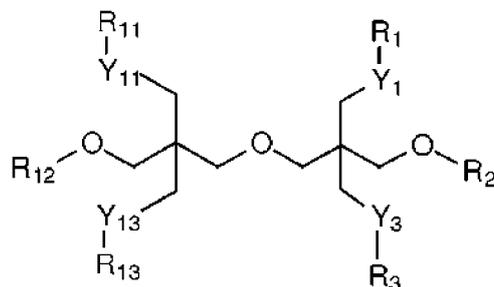
en donde R₃, R₅ y R₆ son el mismo o diferente(s) grupo(s) de sustitución de la siguiente estructura



en donde m y n se eligen independientemente de un número entero entre 6 a 10 inclusive.

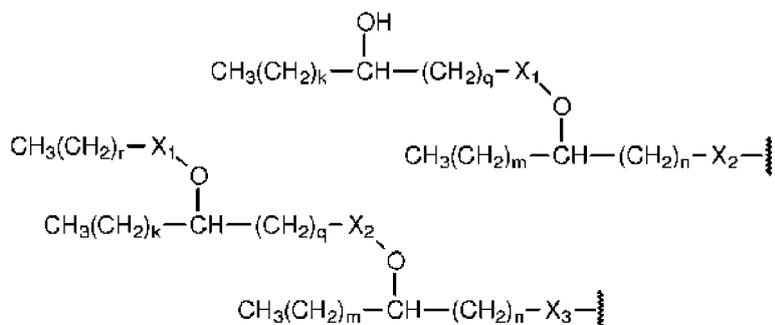
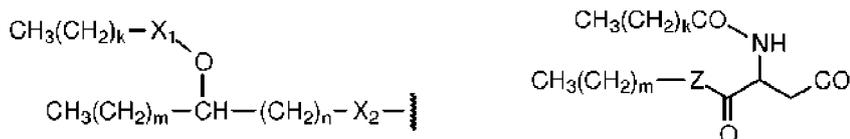
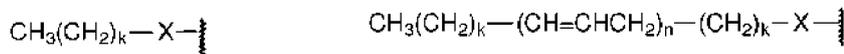
ES 2 343 788 T3

65. El compuesto de la reivindicación 1, definido por la siguiente estructura



en donde Y₁, Y₃, Y₁₁ e Y₁₃ se eligen independientemente del grupo que consiste en -O-, -NH- y -S-

R₁, R₃, R₁₁ y R₁₃ son independientemente hidrógeno o un grupo lipofílico seleccionado del grupo que consiste en



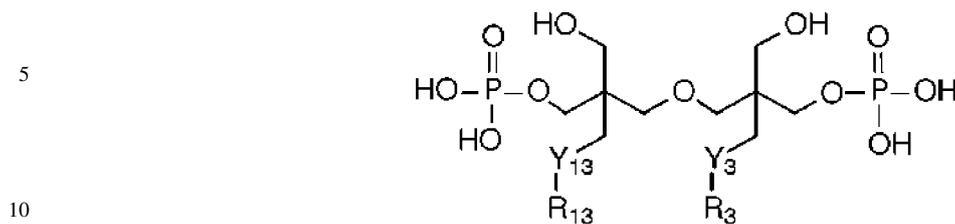
en donde X, X₁, X₂ y X₃ son independientemente -CO- o CH₂-; Z es -NH- u -O-; k, m y r son independientemente un número entero de 0 a 30 inclusive, n y q son independientemente un número entero de 0 a 6 inclusive; y al menos uno de R₁, R₃, R₁₁ y R₁₃ no es hidrógeno;

R₂ y R₁₂ se eligen independientemente del grupo que consiste en H, -P(O)(OH)₂, -SO₃H, -P(O)(OH)(OCH₂CH₂NH₂) y -CH₂COOH; y al menos uno de R₂ y R₁₂ no es hidrógeno, o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

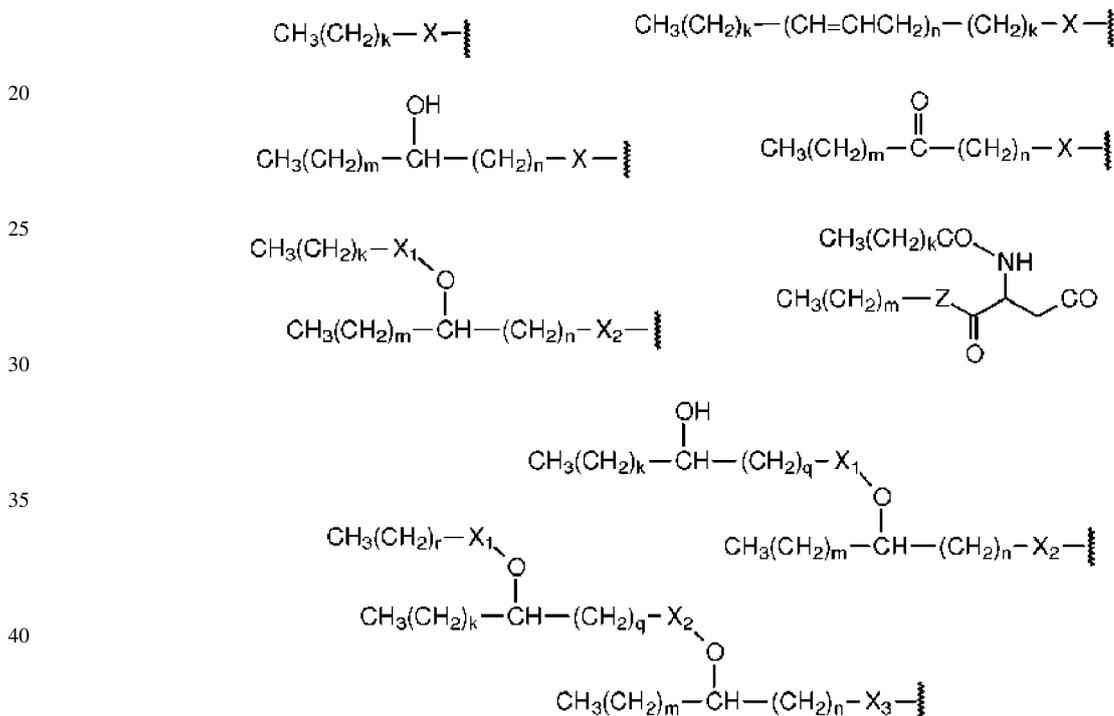
ES 2 343 788 T3

66. Un compuesto de la reivindicación 65 donde la estructura se define adicionalmente por la siguiente



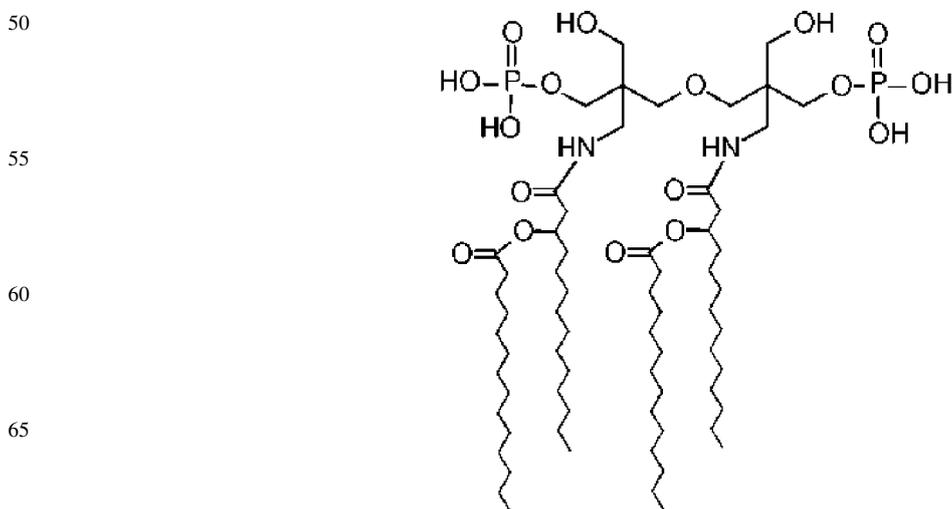
en donde Y₃ e Y₁₃ son independientemente -O- o -NH-;

15 R₃ y R₁₃ son el mismo grupo de sustitución y son un grupo fuertemente lipofílico seleccionado del grupo que consiste en:



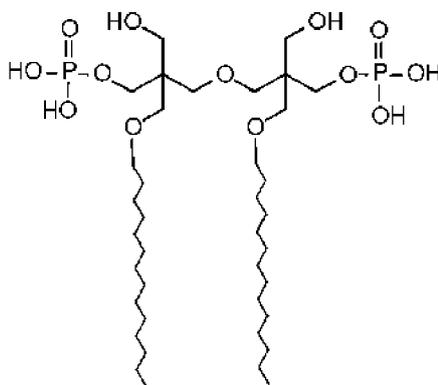
45 en donde X, X₁, X₂ y X₃ son independientemente CO o CH₂; Z es NH u O; k, m y r son independientemente un número entero de 0 a 30 inclusive, n y q son independientemente un número entero de 0 a 6 inclusive.

67. El compuesto de la reivindicación 66 que tiene la siguiente estructura



ES 2 343 788 T3

68. El compuesto de la reivindicación 67 que tiene la siguiente estructura



20 69. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 en donde dicho grupo fuertemente lipofílico tiene un logP predicho, por el algoritmo de Meylan, de al menos 5.

70. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 en donde dicho grupo fuertemente lipofílico tiene un logP predicho, por el algoritmo de Meylan, de al menos 6.

