



(51) МПК

A61K 31/7024 (2006.01)

C07H 11/04 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011152602/04, 04.06.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.06.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
05.06.2009 US 61/184,703

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2013 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 20.08.2015 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 20080131466 A1, 05.06.2008. US
4912094 A, 27.03.1990. RU 2288723C2, 10.12.2008(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.01.2012(86) Заявка РСТ:
US 2010/037466 (04.06.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/141861 (09.12.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, 25, стр.
3, ООО "Юридическая фирма "Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

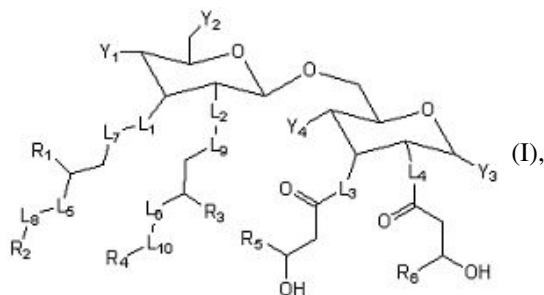
РИД Стивен Дж. (US),
КАРТЕР Даррик (US)

(73) Патентообладатель(и):

ИНФЕКШЕС ДИЗИЗ РИСЕРЧ
ИНСТИТЮТ (US)

(54) СИНТЕТИЧЕСКИЕ ГЛЮКОПИРАНОЗИЛЛИПИДНЫЕ АДЬЮВАНТЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к
иммуностимулирующим соединениям формулы:где L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆ независимопредставляют собой -O- или -NH-; L₇, L₈, L₉ и L₁₀
независимо отсутствуют или представляют собой
-C(=O)-; Y₁ представляет собой-OR(O)(OH)₂; Y₂, Y₃ и Y₄ каждый представляет
-OH; R₁, R₃, R₅ и R₆ независимо представляют
собой C₈₋₁₃алкил; и R₂ и R₄ независимо
представляют собой C₆₋₁₁алкил. Предложены
новые соединения, фармацевтические и вакцинные
композиции на их основе, пригодные для
стимуляции иммунной системы. 7 н. и 14 з.п. ф-
лы, 45 пр., 12 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 31/7024 (2006.01)*C07H* 11/04 (2006.01)*A61P* 37/02 (2006.01)*A61K* 31/7028 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011152602/04, 04.06.2010

(24) Effective date for property rights:
04.06.2010

Priority:

(30) Convention priority:
05.06.2009 US 61/184,703

(43) Application published: 20.07.2013 Bull. № 20

(45) Date of publication: 20.08.2015 Bull. № 23

(85) Commencement of national phase: 10.01.2012

(86) PCT application:
US 2010/037466 (04.06.2010)(87) PCT publication:
WO 2010/141861 (09.12.2010)

Mail address:

129090, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja, 25, str. 3,
OOO "Juridicheskaja firma "Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

**RID Stiven Dzh. (US),
KARTER Darrik (US)**

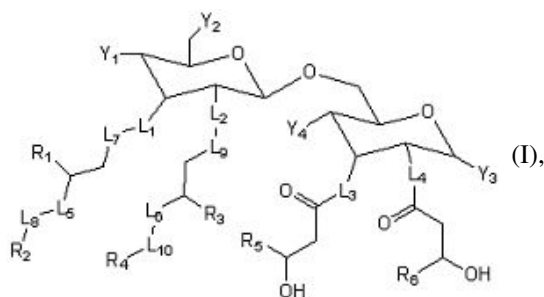
(73) Proprietor(s):

INFEKShES DIZIZ RISERCh INSTIT'JuT (US)(54) **SYNTHETIC GLUCOPYRANOSYLLIPID ADJUVANTS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to immune-stimulating compounds of formula:



where L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 and L_6 independently represent -O- or -NH-; L_7 , L_8 , L_9 and L_{10} is independently absent or represent -C(=O)-; Y_1 represents -OP(O)(OH)₂; Y_2 , Y_3 and Y_4 each represents -OH; R_1 , R_3 , R_5 and R_6 independently represent C₈₋₁₃ alkyl; and R_2 and R_4 independently represent C₆₋₁₁ alkyl.

EFFECT: novel compounds, based on them pharmaceutical and vaccine compositions, suitable for immune system stimulation, are claimed.

21 cl, 45 ex, 12 dwg

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с § 119(e) 35 U.S.C. на основании предварительной заявки на выдачу патента США № 61/184703, поданной 5 июня 2009 года, причем содержание указанной предварительной заявки включено во

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических и вакцинных композиций. Более конкретно, варианты осуществления, описанные в настоящем документе, относятся к фармацевтическим и вакцинным композициям, а также связанным с ними профилактическим и терапевтическим способам, причем композиции содержат описанный в настоящем документе глюкопиранозиллипидный адъювант (GLA).

Описание предшествующего уровня техники

Иммунная система высших организмов была охарактеризована как различающая чужеродные агенты (или «чужих»), агенты от близких или «своих» компонентов таким образом, что чужеродные агенты индуцируют иммунные ответы, тогда как «свои» компоненты игнорируются или допускаются. Иммунные ответы традиционно характеризуют либо как гуморальные ответы, при которых специфичные в отношении антигенов антитела продуцируются дифференцированными В-лимфоцитами, известными как плазмocyты, либо как опосредованные клетками ответы, при которых различные типы Т-лимфоцитов элиминируют антигены посредством ряда механизмов. Например, CD4+ хелперные Т-клетки, которые способны распознавать специфические антигены, могут отвечать высвобождением растворимых медиаторов, таких как цитокины, с вовлечением дополнительных клеток иммунной системы для участия в иммунном ответе. Кроме того, CD8+ цитотоксические Т-клетки, которые также способны к распознаванию специфических антигенов, могут отвечать путем связывания и уничтожения или повреждения несущей антиген клетки или частицы. Как известно, в области иммунологии разработаны некоторые вакцины в соответствии с рядом составов, обычно для индукции желаемого иммунного ответа у хозяина.

Некоторые стратегии индукции специфических иммунных ответов путем введения вакцины хозяину включают иммунизацию убитыми нагреванием или живыми аттенуированными инфекционными патогенами, такими как вирусы, бактерии или некоторые эукариотические патогены; иммунизацию невирулентным инфекционным агентом, способным управлять экспрессией генного материала, кодирующего антиген (ы), к которому желательно индуцировать иммунный ответ; и иммунизацию субъединичными вакцинами, которые содержат выделенные иммуногены (такие как белки) конкретного патогена для индукции иммунитета к патогену (см., например, Liu, 1998 Nature Medicine 4(5 suppl.):515). Для некоторых антигенов могут быть желательными один или несколько типов иммунитета, для которых ни один из этих подходов не является особенно эффективным, включая разработку вакцин, которые являются эффективными для иммунной защиты хозяина против вирусов иммунодефицита человека или других инфекционных патогенов, злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания или других клинических состояний.

Давно известно, что энтеробактериальный липополисахарид (LPS) является мощным стимулятором иммунной системы, хотя его применение в качестве адъювантов сократилось из-за его токсических эффектов. Нетоксическое производное LPS, монофосфориллипид А (MPL), полученное удалением основной углеводной группы и

фосфата из глюкозамина с восстанавливающим концом, было описано Ribi et al. (1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p. 407-419).

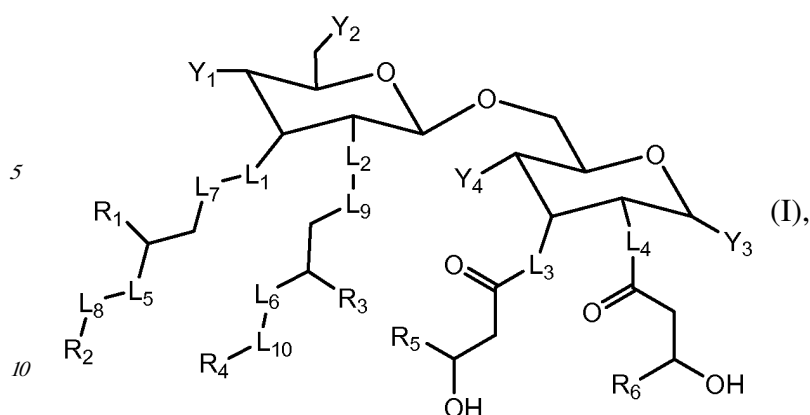
Следующая детоксифицированная версия MPL получается путем удаления ацильной цепи из 3-положения дисахаридного скелета и называется 3-О-дезацелированным монофосфориллипидом А (3D-MPL). Он может быть очищен и получен способами, изложенными в патенте Великобритании №2122204В, ссылка в котором также раскрывает получение дифосфориллипида А и его 3-О-дезацелированных вариантов. Например, 3D-MPL был получен в форме эмульсии с малым размером частиц менее 0,2 мкм в диаметре, а способ его изготовления раскрыт в WO 94/21292. Водные составы, включающие монофосфориллипид А и поверхностно-активное вещество, были описаны в WO 9843670А2.

Полученные из бактериального липополисахарида адъюванты, подлежащие включению в состав адъювантных комбинаций, могут быть выделены и произведены из бактериальных источников, или альтернативно они могут быть синтетическими. Например, очищенный монофосфориллипид А описан в Ribi et al. 1986 (выше), а 3-О-дезацелированный монофосфорил- или дифосфориллипид А, полученный из *Salmonella* sp., описан в патенте Великобритании №2220211 и патенте США №4912094. Были описаны 3D-MPL и β (1-6)-глюкозаминовые дисахариды, а также другие очищенные и синтетические липополисахариды (WO 98/01139; патент США №6005099 и европейский патент №0729473В1, Hilgers et al., 1986 Int. Arch. Allergy Immunol., 79(4):392-6; Hilgers et al., 1987, Immunology, 60(1); 141-6; и европейский патент №0549074В1). Комбинации 3D-MPL и сапониновых адъювантов, полученных из коры *Quillaja saponaria Molina*, были описаны в европейском патенте №0761231В. В WO 95/17210 раскрыта адъювантная эмульсионная система на основе сквалена, α -токоферола и полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (TWEENTM-80), составленная с иммуностимулятором QS21 и необязательно включающая 3D-MPL. Несмотря на доступность таких комбинаций, применение адъювантов, полученных из природных продуктов, сопровождается высокими производственными затратами, несовпадением характеристик от партии к партии, трудностями, связанными с серийным производством, и неопределенностью в отношении присутствия примесей в композиционном составе какого-либо данного препарата.

Следовательно, существует потребность в улучшенных вакцинах и, в особенности, в вакцинах, которые фактически содержат высокоочищенные химически определенные адъювантные компоненты, которые характеризуются совпадением характеристик от партии к партии, и которые могут быть эффективно произведены в промышленном масштабе без введения нежелательных или структурно неопределенных загрязнений. Настоящее изобретение относится к композициям и способам на основе таких вакцин и обеспечивает другие связанные с ними преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в некоторых своих аспектах относится к соединениям, композициям и способам, в которых в качестве иммуномодуляторов или адъювантов преимущественно использованы определенные синтетические глюкопиранозиллипидные адъюванты (GLA). Таким образом, один аспект настоящего изобретения, описанный в настоящем документе, относится к GLA соединениям, имеющим структуру в соответствии со следующей формулой (I):



или их фармацевтически приемлемой соли, где значения L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 , L_6 , L_7 , L_8 , L_9 , L_{10} , Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 определены в настоящем документе.

GLA соединения по настоящему изобретению применимы в широком диапазоне терапевтических применений, при которых желательна индукция специфических или неспецифических иммунных ответов. Например, определенные аспекты настоящего изобретения относятся к вакцинным композициям, содержащим одно или несколько GLA соединений, изложенных в настоящем документе, в сочетании с антигеном. Такие вакцинные композиции могут быть эффективно использованы в соответствии со способами стимулирования антиген-специфических иммунных ответов у нуждающихся в этом субъектов. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к фармацевтическим композициям, содержащим одно или несколько GLA соединений, изложенных в настоящем документе, причем композиции по существу не содержат антиген. Такие фармацевтические композиции могут быть эффективно использованы в способах стимулирования неспецифических иммунных ответов у нуждающихся в этом субъектов, например, при лечении инфекции, сезонного ринита и т.п.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидны при рассмотрении последующего подробного описания и приложенных графических материалов. Кроме того, в настоящем документе приведены различные ссылки, которые более подробно описывают определенные аспекты настоящего изобретения и, следовательно, включены во всей их полноте в настоящий документ посредством ссылки.

КРАТКОЕ ПОЯСНЕНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1 продемонстрирована продукция цитокина $IFN-\gamma$, индуцированная *in vivo* после вакцинации мышей композициями по настоящему изобретению, содержащими антиген и GLA.

На фигурах 2A-2F продемонстрирован гуморальный иммунный ответ, индуцированный *in vivo* после вакцинации мышей композициями по настоящему изобретению, содержащими антиген и GLA.

На фигуре 3 представлена активация NF- κ B, наблюдаемая при различных концентрациях типичного GLA соединения по настоящему изобретению (соединение IX).

На фигурах 4A-4D представлена индукция иммуностимулирующих цитокинов (MIP-1b и TNF α) при различных концентрациях типичного GLA соединения по настоящему изобретению (соединение IX).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Известно, что монофосфорилипид A (MPL) и другие родственные адъюванты опосредуют свои эффекты, по меньшей мере частично, действуя как агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR). Глюкопиранозиллипидные адъювантные (GLA) соединения

по настоящему изобретению были рационально разработаны на основе пространственных структурных принципов стимуляции TLR рецепторов. Более конкретно, в соответствии с настоящим изобретением путем селективного определения длин ацильных цепей GLA соединений по настоящему изобретению так, что они достигают «плоской» нижней части в трехмерной структуре соединений, в участке связывания TLR рецептора может быть достигнуто улучшенное соответствие, что тем самым приводит к усиленной стимуляции TLR и улучшенным иммуностимулирующим свойствам. Кроме того, растворимость GLA соединений по настоящему изобретению (например, в водных растворах) эффективно повышается из-за уменьшенной длины ацильных цепей, что тем самым облегчает действенность и эффективное включение соединений в составы. Более того, поскольку значения длины ацильных цепей приспособлены для того, чтобы делать трехмерную молекулу «плоской» по нижней части молекулы, соединения могут быть более эффективно включены в везикулы, например, липосомных составов.

Кроме того, соединения по настоящему изобретению характеризуются благоприятными профилями активности по отношению к токсичности. Например, соединения по настоящему изобретению могут быть использованы в широком и относительно высоком диапазоне дозировок для достижения желаемого уровня активности (например, адьювантной активности), оставаясь в то же время по существу нетоксичными для человеческих клеток и для пациентов-людей, что проанализировано, например, по содержанию фактора некроза опухоли, продуцируемого человеческими клетками, в диапазоне концентраций, которое быстро повышается и выравнивается, в отличие от других более токсичных агонистов TLR4, таких как липополисахарид. Такой клеточный анализ может прогнозировать меньшее содержание маркеров воспаления, подобных С-реактивному белку, вовлеченному в нежелательные фармакологические явления. Благоприятная активность относительно профиля токсичности соединений по настоящему изобретению может быть особенно важна, например, при введении детям, у которых толерантность к цитокинам может быть более низкой, или когда соединения используются в составах, предназначенных для большой популяции, где более выровненные ответы будут обуславливать более сопоставимые клинические результаты у людей с разнообразной отвечаемостью на агонизм TLR. Подобным образом, получение разрешения контролирующего органа будет упрощено, поскольку целевое дозирование будет более щадящим, а также будет упрощено производство, если диапазон содержаний активного фармацевтического ингредиента не нужно жестко контролировать как предельно допустимое содержание.

Таким образом, настоящее изобретение во многих своих вариантах осуществления относится к соединениям, вакцинным композициям, адьювантным композициям, фармацевтическим композициям и связанным с ними составам и способам, которые включают синтетические GLA соединения, как описано в настоящем документе. GLA соединения представляют собой синтетические иммуномодуляторы, которые преимущественно по отношению к адьювантам известного уровня техники и, в частности, по отношению к адьювантам из природных продуктов могут быть получены главным образом в гомогенной форме. Более того, GLA соединения по настоящему изобретению могут быть получены эффективно и экономично путем крупномасштабного синтетического химического производства в отличие от получаемых из природных продуктов адьювантов. Поскольку синтетический адьювант, то есть химически синтезированный из определенных исходных материалов с получением химически определенного продукта, проявляет от партии к партии качественное и количественное

постоянство, GLA соединения по настоящему изобретению имеют преимущества, включая улучшенный контроль качества продукции.

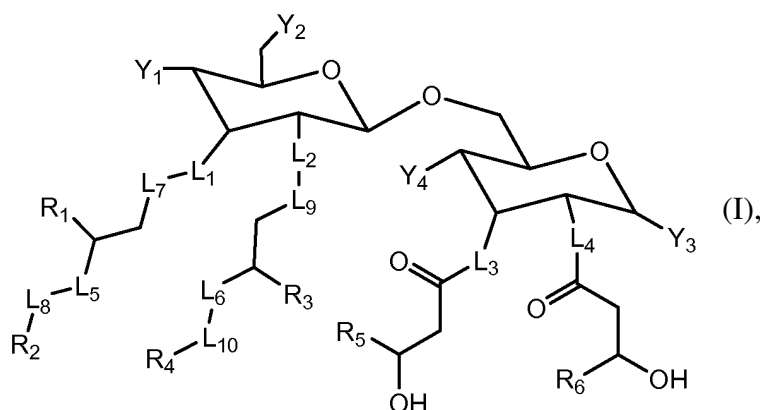
Как описано в настоящем документе, GLA соединения, композиции и способы их применения включают в некоторых вариантах осуществления применение GLA самого по себе с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем для иммунологической адъювантной активности (например, неспецифической иммуностимулирующей активности), включая «адъювантирование», при котором введение GLA субъекту может быть совершенно независимым и/или разнесенным во времени и/или пространстве относительно введения субъекту одного или нескольких антигенов, к которым желательно индуцировать или усилить иммунный ответ (например, антиген-специфический ответ) у субъекта. Другие варианты осуществления относятся к применению GLA в составе вакцинной композиции, которая также включает один или множество антигенов, к которым желательно индуцировать или усилить иммунный ответ с помощью такой вакцины.