25 71. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 en donde dicho grupo fuertemente lipofílico tiene un logP predicho, por el algoritmo de Meylan, de al menos 7.

72. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 en donde dicho grupo fuertemente lipofílico tiene un logP predicho, por el algoritmo de Meylan, de al menos 8.

30 73. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 en donde dicho grupo fuertemente lipofílico tiene un logP predicho, por el algoritmo de Meylan, de al menos 9.

35 74. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 en donde dicho grupo fuertemente lipofílico tiene un logP predicho, por el algoritmo de Meylan, de al menos 10.

40 75. Uso del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-74 que tiene actividad inmunoestimulante en la fabricación de una composición para la estimulación del sistema inmune de un sujeto mamífero.

76. El uso de la reivindicación 75 donde la composición comprende además un inmunógeno.

77. El uso de las reivindicaciones 75 o 76 en el que la composición es una formulación liposomal.

45 78. Uso del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-74 que tiene actividad antagonista de lípido A en la fabricación de una composición para la inhibición de una actividad adversa de lípido A en un sujeto mamífero.

50

55

60

65

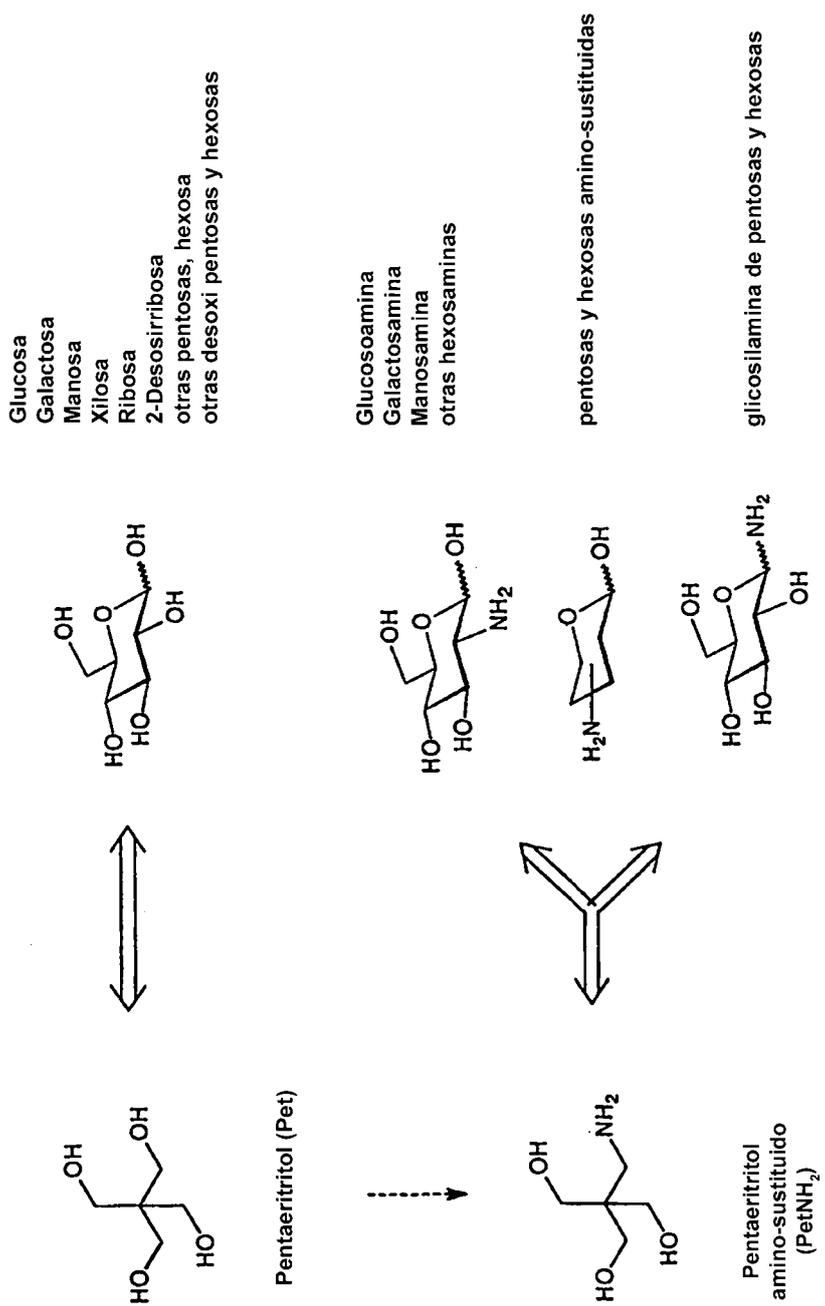


FIG. 1 Pentaeritritol (Pet) y pentaeritritol amino-sustituído (PetNH₂), imitadores estructurales versátiles de monosacáridos

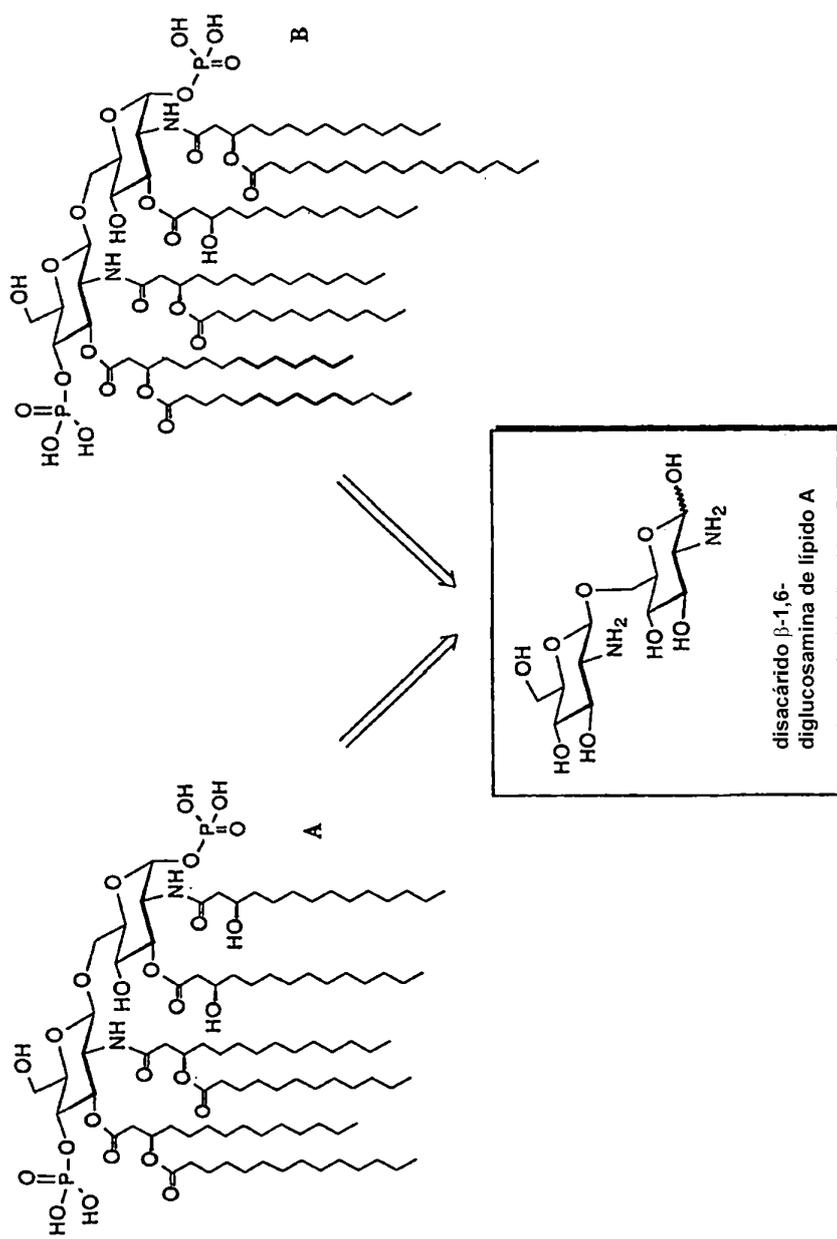


FIG. 2 Ejemplos de estructuras de lípido A natural, A de *E. coli* B de la bacteria *Salmonella*