Как описано в настоящем документе, такие вакцинные композиции в определенных связанных вариантах осуществления также могут включать один или несколько агонистов Toll-подобного рецептора (TLR) и/или один или множество из одного или нескольких коадъювантов, имидазохинолиновый модификатор иммунного ответа и иммуномодификатор с двойной структурой «стебель-петля» (dSLIM). В других связанных вариантах осуществления вакцинная композиция, как представлено в настоящем документе, может включать GLA и один или несколько рекомбинантных экспрессирующих конструкторов, каждый из которых включает промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, к которому желательно индуцировать или усилить иммунный ответ (например, антиген-специфический ответ) у субъекта.

GLA

Как отмечено выше, поскольку GLA является химически синтезированным адъювантом, он может быть получен по существу в гомогенной форме, что относится к GLA препарату, который характеризуется чистотой по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и еще более предпочтительно по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% по молекуле GLA.

GLA соединения по настоящему изобретению имеют следующую формулу (I):



или их фармацевтически приемлемая соль, где

L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆ являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой -O-, -NH- или -(CH₂)_n;

L₇, L₈, L₉ и L₁₀ являются одинаковыми или различными и независимо отсутствуют

или представляют собой $-C(=O)-$;

Y_1 представляет собой кислотную функциональную группу;

Y_2 и Y_3 являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой $-OH$, $-SH$ или кислотную функциональную группу;

Y_4 представляет собой $-OH$ или $-SH$;

R_1 , R_3 , R_5 и R_6 являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой C_{8-13} алкил; и

R_2 и R_4 являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой C_{6-11} алкил.

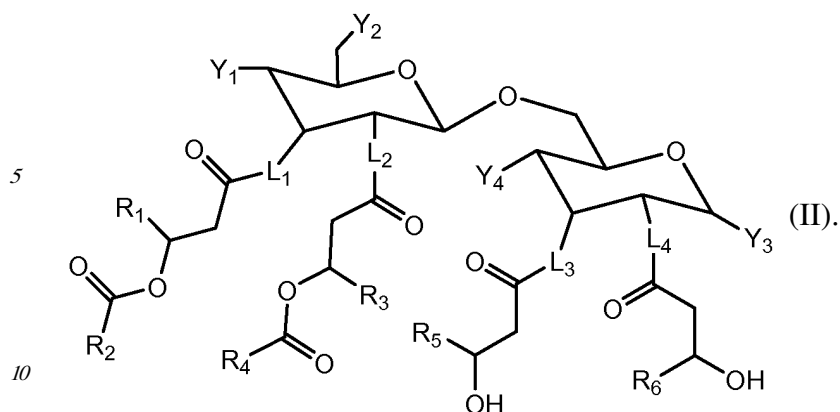
Используемые в настоящем документе вышеупомянутые термины имеют следующие значения.

«Алкил» означает с неразветвленной или разветвленной цепью, нециклический или циклический, ненасыщенный или насыщенный алифатический углеводород, содержащий от 1 до 20 атомов углерода, а в определенных предпочтительных вариантах осуществления содержащий от 11 до 20 атомов углерода. Типичные насыщенные алкилы с неразветвленной цепью включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т.п., включая ундецил, додецил, тридецил, тетрадецил, пентадецил, гексадецил, гептадецил, октадецил и т.д.; тогда как насыщенные разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и т.п. Типичные насыщенные циклические алкилы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.п.; тогда как ненасыщенные циклические алкилы включают циклопентенил, циклогексенил и т.п. Циклические алкилы также упоминаются в настоящем документе как «гомоциклы» или «гомоциклические кольца». Ненасыщенные алкилы содержат по меньшей мере одну двойную или тройную связь между соседними атомами углерода (упоминаются как «алкенил» или «алкинил», соответственно). Типичные алкенилы с неразветвленной и разветвленной цепью включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т.п.; тогда как типичные алкинилы с неразветвленной и разветвленной цепью включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т.п.

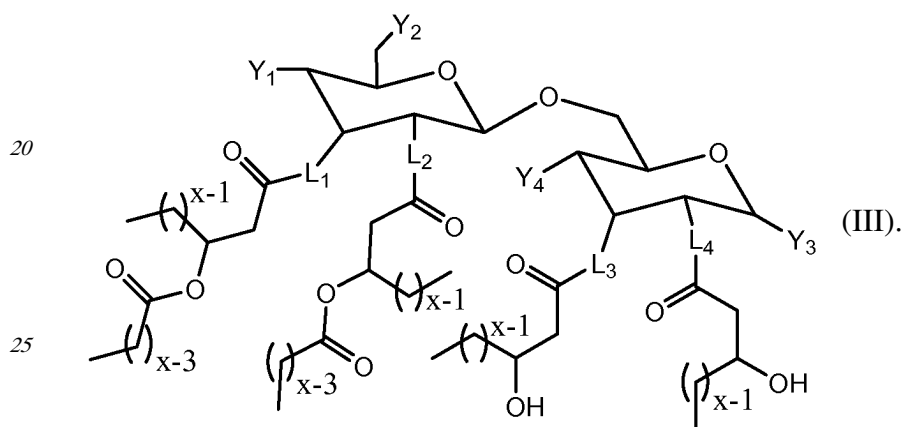
« C_{8-13} алкил» и « C_{6-11} алкил» означают алкил, определенный выше, содержащий 8-13 или 6-11 атомов углерода, соответственно.

«Кислотная функциональная группа» означает функциональную группу, способную донировать протон в водной среде (а именно кислоту Бренстеда-Лоури). После донирования протона кислотная функциональная группа становится отрицательно заряженной частицей (а именно сопряженным основанием кислотной функциональной группы). Примеры кислотных функциональных групп включают без ограничения $-OP(=O)(OH)_2$ (фосфат), $-OS(=O)(OH)_2$ (сульфат), $-OS(OH)_2$ (сульфит), $-C(=O)OH$ (карбоксилат), $-OC(=O)CH(NH_2)CH_2C(=O)OH$ (аспартат), $-OC(=O)CH_2CH_2C(=O)OH$ (сукцинат) и $-OC(=O)CH_2OP(=O)(OH)_2$ (карбоксиметилфосфат).

В более конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к GLA соединениям формулы (I), где L_5 и L_6 оба представляют собой $-O-$, а каждый из L_7 , L_8 , L_9 и L_{10} представляет собой $-C(=O)-$, и GLA соединения имеют следующую формулу (II):

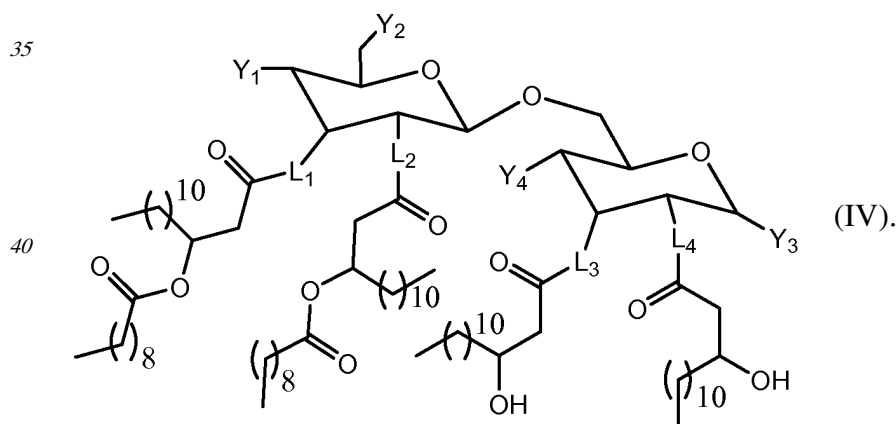


В более конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к GLA соединениям формулы (II), где каждый из R_1 , R_3 , R_5 и R_6 представляет собой C_x алкил, где x является постоянной и выбирают из целых чисел от 8 до 13, а R_2 и R_4 оба представляют собой C_{x-2} алкил, и GLA соединения имеют следующую формулу (III):



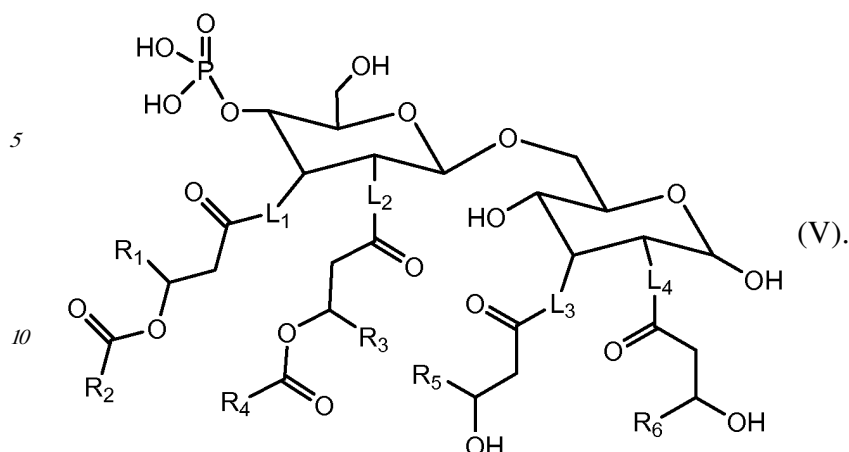
В других более конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к GLA соединениям формулы (III), где x выбирают из целых чисел от 10 до 12.

В других более конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к GLA соединениям формулы (III), где x равен 11, и GLA соединения имеют следующую структуру (IV):

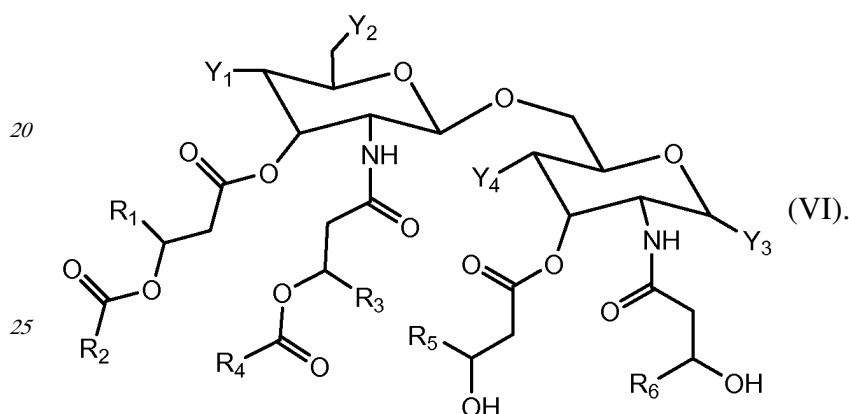


В следующих конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к GLA соединениям формулы (II), где Y_1 представляет собой $-OP(=O)(OH)_2$, а каждый из Y_2 , Y_3 и Y_4 представляет собой $-OH$, и GLA соединения имеют следующую формулу

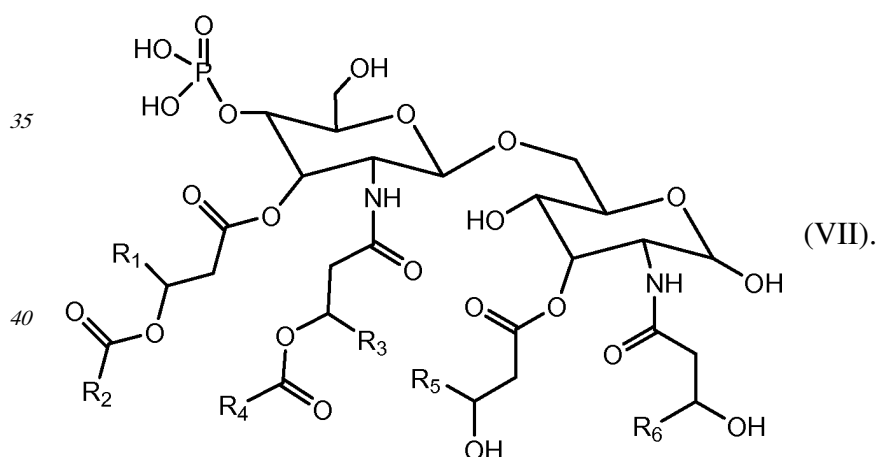
(V):



В других конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к GLA соединениям формулы (II), где L₁ и L₃ оба представляют собой -O-, а L₂ и L₄ оба представляют собой -NH-, и GLA соединения имеют следующую формулу (VI):

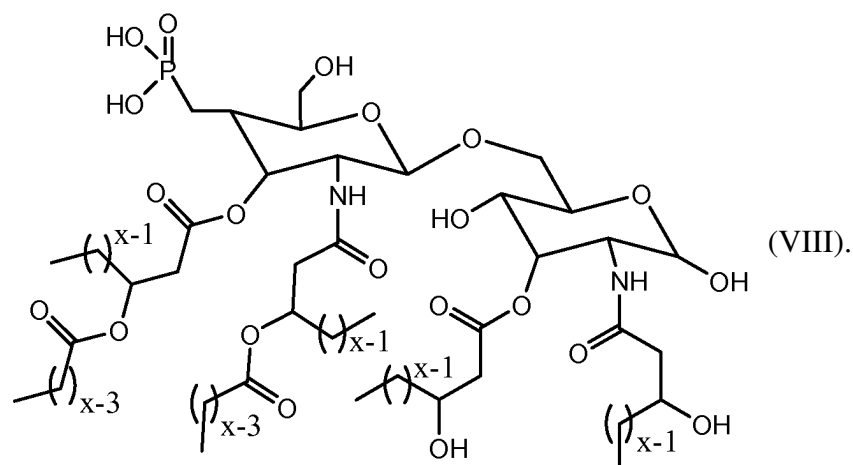


В еще более конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к GLA соединениям формулы (II), где Y₁ представляет собой -OP(O)(OH)₂, каждый из Y₂, Y₃ и Y₄ представляет собой -OH, L₁ и L₃ оба представляют собой -O-, и L₂ и L₄ оба представляют собой -NH-, и GLA соединения имеют следующую формулу (VII):

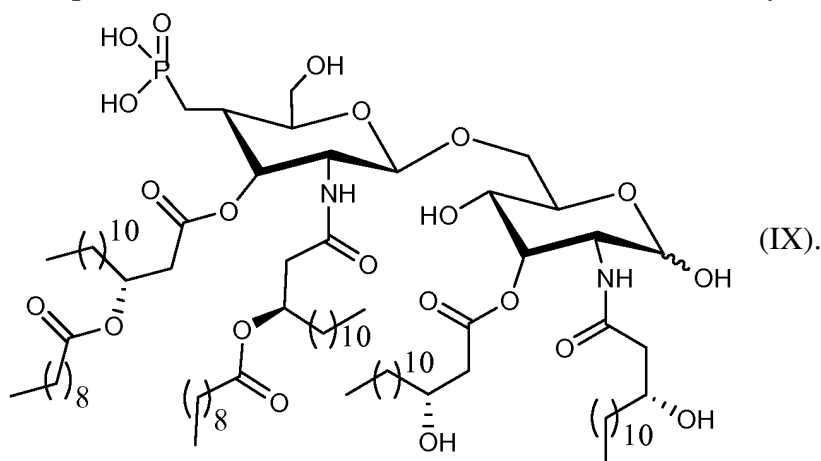


В следующих конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к GLA соединениям формулы (II), где Y₁ представляет собой -OP(O)(OH)₂, каждый из Y₂, Y₃ и Y₄ представляет собой -OH, L₁ и L₃ оба представляют собой -O-, L₂ и L₄ оба представляют собой -NH-, каждый из R₁, R₃, R₅ и R₆ представляет собой C_xалкил, где

х является постоянной и выбирают из целых чисел от 8 до 13, и R_2 и R_4 оба представляют собой C_{x-2} алкил, и GLA соединения имеют следующую формулу (VIII):



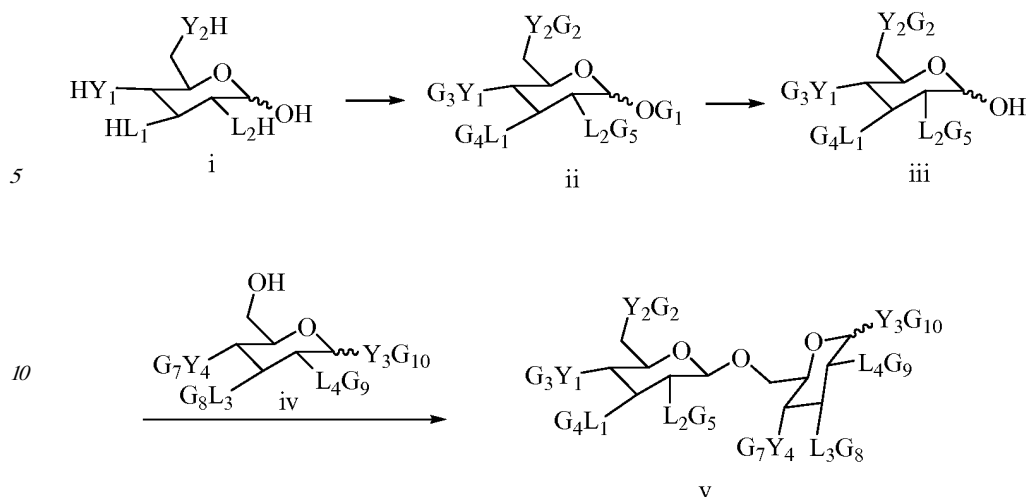
В более конкретных вариантах осуществления формулы (VIII) х равен 11, и настоящее изобретение относится к GLA соединению, имеющему следующую структуру (IX):



GLA соединения

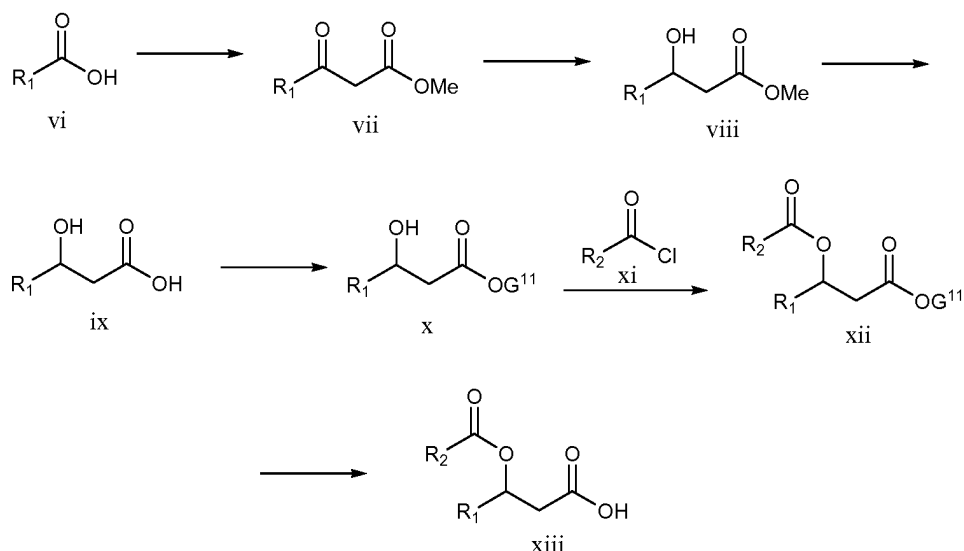
Как упоминалось выше, настоящее изобретение относится к GLA соединениям. GLA соединения по настоящему изобретению могут быть получены известными методиками органического синтеза, включая способы, описанные более подробно в примерах. В общем, GLA соединения структуры (I) могут быть получены в соответствии со следующими схемами реакций, в которых все заместители определены выше, если иное не указано особо.