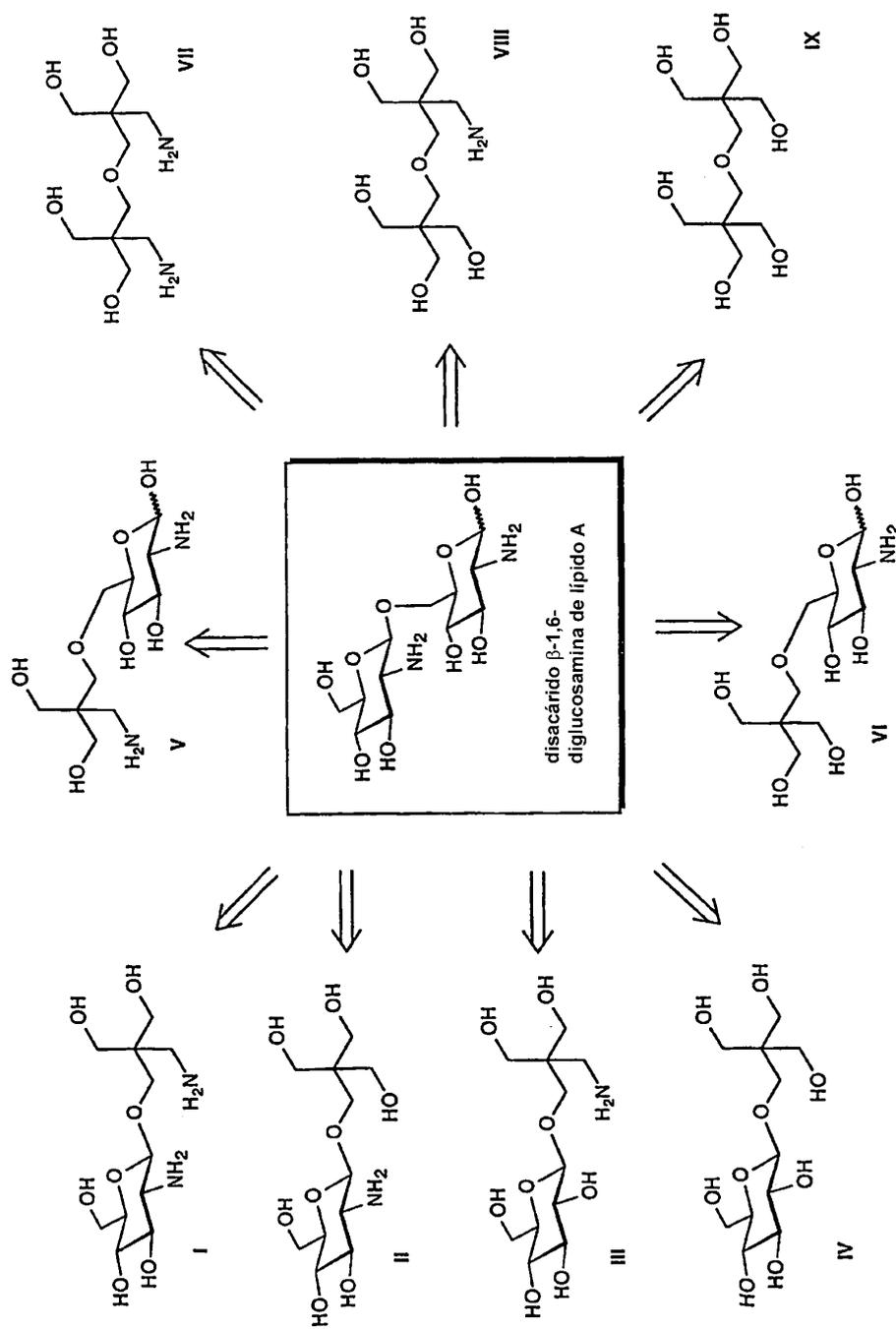


FIG. 3 Limitadores estructurales basados en pentaeritritol (Pet) y dipentaeritritol (di-Pet) del disacárido de lípido A β -1,6-diglucosamina

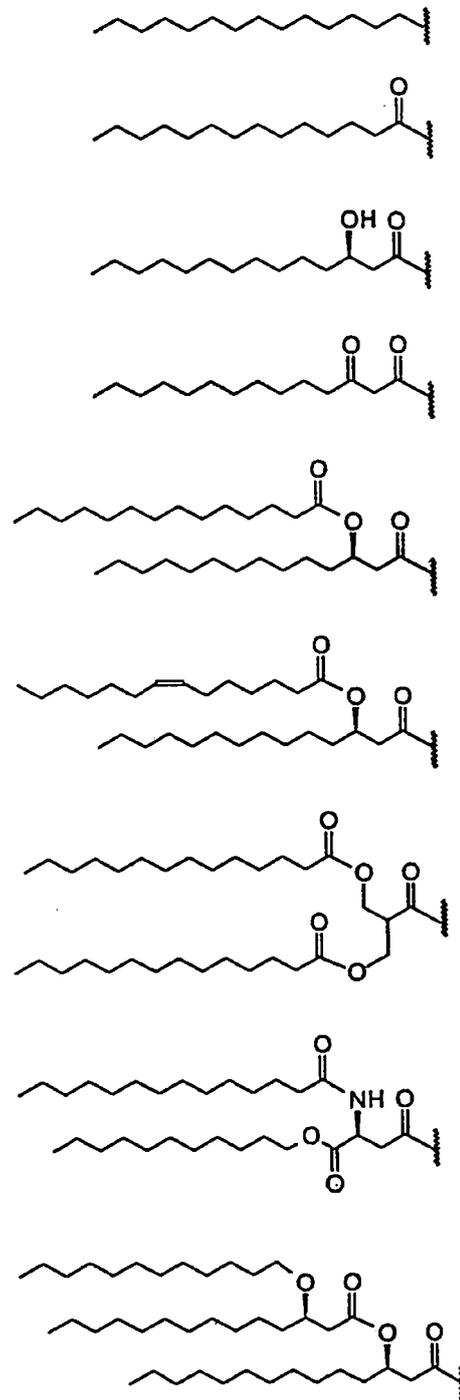


FIG. 4 Ejemplos de estructuras lipídicas que se pueden incorporar en moléculas de lípido A

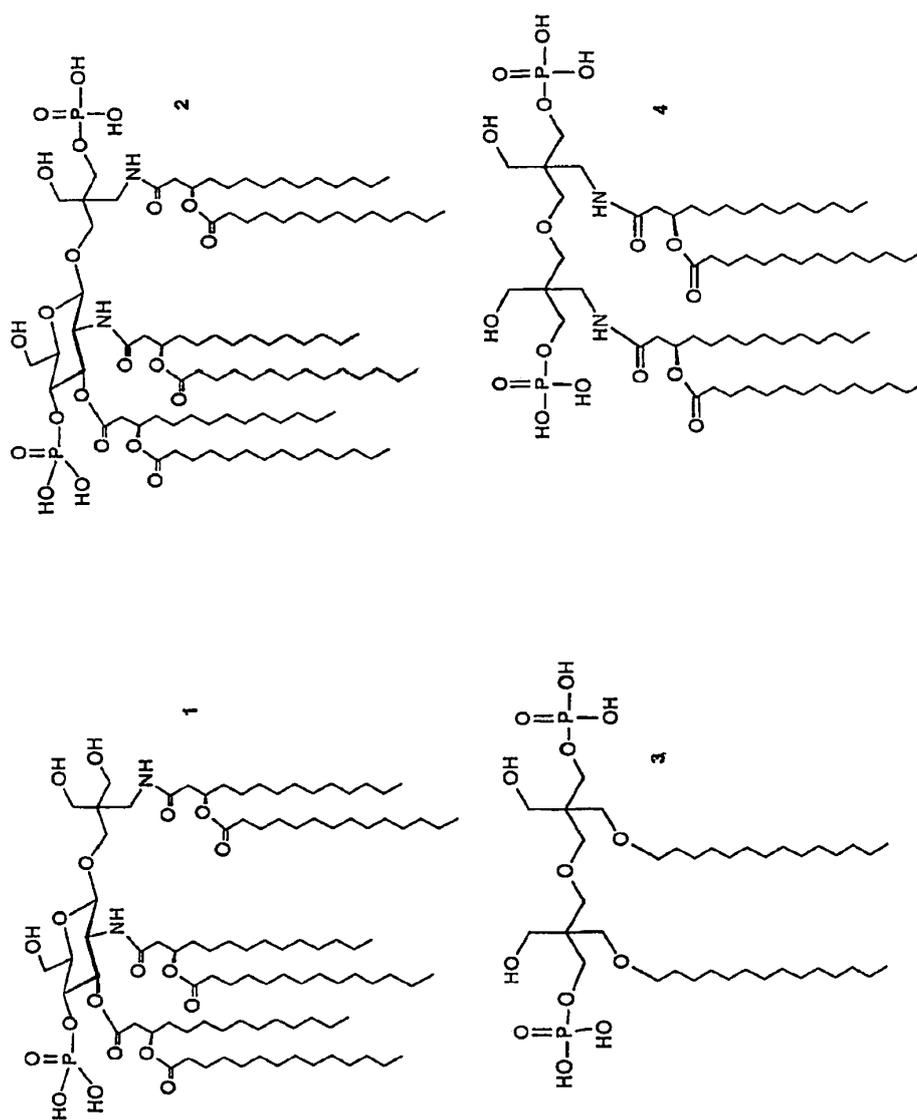


FIG. 5 Ejemplos de imitadores de lípido A derivados de Pet (1-4) preparados en la divulgación de esta invención