Схема реакций 1



Углеводный скелет типичных GLA соединений, как правило, может быть получен согласно схеме реакций 1, где G_1 , G_2 , G_3 , G_4 , G_5 , G_6 , G_7 , G_8 , G_9 и G_{10} являются либо одинаковыми, либо различными и независимо замещенными соответствующей защитной группой или водородом. Соответствующий сахар, такой как (i), может быть приобретен или получен в соответствии со способами, известными специалисту в данной области. Функциональные группы сахара (i) затем могут быть полностью защищены с использованием способов, известных специалисту в данной области, с получением (ii). В этом отношении специалисту в данной области будет понятно, какая соответствующая стратегия использования ортогональных защитных групп, которая обеспечивает селективное снятие защиты сахарных функциональных групп, может быть использована. Подходящие защитные группы включают без ограничения силиловые эфиры, бензиловые эфиры, аллилоксикарбонил, ацетали, Фмос, азид и т.п. Снятие защиты с G_1 в результате дает свободный спирт (iii), который затем может быть соединен с защищенным сахаром (iv) с использованием соответствующих условий соединения, например, CCl_3CN/NaH , с получением желаемого скелета сахара (v).

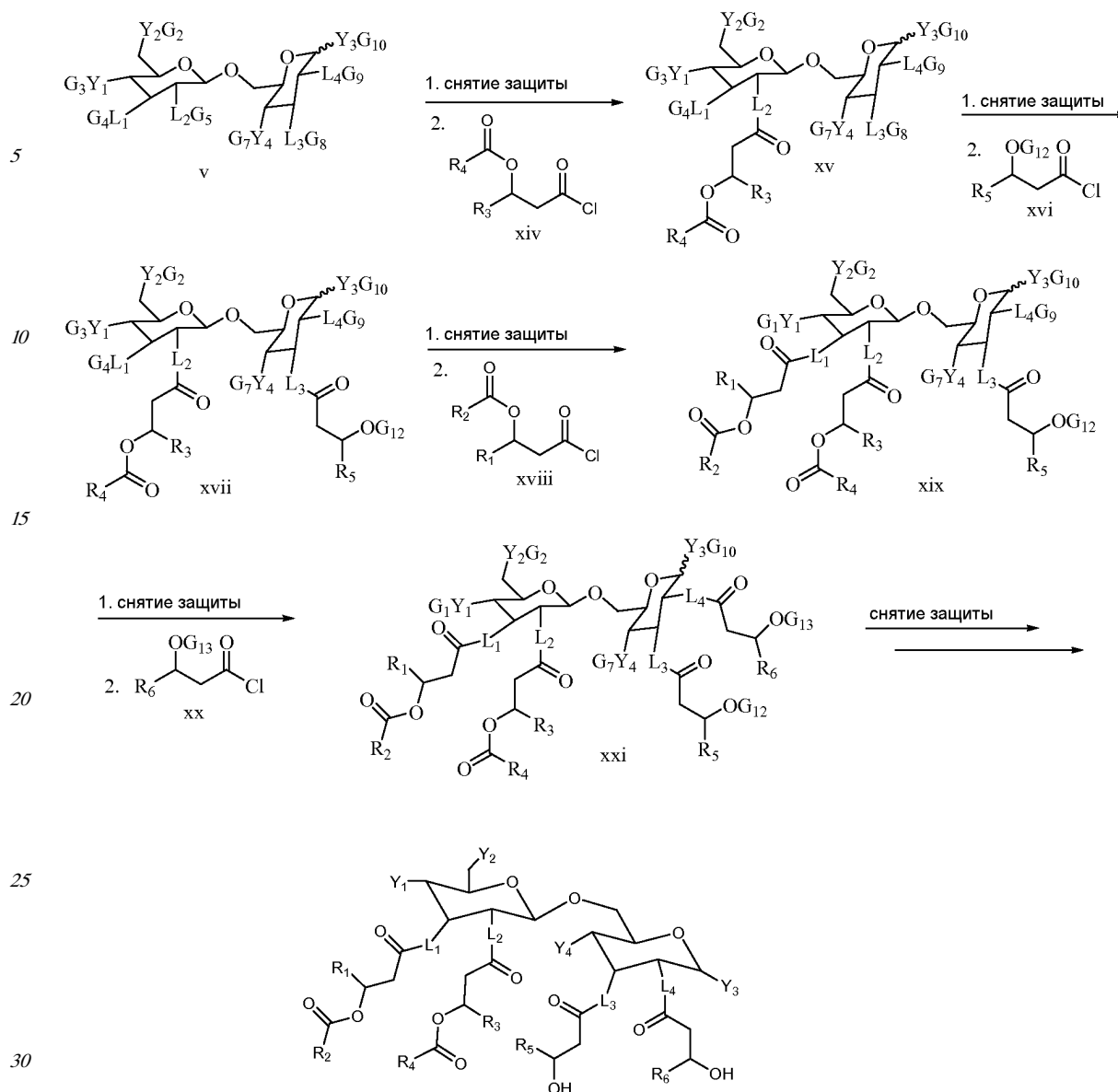
Схема реакций 2



Типичные концевые части GLA соединения, в которых оба L_5 и L_6 представляют собой -O-, а каждый из L_7 , L_8 , L_9 и L_{10} представляет собой -C(=O)-, обычно могут быть получены в соответствии со схемой реакций 2, на которой G^{11} представляет

соответствующую защитную группу. Кислотные соединения структуры (vi) могут быть приобретены или получены в соответствии со способами, известными специалисту в данной области. Реакция (vi) с соответствующим реагентом, таким как монометиловый эфир малоновой кислоты, позволяет получить кетозфир (vii). Восстановление (vii) позволяет получить спирт (viii). Специалисту в данной области будет понятно, что при соответствующих условиях кетогруппа (vii) может быть восстановлена стереоспецифически, как представлено в примерах. Сапонификация (viii) позволяет получить кислоту (ix), которая может быть впоследствии защищена с выходом (x). Обработка (x) хлорангидридом (xi) позволяет получить (xii), которое при снятии защиты позволяет получить (xiii). Оба соединения (ix) и (xiii) могут быть превращены в соответственно защищенное производное хлорангидрида способами, известным специалисту в данной области, и присоединены к углеводному скелету GLA соединения, как показано ниже в схеме реакций 3. Хотя на схеме реакций 2 изображен синтез концевой части GLA соединения, включающей R₁ и R₂, следует понимать, что аналогичным способом также могут быть получены другие концевые части, включающие другие алкильные группы (например, R₃, R₄, R₅ и R₆). Также аналогичным способом могут быть получены другие концевые части с различными группами L₅, L₆, L₇, L₈, L₉ и L₁₀.

Схема реакций 3



(II)

Обычно типичные GLA соединения могут быть получены согласно схеме реакций 3, в которой G_{12} и G_{13} являются одинаковыми или различными и независимо представляют соответствующую защитную группу. Удаление защитной группы G_5 (v) с последующей реакцией с хлорангидридом (xiv) позволяет получить (xv). Подобным образом, удаление защитной группы G_8 с (xv) с последующей реакцией с хлорангидридом (xvi) позволяет получить в результате (xvii). Снятие защиты (xvii) и реакция с хлорангидридом (xviii) позволяет получить (xix). Удаление G_9 и реакция с (xx) затем позволяет получить защищенное GLA соединение (xxi). Полное снятие защиты (xxi) позволяет получить в результате соединения структуры (II). Хотя схема реакций 3 изображает синтез соединения структуры (II), специалисту в данной области будет понятно, что для получения какого-либо соединения структуры (I) могут быть использованы аналогичные способы. Кроме того, специалисту в данной области также будет понятно, что при выборе соответствующих защитных групп окончательное снятие защиты позволяет получить в результате желаемое соединение.

Соединения по настоящему изобретению, как правило, могут быть использованы как свободное основание или свободная кислота. Альтернативно, соединения по

настоящему изобретению могут быть использованы в форме кислотно- или основно-аддитивных солей. Кислотно-аддитивные соли свободных аминокислот по настоящему изобретению могут быть получены способами, хорошо известными в данной области, и могут быть образованы из органических и неорганических кислот.