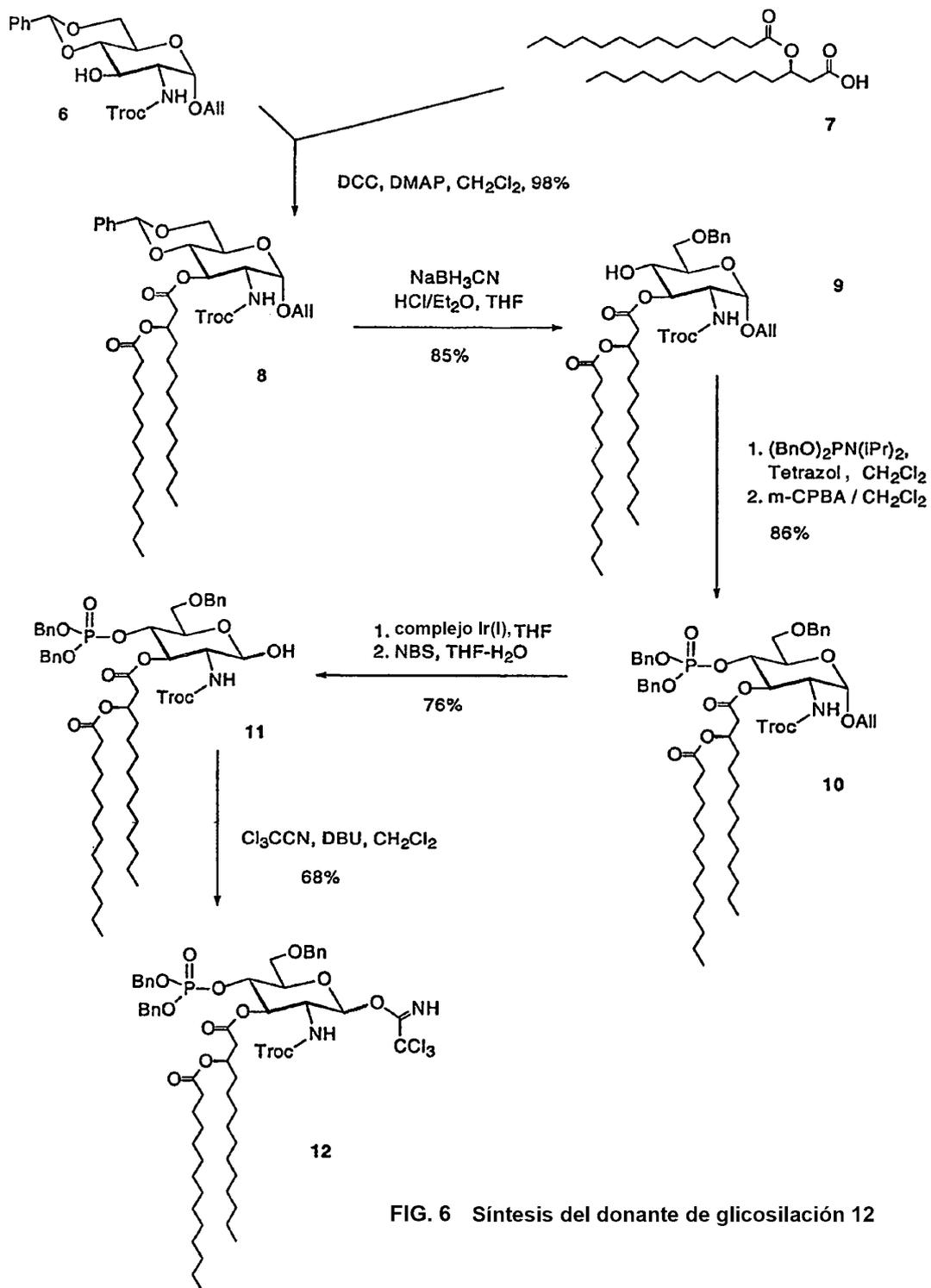


FIG. 6 Síntesis del donante de glicosilación 12

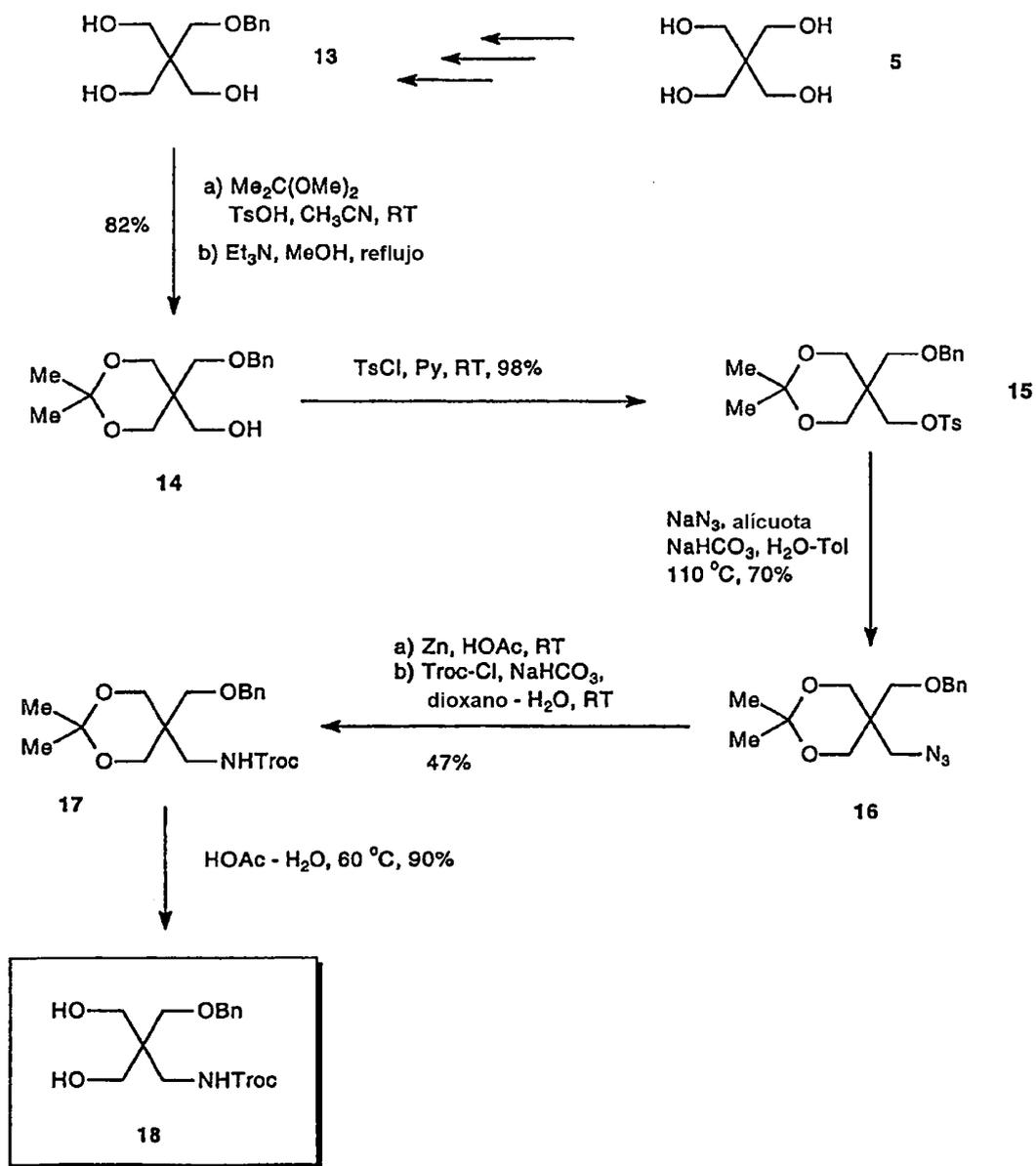


FIG. 7 Preparación del aceptor de glicosilación 18

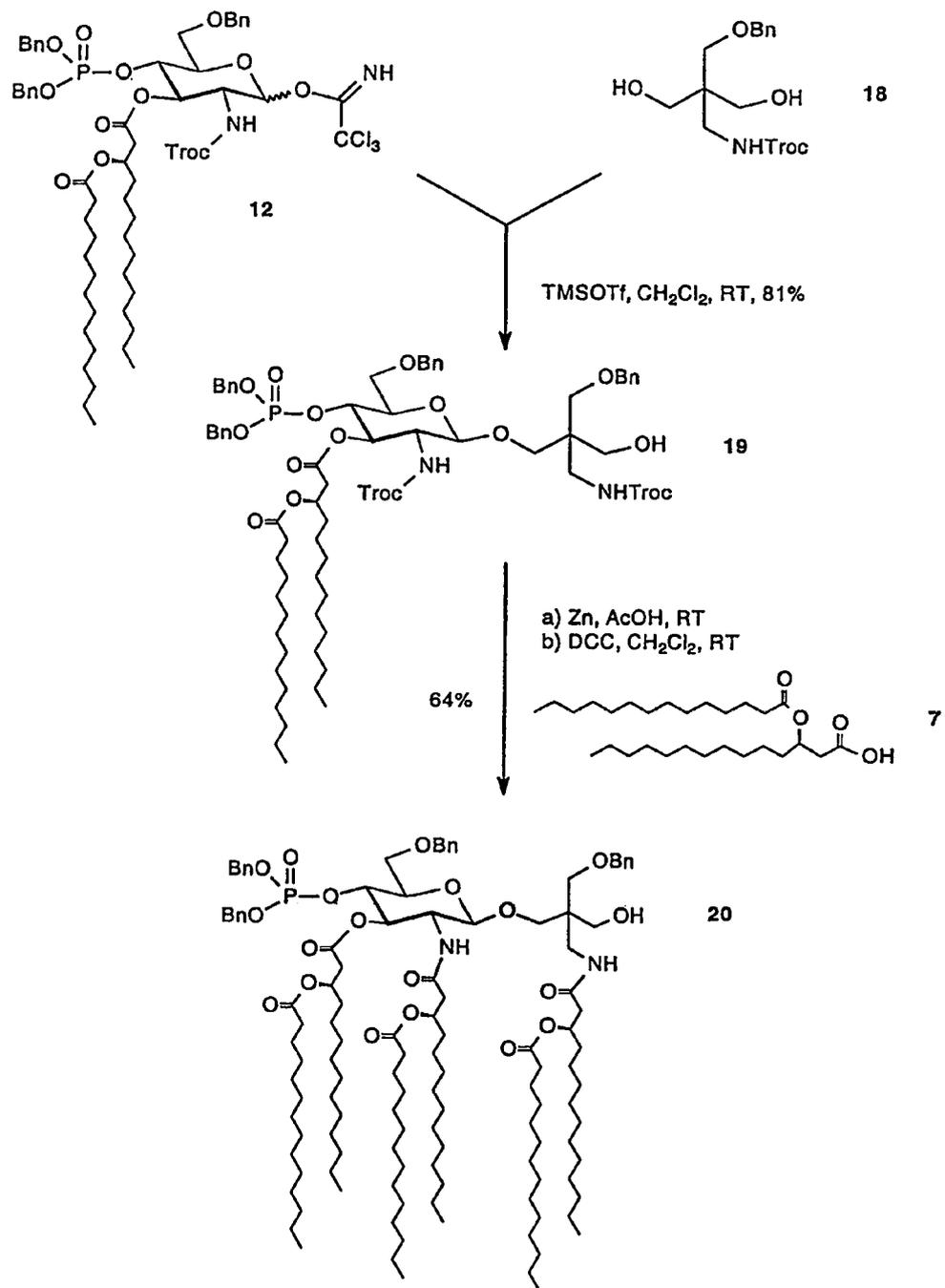


FIG. 8 Síntesis del intermedio 20