- 5 Подходящие органические кислоты включают малеиновую, фумаровую, бензойную, аскорбиновую, янтарную, метансульфоновую, уксусную, щавелевую, пропионовую, винную, салициловую, лимонную, глюконовую, молочную, миндальную, коричную, аспарагиновую, стеариновую, пальмитиновую, гликолевую, глутаминовую и бензолсульфоновую кислоты. Подходящие неорганические кислоты включают
- 10 хлористоводородную, бромистоводородную, серную, фосфорную и азотную кислоты.

Подобным образом, основно-аддитивные соли кислотных соединений по настоящему изобретению могут быть получены способами, хорошо известными в данной области, и могут быть образованы из органических и неорганических оснований. Подходящие органические основания включают без ограничения триэтиламин и пиридин.

- 15 Подходящие неорганические основания включают без ограничения гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат натрия, карбонат калия и аммиак. Таким образом, термин «фармацевтически приемлемая соль» структуры (I) предназначен охватывать любые и все приемлемые формы солей.

Кроме того, пролекарства также включены в контекст настоящего изобретения.

- 20 Пролекарства представляют собой любые ковалентно связанные носители, которые высвобождают соединение структуры (I) *in vivo* при введении такого пролекарства пациенту. Как правило, пролекарства получают путем модификации функциональных групп таким образом, что при отщеплении модификации или в результате стандартной манипуляции или *in vivo* получается исходное соединение. Пролекарства включают,
- 25 например, соединения по настоящему изобретению, в которых гидроксильная, аминная или сульфгидрильная группы связаны с любой группой, которая при введении пациенту отщепляется с образованием гидроксильной, аминной или сульфгидрильной групп. Таким образом, типичные примеры пролекарств включают (без ограничения) ацетатные, формиатные и бензоатные производные спиртовой и аминной функциональных групп
- 30 соединений структуры (I). Более того, в случае карбоновой кислоты (COOH), могут быть использованы сложные эфиры, такие как сложные метиловые эфиры, сложные этиловые эфиры и т.п.

Что касается стереоизомеров, то соединения структуры (I) могут иметь хиральные центры и могут встречаться как рацематы, рацемические смеси и как отдельные энантиомеры или диастереомеры. Все эти изомерные формы включены в настоящее изобретение, включая их смеси. Более того, некоторые из кристаллических форм соединений структуры (I) могут существовать как полиморфы, которые включены в настоящее изобретение. Кроме того, некоторые из соединений структуры (I) также могут формировать сольваты с водой или другими органическими растворителями.

- 40 Такие сольваты аналогично включены в объем настоящего изобретения.

Антиген

Антиген для применения в определенных вариантах осуществления описанных в настоящем документе вакцинных композиций и способов, использующих GLA, может быть любым целевым эпитопом, молекулой (включая биомолекулу), молекулярным

45 комплексом (включая молекулярные комплексы, которые содержат биомолекулы), субклеточным ансамблем, клеткой или тканью, к которым желательно индуцировать или усилить иммунореактивность у субъекта. Часто термин «антиген» будет относиться к интересующему полипептидному антигену. Однако термин «антиген», используемый

в настоящем документе, также может относиться к рекомбинантному конструкту, который кодирует интересующий полипептидный антиген, например, к экспрессирующему конструкту. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антиген может представлять собой или может быть получен из или
 5 может быть иммунологически перекрестно реагирующим с инфекционным патогеном и/или эпитопом, биомолекулой, клеткой или тканью, которые связаны с инфекцией, злокачественной опухолью, аутоиммунным заболеванием, аллергией, бронхиальной астмой или каким-либо другим состоянием, при котором стимуляция антиген-специфического иммунного ответа была бы желательна или полезна.

10 Предпочтительно и в определенных вариантах осуществления вакцинные составы по настоящему изобретению содержат антиген или антигенную композицию, способную индуцировать иммунный ответ к патогену человека или другого млекопитающего, причем антиген или антигенная композиция может включать композицию, полученную из вируса, такого как ВИЧ-1 (например, tat, nef, gp120 или gp160), вирусов герпеса
 15 человека, например, gD или его производные, или предраннего белка, такого как ICP27 из HSV1 или HSV2, цитомегаловируса ((особенно человека) (например, gB или его производные), ротавируса (включая живые аттенуированные вирусы), вируса Эпштейна-Барра (например, gp350 или его производные), вируса ветряной оспы (например, gpI, II и IE63) или из вируса гепатита, такого как вирус гепатита В (например, поверхностный
 20 антиген вируса гепатита В или его производное), вирус гепатита А, вирус гепатита С и вирус гепатита Е, или из других вирусных патогенов, таких как парамиксовирусы: респираторный синцитиальный вирус (например, F и G белки или их производные), вирус парагриппа, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирусы папилломы человека (например, HPV6, 11, 16, 18 и т.д.), флавивирусы (например, вирус желтой
 25 лихорадки, вирус лихорадки Денге, вирус клещевого энцефалита, вирус японского энцефалита) или вирус гриппа (цельный живой или инактивированный вирус, расщепленный вирус гриппа, выращенный на яйцах или MDCK клетках, или цельные виросомы вируса гриппа (как описано в Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) или их очищенные или рекомбинантные белки, такие как HA, NP, NA или M белки, или их
 30 комбинации).

В некоторых других предпочтительных вариантах осуществления вакцинные составы по настоящему изобретению содержат антиген или антигенную композицию, способную индуцировать иммунный ответ к патогену человека или другого млекопитающего, причем антиген или антигенная композиция может включать композицию, полученную
 35 из одного или нескольких бактериальных патогенов, таких как *Neisseria spp.*, включая *N. gonorrhea* и *N. meningitidis* (например, их капсулярные полисахариды и конъюгаты, связывающие трансферрин белки, связывающие лактоферрин белки, PilC, адгезины); *S. pyogenes* (например, M белки или их фрагменты, C5A-протеаза, липотейхоевые кислоты), *S. agalactiae*, *S. mutans*, *H. ducreyi*, *Moraxella spp.*, включая *M. catarrhalis*, также
 40 известную как *Branhamella catarrhalis* (например, высоко- и низкомолекулярные адгезины и инвазины); *Bordetella spp.*, включая *B. pertussis* (например, пертактин, коклюшевый токсин или его производные, филаментный гемагглютинин, аденилатциклаза, фимбрия), *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, включая *M. tuberculosis* (например, ESAT6, антиген 85A, -B или -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, включая *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, включая
 45 энтеротоксическую *E. coli* (например, факторы колонизации, термолabile токсин или его производные, термостойкий токсин или его производные), энтерогеморрагическую *E. coli*, энтеропатогенную *E. coli* (например, токсин, подобный

токсину Шига или его производные); *Vibrio spp.*, включая *V. cholera* (например, холерный токсин или его производные); *Shigella spp.*, включая *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, включая *Y. enterocolitica* (например, Yop белок), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, включая *C. jejuni* (например, токсины, адгезины и инвазины) и *C. coli*; *Salmonella spp.*, включая *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, включая *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, включая *H. pylori* (например, уреазы, каталазы, вакуолизирующий токсин); *Pseudomonas spp.*, включая *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, включая *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, включая *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, включая *C. tetani* (например, столбнячный токсин и его производное), *C. botulinum* (например, ботулинический токсин и его производное), *C. difficile* (например, клостридиумные токсины А или В и их производные); *Bacillus spp.*, включая *B. anthracis* (например, ботулинический токсин и его производные); *Corynebacterium spp.*, включая *C. diphtheriae* (например, дифтерийный токсин и его производные); *Borrelia spp.*, включая *B. burgdorferi* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, включая *E. equi* и возбудитель гранулоцитарного эрлихиоза человека; *Rickettsia spp.*, включая *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, включая *C. trachomatis* (например, МОМР, связывающие гепарин белки), *C. pneumoniae* (например, МОМР, связывающие гепарин белки), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, включая *L. interrogans*; *Treponema spp.*, включая *T. pallidum* (например, редкие белки наружной мембраны), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae* или другие бактериальные патогены.

В некоторых других предпочтительных вариантах осуществления вакцинные составы по настоящему изобретению содержат антиген или антигенную композицию, способную индуцировать иммунный ответ к патогену человека или другого млекопитающего, причем антиген или антигенная композиция может включать композицию, полученную из одного или нескольких паразитов (см., например, John, D.T. and Petri, W.A., Markell and Vogt's Medical Parasitology-9th Ed., 2006, WB Saunders, Philadelphia; Bowman, D.D., Georgis' Parasitology for Veterinarians-8th Ed., 2002, WB Saunders, Philadelphia), таких как *Plasmodium spp.*, включая *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, включая *T. gondii* (например, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, включая *E. histolytica*; *Babesia spp.*, включая *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, включая *T. cruzi*; *Giardia spp.*, включая *G. lamblia*; *Leishmania spp.*, включая *L. major*; *Pneumocystis spp.*, включая *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, включая *T. vaginalis*; или из гельминта, способного инфицировать млекопитающего, например, (i) нематодные инфекции (включая без ограничения *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Dracunculus medinensis*, *Trichinella spiralis* и *Strongyloides stercoralis*); (ii) трематодные инфекции (включая без ограничения *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Opisthorchis sinensis*, *Paragonimus sp.*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola magna*, *Fasciola gigantica*); и (iii) цестодные инфекции (включая без ограничения, *Taenia saginata* и *Taenia solium*). Следовательно, определенные варианты осуществления могут предусматривать вакцинные композиции, которые включают антиген, полученный из *Schistosoma spp.*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* и/или *Schistosoma japonicum* или полученный из дрожжей, таких как *Candida spp.*, включая *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, включая *C. neoformans*.

Другими предпочтительными специфическими антигенами для *M. tuberculosis* являются, например, Th Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 и hTCC1 (WO 99/51748). Белки для *M. tuberculosis* также включают слитые белки и их

варианты, в которых по меньшей мере два, предпочтительно три полипептида *M. tuberculosis* слиты в больший белок. Предпочтительные слияния включают Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (WO 99151748).

- 5 Определенные предпочтительные антигены для *Chlamydia* включают, например, высокомолекулярный белок (HWMP) (WO 99/17741), ORF3 (европейский патент №366412), CT622, CT610, pmpD, UVEB и предполагаемые мембранные белки (Pmp). Другие антигены *Chlamydia* для вакцинного состава могут быть выбраны из группы, описанной в WO 99128475. Предпочтительные бактериальные вакцины включают
- 10 антигены, полученные из *Streptococcus spp.*, включая *S. pneumoniae* (например, капсулярные полисахариды и их конъюгаты, PsaA, PspA, PdB, стрептолизин, связывающие холин белки), белковый антиген пневмолизин (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342) и их мутантные детоксифицированные производные (WO 90/06951; WO 99/03884). Другие
- 15 предпочтительные бактериальные вакцины включают антигены, полученные из *Haemophilus spp.*, включая *H. influenzae* типа B (например, PRP и их конъюгаты), нетипируемую *H. influenzae*, например, OMP26, высокомолекулярные адгезины, P5, P6, белок D и липопротеид D, фимбрин и полученные из фимбрина пептиды (патент США №5843464) или их многокопийные варианты или слитые белки.
- 20 Производные поверхностного антигена гепатита B хорошо известны в данной области и включают, среди прочих, PreS1, Pars2 S антигены, указанные в заявках на европейские патенты EP-A414 374; EP-A-0304 578 и в европейском патенте №198474. В одном предпочтительном аспекте вакцинный состав по настоящему изобретению включает антиген ВИЧ-1, gp120, особенно когда экспрессирован в клетках CHO. В
- 25 следующем варианте осуществления вакцинный состав по настоящему изобретению включает gD2t, определенный выше.

- В предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению вакцины, содержащие заявленный адъювант, включают антиген, полученный из вируса папилломы человека (HPV), который считается вызывающим остроконечные кондиломы (HPV 6
- 30 или HPV 11 и другие), и из вирусов HPV, ответственных за развитие рака шейки матки (HPV16, HPV18 и другие). Особенно предпочтительные формы профилактических или терапевтических вакцин для остроконечной кондиломы включают L1 частицы или капсомеры и слитые белки, включающие один или несколько антигенов, выбранных из белков E6, E7, L1 и L2 HPV 6 и HPV 11. Определенные предпочтительные формы
- 35 слитых белков включают L2E7, как раскрыто в WO 96/26277, и белок D(1/3)-E7, раскрытый в патенте Великобритании 9717953.5 (PCT/EP98/05285). В предпочтительной профилактической или терапевтической вакцине против инфекции шейки матки HPV или рака композиция может включать антигены HPV 16 или 18. Например, L1 или L2 антигенные мономеры, или L1, или L2 антигены, представленные вместе как
- 40 вирусоподобная частица (VLP), или отдельный L1 белок, представленный отдельно в VLP или капсомерной структуре. Такие антигены, вирусоподобные частицы и капсомер, по сути, известны. См., например, WO 94/00152, WO 94/20137, WO 94/05792 и WO 93/02184.

- Дополнительные ранние белки могут быть включены по отдельности или как слитые
- 45 белки, такие как E7, E2 или предпочтительно F5, например; особенно предпочтительные варианты осуществления включают VLP, содержащую слитые белки L1E7 (WO 96/11272). Особенно предпочтительные антигены HPV 16 включают ранние белки E6 или F7 в слиянии с белком D-носителем с образованием слияний белка D-E6 или E7 от HPV

16, или их комбинаций; или комбинации Е6 или Е7 с L2 (WO 96/26277). Альтернативно, ранние белки Е6 и Е7 HPV 16 или 18 могут быть представлены в одной молекуле, предпочтительно слияние белка D-Е6/Е7. Такая вакцина необязательно может содержать один из двух или оба белка Е6 и Е7 от HPV 18, предпочтительно в форме слитого белка D-Е6 или D-Е7 или слитого белка D Е6/Е7. Вакцина по настоящему изобретению
 5 дополнительно может включать антигены от других штаммов HPV, предпочтительно от штаммов HPV 31 или 33.

Вакцины по настоящему изобретению, кроме того, включают антигены, полученные от паразитов, которые вызывают малярию. Например, предпочтительные антигены
 10 от *Plasmodia falciparum* включают RTS,S и TRAP. RTS является гибридным белком, включающим по существу всю С-терминальную часть белка циркумспорозоида (CS) *P. falciparum*, связанную посредством четырех аминокислот части preS2 поверхностного антигена вируса гепатита В с поверхностным (S) антигеном вируса гепатита В. Его полная структура раскрыта в международной патентной заявке №PCT/EP92/02591,
 15 опубликованной как WO 93/10152, в соответствии с которой испрашен приоритет по патентной заявке Великобритании №9124390.7. При экспрессии в дрожжах RTS продуцируется как липопротеидная частица, а при совместной экспрессии с S антигеном от HBV он продуцирует смешанную частицу, известную как RTS,S.

TRAP антигены описаны в международной патентной заявке №PCT/GB89/00895,
 20 опубликованной как WO 90/01496. Предпочтительным вариантом осуществления по настоящему изобретению является малярийная вакцина, где антигенный препарат включает комбинацию RTS,S и TRAP антигенов. Другими плазмодийными антигенами, которые являются вероятными кандидатами в компоненты малярийной вакцины, обеспечивающей защиту на разных стадиях жизненного цикла, являются MSP1, AMA1,
 25 MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, секвестрин, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 *P. faciparum* и их аналоги в *Plasmodium spp.*

Соответственно, конкретный раскрытый в настоящем документе вариант осуществления относится к антигену, который получен по меньшей мере из одного
 30 инфекционного патогена, такого как бактерия, вирус или гриб, включая актинобактерию, такую как *M. tuberculosis* или *M. leprae*, или другую микобактерию; бактерию, такую как представитель рода *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia*, *Chlamydia* или *Bordetella*; вирус, такой как вирус простого герпеса, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус иммунодефицита кошек (ВИК), цитомегаловирус, вирус ветряной оспы,
 35 вирус гепатита, вирус Эпштейна-Барра (EBV), респираторный синцитиальный вирус, вирус папилломы человека (HPV) и цитомегаловирус; ВИЧ, такой как ВИЧ-1 или ВИЧ-2; гриб, такой как *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* и *Pneumocysti* или дрожжи, включая виды *Candida*, такие как *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis*; паразит, такой как простейшее, например, виды *Plasmodium*, включая *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale*; или другой паразит, такой как один или
 40 несколько из *Acanthamoeba*, *Entamoeba histolytica*, *Angiostrongylus*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Cryptosporidium*, *Ancylostoma*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Wuchereria bancrofti*, *Giardia* и *Leishmania*.

Например, в вариантах осуществления содержащей GLA вакцины, включающей антигены, полученные из *Borrelia sp.*, антигены могут включать нуклеиновую кислоту, полученный из патогена антиген или антигенные препараты, рекомбинантно
 45 полученный белок или пептиды и химерные слитые белки. Одним таким антигеном

является OspA. OspA может быть полностью зрелым белком в липидированной форме посредством его биосинтеза в клетке-хозяине (Lipo-OspA) или, альтернативно, может быть нелипидированным производным. Такие нелипидированные производные включают нелипидированный слитый белок NS1-OspA, который имеет первые 81 N-терминальную аминокислоту неструктурного белка (NS1) вируса гриппа, полный белок OspA и другие, MDP-OspA является нелипидированной формой OspA, несущей 3 дополнительные N-концевые аминокислоты.

В данной области известны композиции и способы для идентификации субъектов, инфицированных или предположительно подверженных риску инфекции инфекционным патогеном, как описано в настоящем документе.

Например, бактерия *Mycobacterium tuberculosis* вызывает туберкулез (ТВ). Бактерии обычно поражают легкие, но также могут поражать почку, позвоночник и мозг. Если не лечить ТВ надлежащим образом, он может привести к летальному исходу.

Заболевание передается от одного человека другому воздушно-капельным путем, когда инфицированный человек чихает или кашляет. В 2003 году в Соединенных Штатах было зарегистрировано более 14000 случаев ТВ.

Хотя обычно с туберкулезом можно бороться с использованием длительной антибиотической терапии, такое лечение является недостаточным для профилактики распространения заболевания, и существуют проблемы, касающиеся потенциального отбора устойчивых к антибиотикам штаммов. Инфицированные индивидуумы могут быть бессимптомными, но инфекционными в течение некоторого времени. Кроме того, хотя соблюдение режима лечения является важным, поведение пациента трудно контролировать. Некоторые пациенты не заканчивают курс лечения, что может привести к неэффективному лечению и развитию устойчивости к лекарственным средствам (например, патент США №7087713).