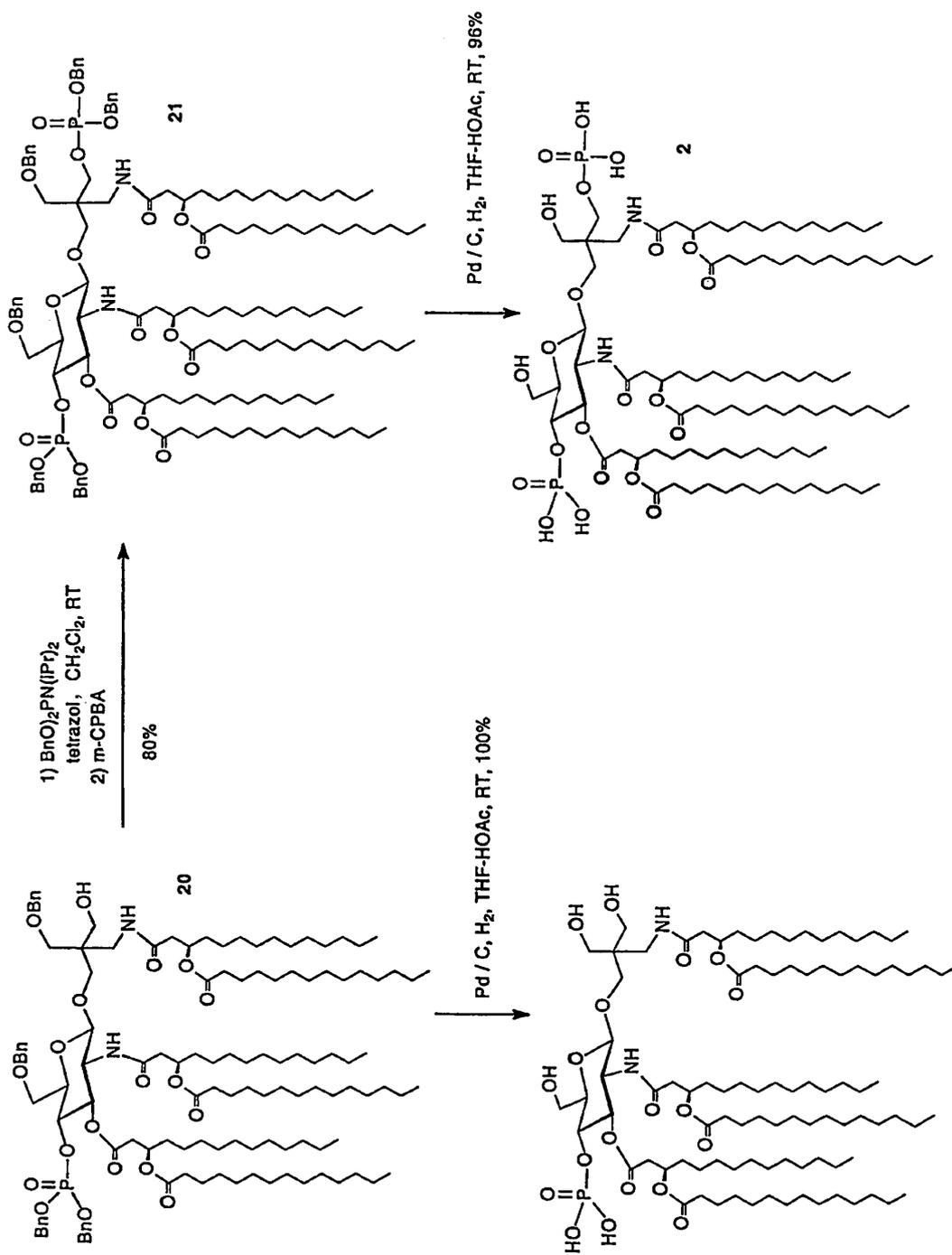


FIG. 9 Síntesis de los imitadores de lípido A basados en Pet 1 y 2

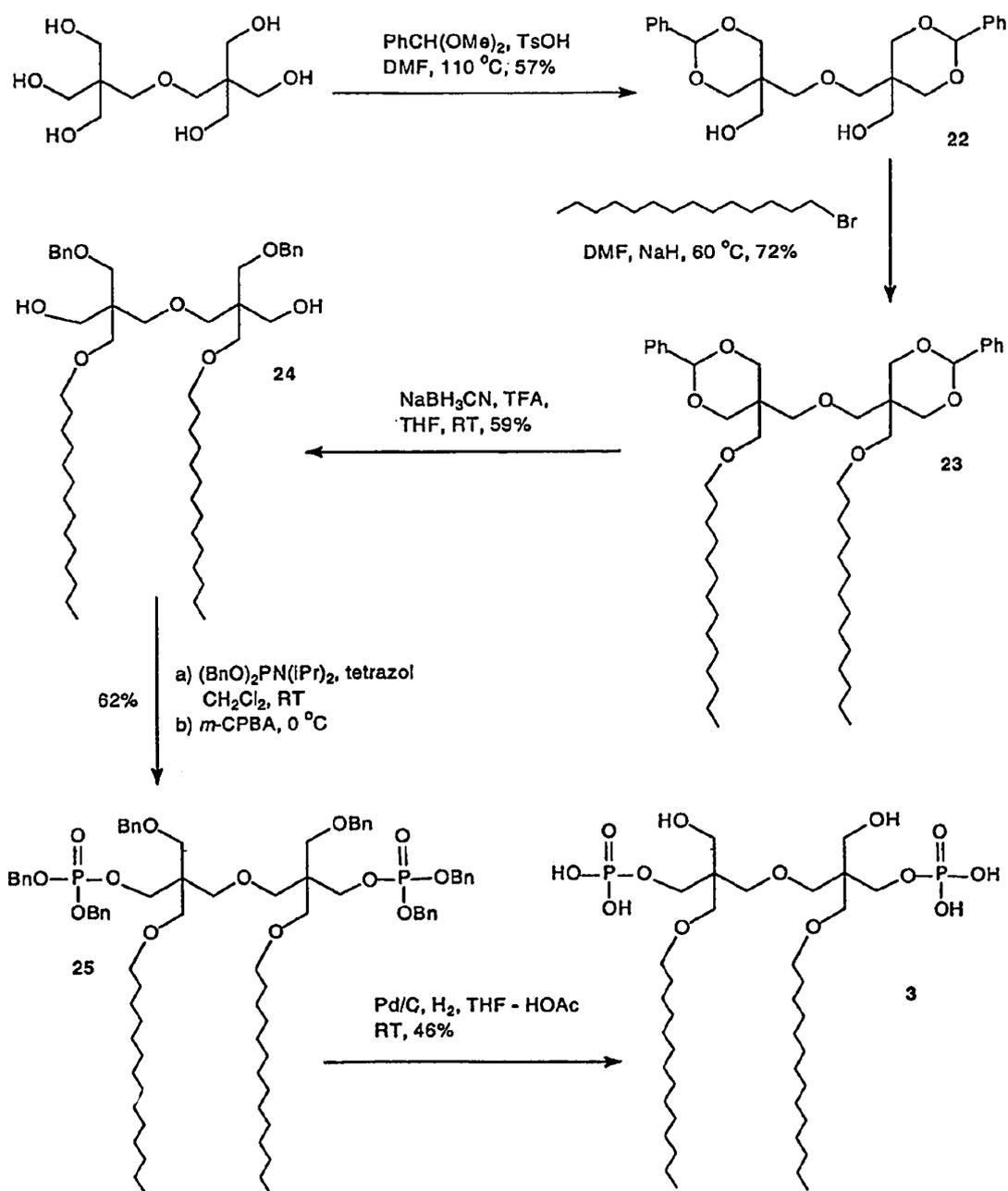


FIG. 10 Síntesis del imitador de lípido A derivado de di-Pet 3

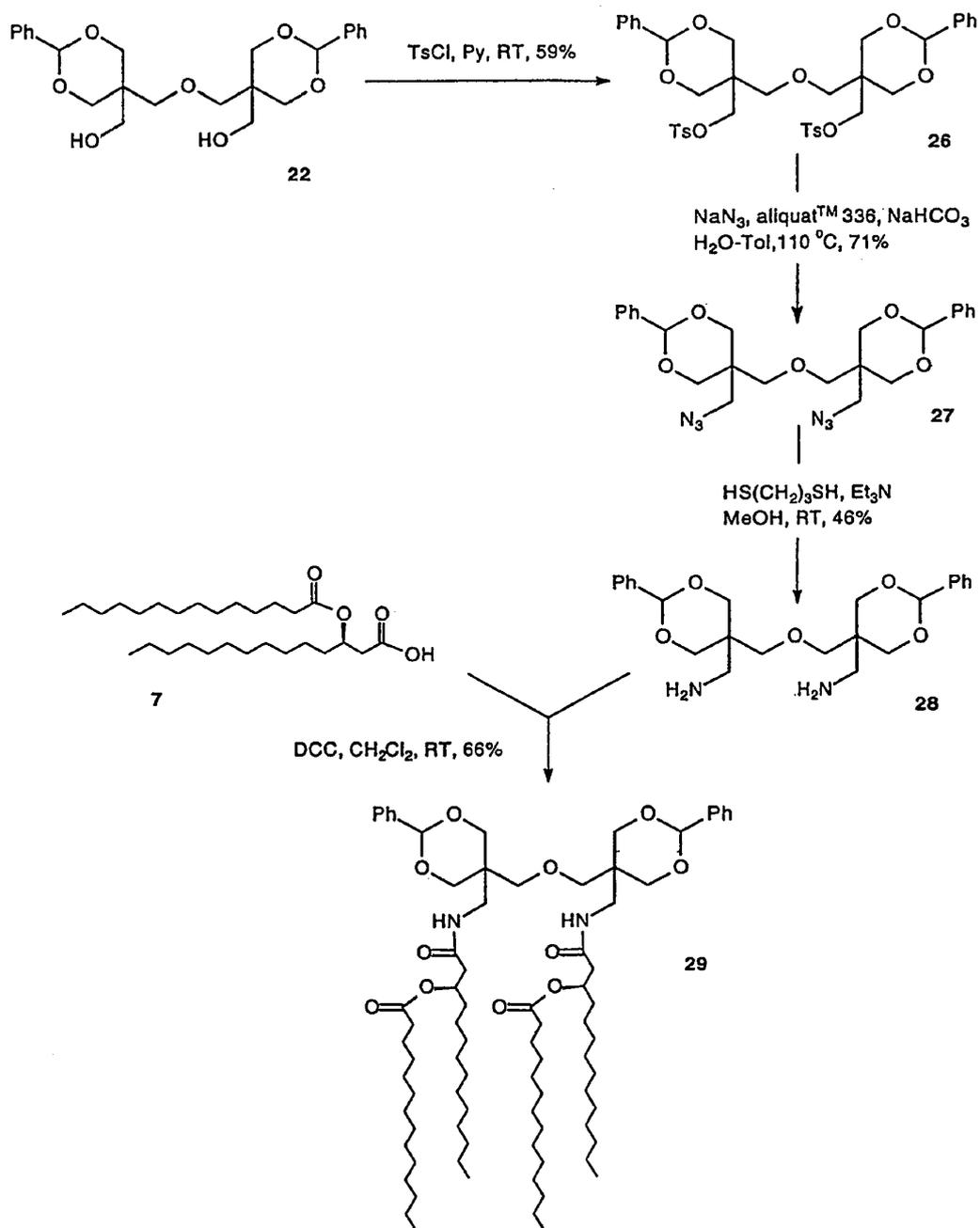


FIG. 11 Síntesis del intermedio de lípido A derivado de di-Pet 29

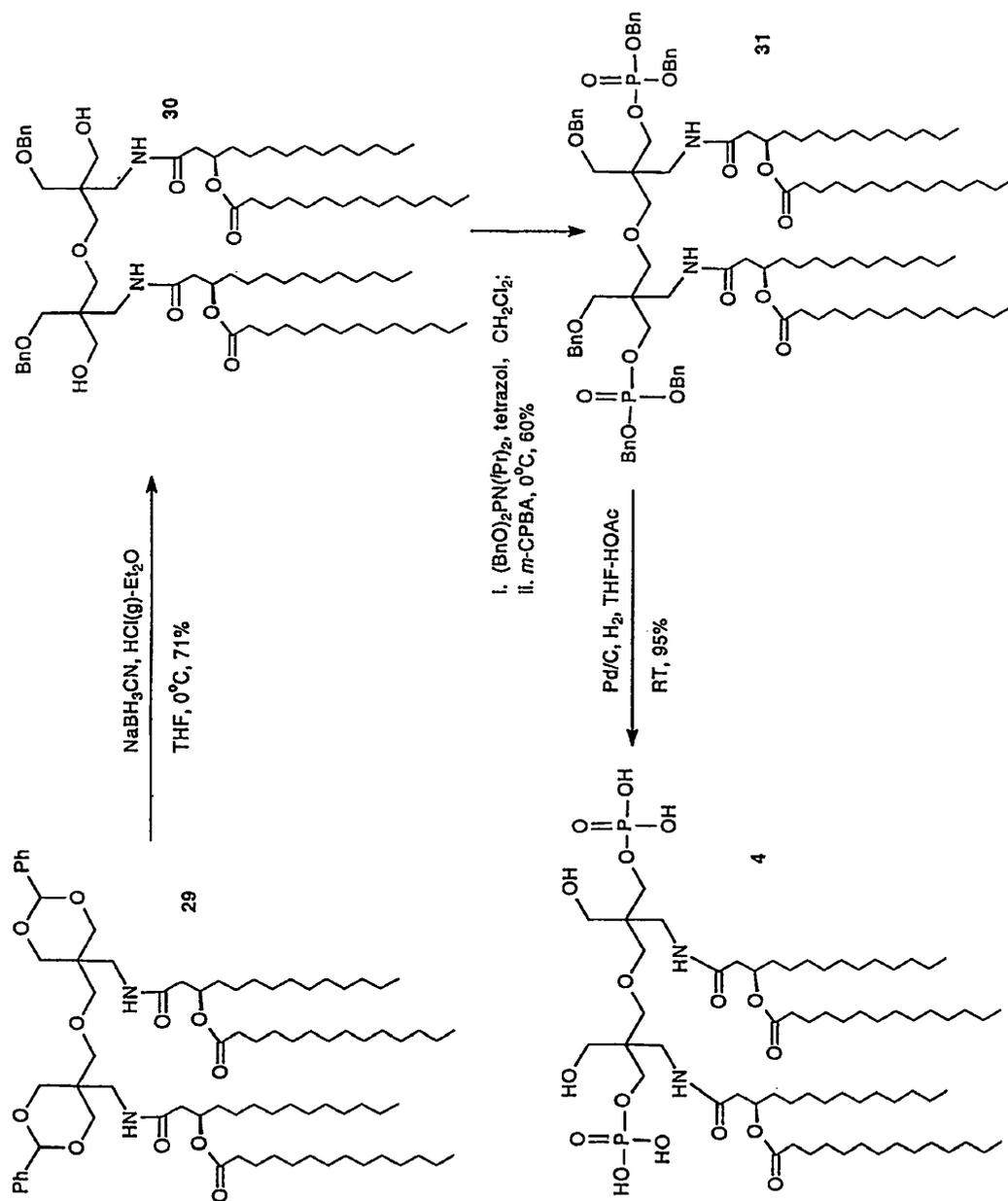


FIG. 12 Síntesis del imitador de lípido A basado en di-Pet 4

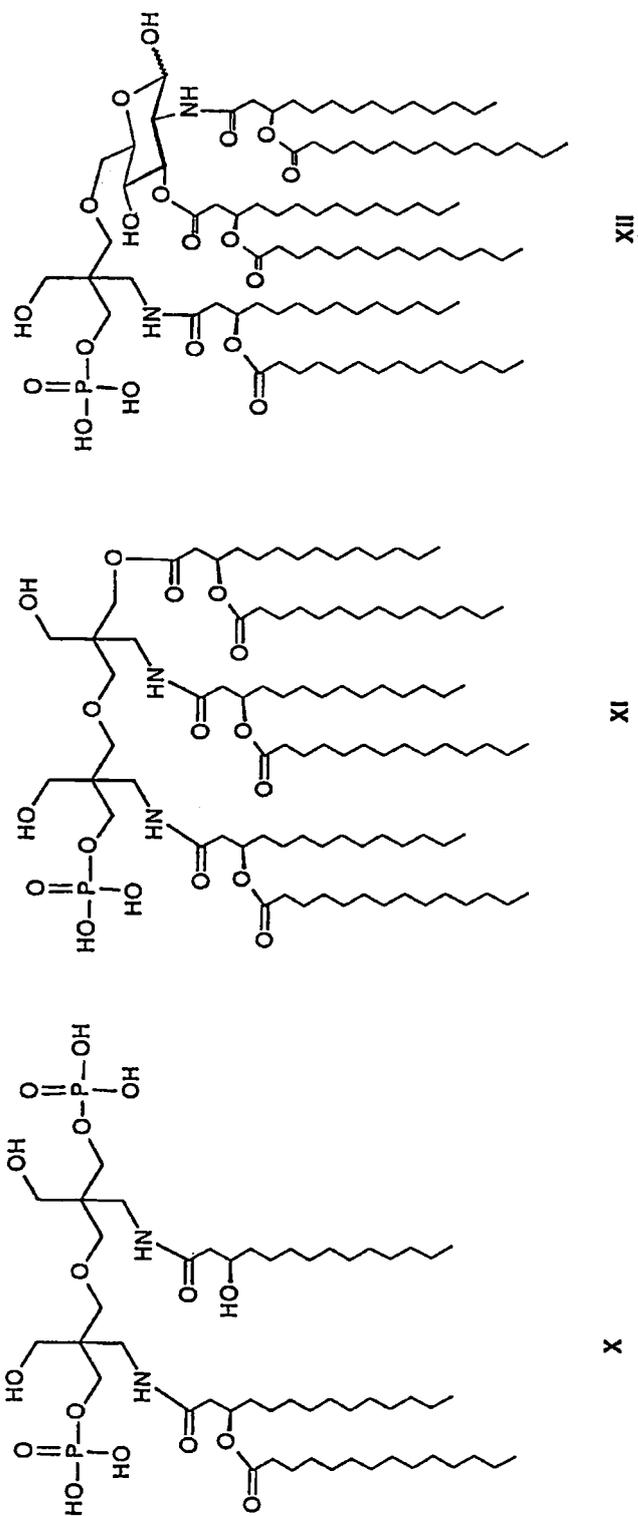
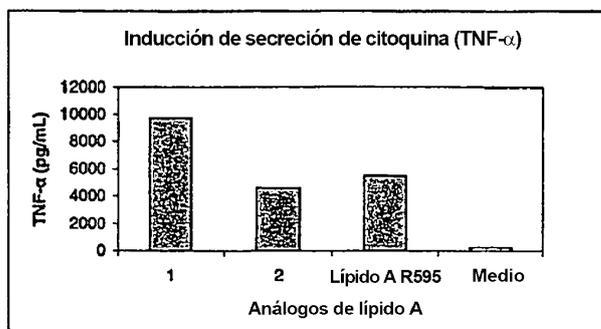
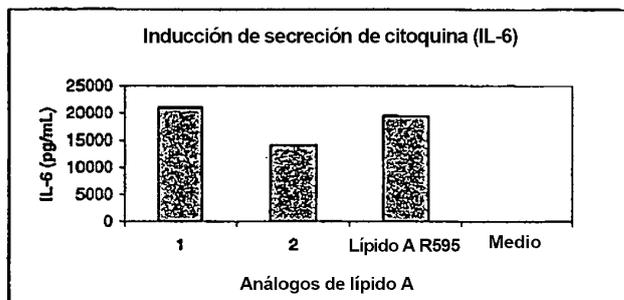


FIG. 13 Algunos ejemplos más de imitadores de lípido A derivados de Pet

(a)



(b)



(c)

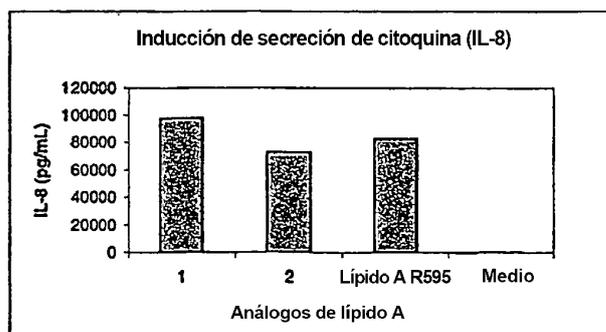


FIG. 14 Patrón de secreción de citoquinas in vitro de células adherentes humanas activadas con imitador sintético de lípido A 1, 2 y lípido A R595. Lípido A R595 es un producto natural aislado de *Salmonella minnesota*, R595 (Avanti Polar Lipids, Inc.). (a) secreción de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , pg/mL); (b) secreción de IL-6 (pg/mL); (c) secreción de IL-8 (pg/mL)

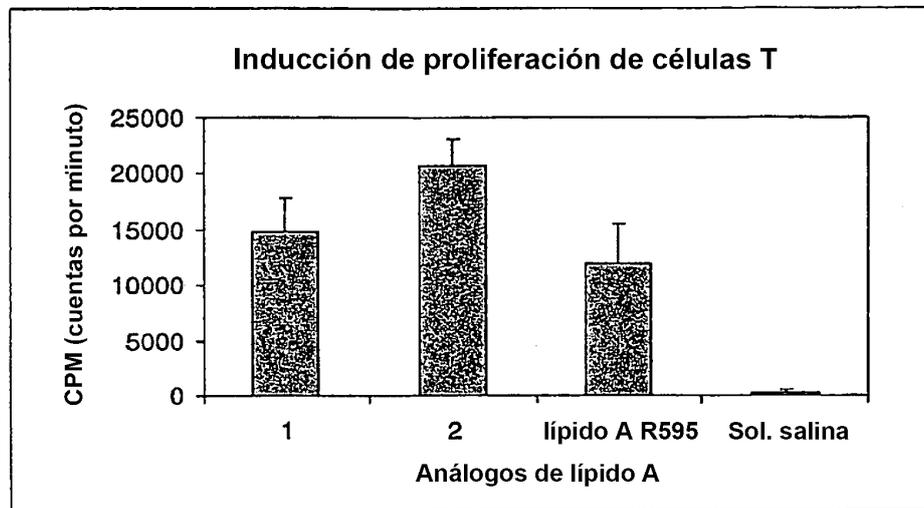


FIG. 15 Respuesta proliferativa de células T específica de antígeno en ratones C57BL/6 inmunizados con la vacuna liposomal BLP25 que contiene análogo de lípido A. La vacuna liposomal BLP25 contiene un lipopéptido 25-mero derivado de MUC1 como antígeno tumoral e imitador sintético de lípido A 1, 2 o lípido A R595 como adyuvante.

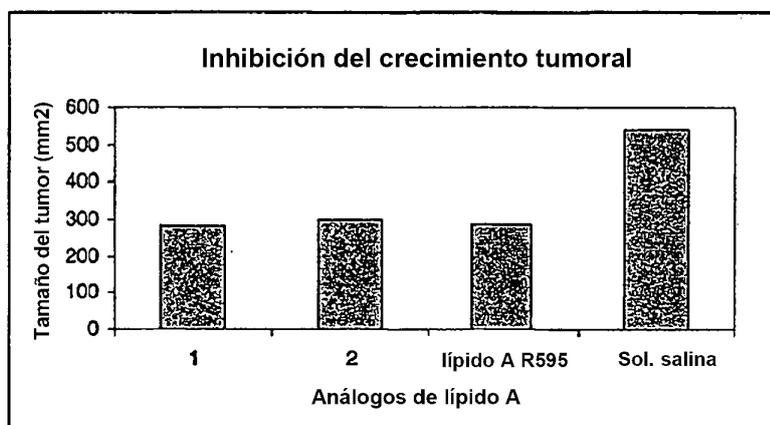


FIG. 16 Inmunoterapia activa específica de ratones que tienen tumor MC-38 MUC1 inmunizados por vía intradérmica con la vacuna liposomal BLP25 que contiene análogos de lípido A. La vacuna liposomal BLP25 contiene un lipopéptido 25-mero derivado de MUC1 como antígeno tumoral e imitador sintético de lípido A 1, 2 o lípido A R595 como adyuvante. Los ratones se provocaron con el tumor el día 0 y se inmunizaron el día 7, 14 y 21. El día 34 se midieron los diámetros del tumor (longitud & anchura) y el tamaño del tumor se expresó como mm² (longitud x anchura).

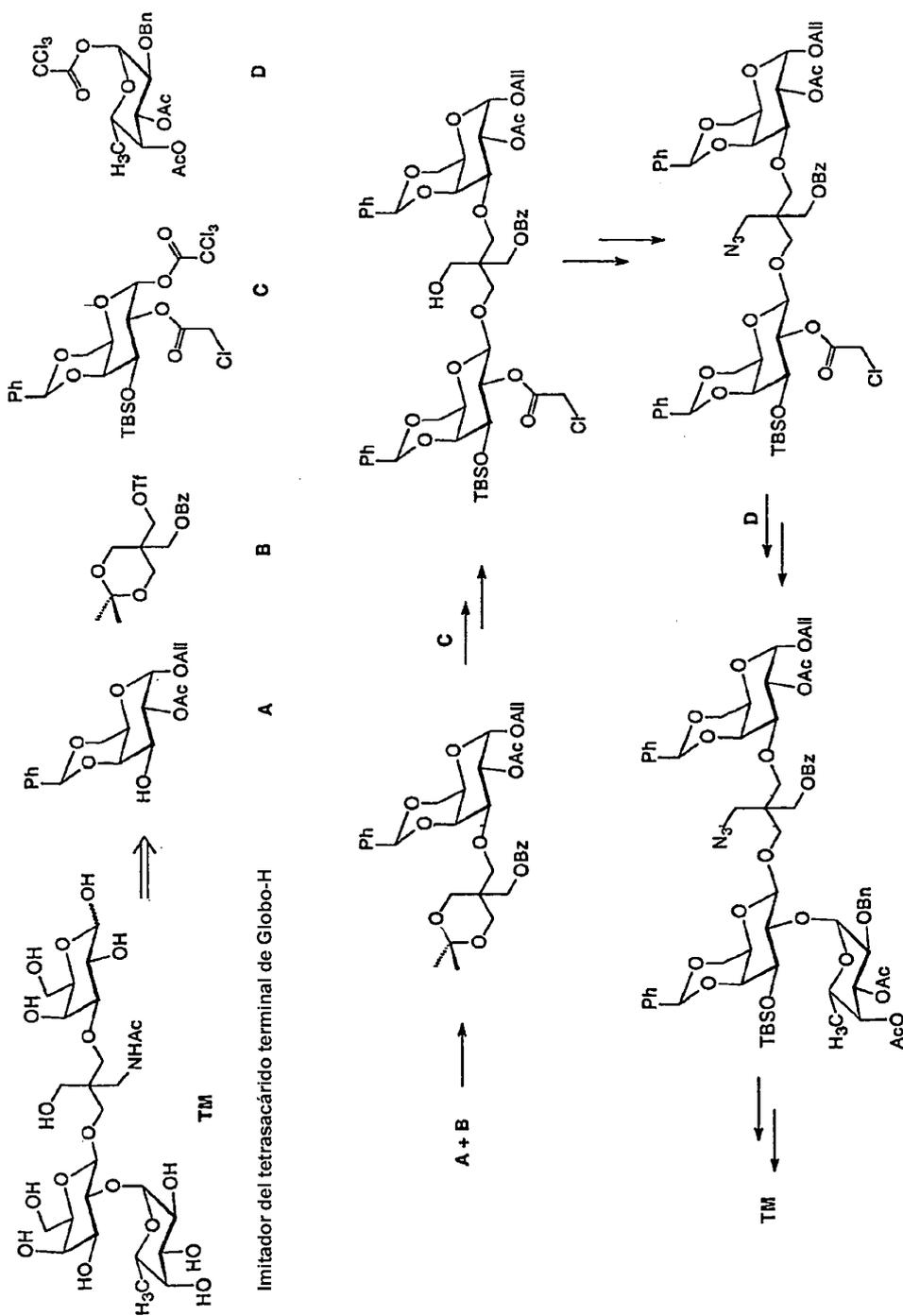
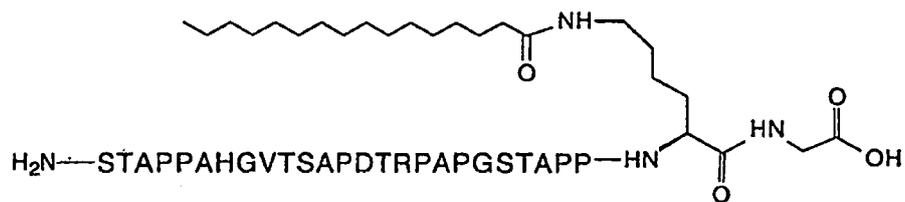


FIG. 17 Imitador glucídico que contiene PetNH_2 (TM) del tetrasacárido terminal de Globo-H, un antígeno asociado a tumor, y su estrategia de síntesis



lipopéptido BLP25

FIG. 18 Estructura del lipopéptido BLP25, una secuencia modificada de 25 aminoácidos derivada de la mucina asociada a tumor MUC1 (códigos de aminoácidos de una letra)

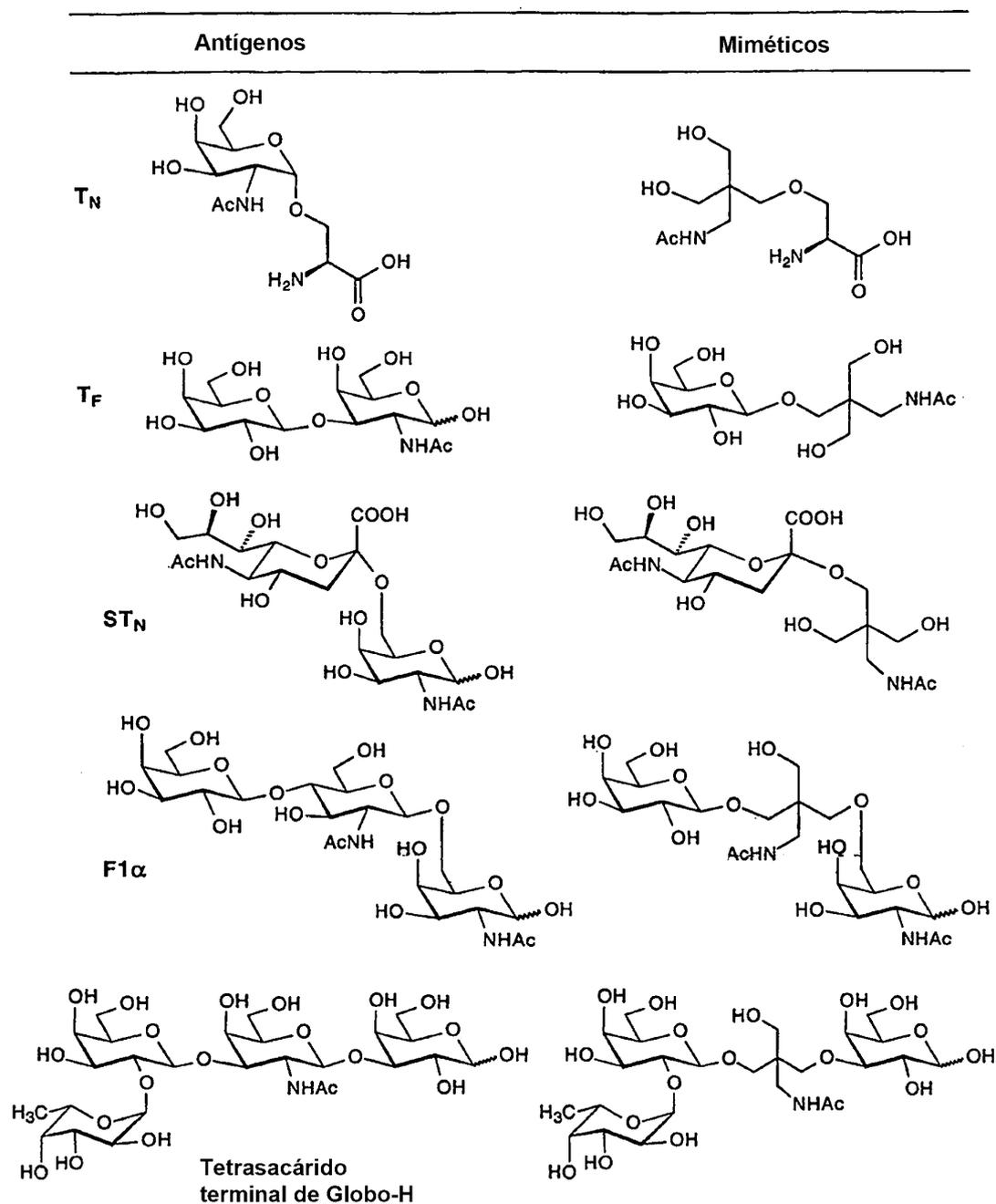


FIG. 19 Antígenos glucídicos asociados a tumor y sus miméticos que contienen PetNH₂

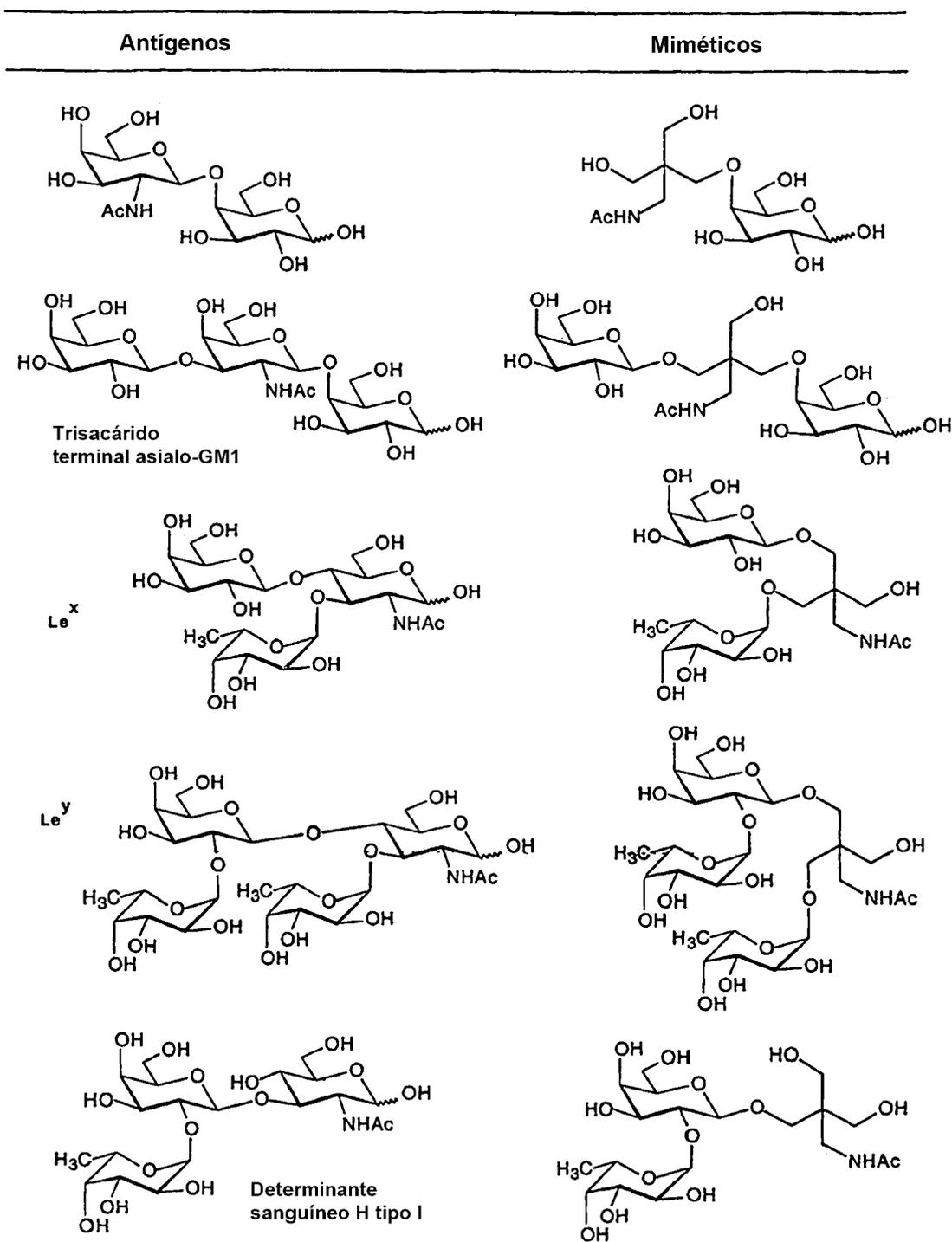


FIG. 20 Antígenos glucídicos implicados en la adhesión bacterias-huésped y sus miméticos que contienen PetNH₂