На сегодняшний день вакцинация живыми бактериями является наиболее действенным способом индукции защитного иммунитета к туберкулезу. Наиболее распространенной *Mycobacterium*, используемой для этой цели, является бацилла Кальметта-Герена (BCG), авирулентный штамм *Mycobacterium bovis*. Однако безопасность и эффективность BCG порождают споры, и в некоторых странах, таких как Соединенные Штаты, основную часть населения не вакцинируют. Диагностика обычно осуществляется с использованием кожной пробы, которая включает внутрикожное воздействие туберкулинового PPD (производное очищенного белка). Антиген-специфические Т-клеточные ответы дают в результате измеряемое отверждение на участке инъекции через 48-72 часа после инъекции, которое указывает на воздействие микобактериальных антигенов. Однако у этой пробы были проблемы чувствительности и специфичности, и индивидуумов, вакцинированных BCG, нельзя отличить от инфицированных индивидуумов (например, патент США №7087713).

Хотя макрофаги, как было показано, действуют как основные эффекторы иммунитета к *M. tuberculosis*, Т-клетки являются преобладающими индукторами такого иммунитета. Важная роль Т-клеток в защите от инфекции *M. tuberculosis* иллюстрируется частотой встречаемости *M. tuberculosis* у больных СПИД вследствие истощения CD4 Т-клеток, связанного с инфекцией вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Реагирующие на *Mycobacterium* CD4 Т-клетки, как было показано, являются мощными продуцентами гамма-интерферона (IFN γ), который, как было показано, в свою очередь, запускает противомикобактериальные эффекты макрофагов у мышей. Хотя роль IFN γ у людей менее понятна, исследования показали, что 1,25-дигидрокси-витамин D3, или отдельно, или в сочетании с IFN γ или фактором некроза опухоли-альфа, активирует макрофаги

человека с ингибированием инфекции *M. tuberculosis*. Более того, известно, что IFN γ стимулирует макрофаги человека с образованием 1,25-дигидроксид-витамина D3.

Подобным образом, IL-12, как было показано, играет роль в стимулировании устойчивости к инфекции *M. tuberculosis*. Для обзора иммунологии инфекции *M. tuberculosis* см. Chan and Kaufmann, Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, Bloom (ed.), ASM Press. Washington, D.C. (1994).

Существующие соединения и способы диагностики туберкулеза или индукции защитного иммунитета против туберкулеза включают применение полипептидов, которые содержат по меньшей мере одну иммуногенную часть одного или нескольких

белков *Mycobacterium* и молекулы ДНК, кодирующие такие полипептиды. Диагностические наборы, содержащие такие полипептиды или последовательности ДНК и подходящий выявляющий реагент, могут быть использованы для выявления инфекции *Mycobacterium* у пациентов и в биологических образцах. Также предусмотрены антитела, направленные против таких полипептидов. Кроме того, такие соединения могут быть включены в состав вакцин и/или фармацевтических композиций для иммунизации против инфекции *Mycobacterium* (патенты США №№6949246 и 6555653).

Малярия была ликвидирована во многих частях света в 1960-е годы, но болезнь все еще сохраняется, и появляются новые штаммы возбудителя данной болезни, которые устойчивы к существующим лекарственным средствам. Малярия является главной проблемой здравоохранения более чем в 90 странах. Девять из десяти случаев малярии возникают в странах Африки, расположенных к югу от Сахары. Более одной трети мирового населения подвергается риску, и от 350 до 500 миллионов человек заражаются малярией каждый год. Сорок пять миллионов беременных женщин подвергаются риску заражения малярией в этом году. Из тех индивидуумов, которые уже инфицированы, более чем 1 миллион умирает каждый год от этой предотвратимой болезни. Большинство среди умерших - это дети в Африке.

Малярия обычно передается, когда человека кусает инфицированная самка *Anopheles mosquito*. Для передачи комар должен быть инфицирован путем высасывания крови у человека, уже инфицированного малярией. Малярия вызывается паразитом, и клинические симптомы болезни включают лихорадку и гриппоподобное состояние, такое как озноб, головная боль, боли в мышцах и утомляемость. Эти симптомы могут сопровождаться тошнотой, рвотой и диареей. Малярия также может вызывать анемию и желтуху, поскольку утрачиваются красные кровяные клетки. Инфекция одним типом малярии, *Plasmodium falciparum*, без своевременного лечения может вызвать почечную недостаточность, судороги, спутанность сознания, кому и смерть.

Известен способ диагностирования *in vitro* для малярии у индивидуума, включающий приведение ткани или биологической жидкости, взятой у индивидуума, в контакт с молекулой или полипептидной композицией, где указанная молекула или полипептидная композиция включает один или несколько пептидных последовательностей, несущих все или часть одного или нескольких Т-эпитопов белков, являющихся результатом инфекционной активности *P. falciparum*, при условиях, обеспечивающих возникновение иммунной реакции *in vitro* между указанной композицией и антителами, которые могут присутствовать в ткани или биологической жидкости, и выявление сформированного комплекса антиген-антитело *in vitro* (см., например, патент США №7087231).

Были описаны экспрессия и очистка рекомбинантного эктодомена AMA-1 *Plasmodium falciparum* (3D7). Существующие ранее способы производили высокоочищенный белок, который сохраняет складчатость и дисульфидную связь нативной молекулы.

Рекомбинантный AMA-1 используется как диагностический реагент, а также в получении

антител, и как белок для применения отдельно или в виде части вакцины для предупреждения малярии (патент США №7029685).

В данной области были описаны полинуклеотиды, которые кодируют видоспецифические малярийные пептидные антигены *P. vivax*, являющиеся белками или фрагментами белков, секретируемыми в плазму восприимчивого млекопитающего-хозяина после инфекции, как и моноклональные или поликлональные антитела, направленные против этих антигенов. Пептидные антигены, моноклональные антитела и/или поликлональные антитела используются в анализах, применяемых для диагностики малярии, а также для установления, является ли *Plasmodium vivax* видом, вызывающим инфекцию (патент США №6706872). Также сообщалось о видоспецифических малярийных пептидных антигенах *P. vivax*, которые являются белками или фрагментами белков, секретируемыми в плазму восприимчивого млекопитающего-хозяина после инфекции, как и о моноклональных или поликлональных антителах, направленных против этих антигенов. Пептидные антигены, моноклональные антитела и/или поликлональные антитела используются в анализах, применяемых для диагностики малярии, а также для установления, является ли *Plasmodium vivax* видом, вызывающим инфекцию (см., например, патент США №6231861).

Рекомбинантный АМА-1 эктодомен *Plasmodium falciparum* (3D7) также был экспрессирован способом, который обеспечивает получение высокоочищенного белка, сохраняющего складчатость и дисульфидную связь нативной молекулы. Рекомбинантный АМА-1 используется как диагностический реагент, для применения в получении антител, и как вакцина (патент США №7060276). Аналогично, известны экспрессия и очистка рекомбинантного MSP-1₄₂ *Plasmodium falciparum* (3D7), который сохраняет складчатость и дисульфидную связь нативной молекулы. Рекомбинантный MSP-1₄₂ используется как диагностический реагент, для применения в получении антител, и как вакцина (патент США №6855322).

Диагностические способы для выявления малярийных инфекций у человека с идентификацией субъекта, инфицированного или предположительно подверженного риску инфекции малярийным инфекционным патогеном, таким образом, известны в соответствии с настоящим и связанными с ним раскрытиями. В частности, например, образцы крови объединяются с реагентом, содержащим 3-ацетилпиридинадениндинуклеотид (APAD), субстрат (например, соль молочной кислоты или молочную кислоту) и буфер. Реагент предназначен для выявления присутствия уникального гликолитического фермента, продуцируемого малярийным паразитом. Этот фермент известен как паразитарная лактатдегидрогеназа (PLDH). PLDH легко отличить от LDH хозяина с использованием описанного выше реагента. Комбинация реагента с зараженным паразитом образцом крови дает в результате восстановление APAD. Однако APAD не восстанавливается действием LDH хозяина. Затем восстановленный APAD может быть выявлен различными методиками, включая спектральный, флуориметрический, электрофоретический или колориметрический анализ. Выявление восстановленного APAD упомянутым выше способом представляет положительное указание на малярийную инфекцию (например, патент США №5124141). В другом методе диагностики малярии полипептид, включающий характерную аминокислотную последовательность, происходящую от антигена GLURP *Plasmodium falciparum*, распознается в опытном образце специфическим антителом, индуцированным против полипептида или реагирующим с полипептидом (патент США №5231168).

Лейшманиоз является широко распространенной паразитарной болезнью с частыми эпидемиями на Индостане, в Африке и Латинской Америке, и разработка вакцины

является приоритетом Всемирной организации здравоохранения. В комплексе различных заболеваний паразиты *Leishmania* вызывают летальные инфекции внутренних органов, а также тяжелое заболевание кожи. Одной из наиболее изнуряющих форм лейшманиоза является обезображивающая инфекция носа и рта. Число случаев лейшманиоза увеличивается, и в настоящее время во многих областях он выходит из-под контроля. Лейшманиоз также появляется в некоторых развитых странах, особенно в Южной Европе, как результат ВИЧ-инфекции. Имеющиеся лекарственные средства являются токсичными, дорогими и требуют длительных ежедневных инъекций.

Возбудители *Leishmania* являются простейшими паразитами, которые поселяются в макрофагах или белых кровяных клетках иммунной системы. Паразиты передаются при укусе небольших кровососущих насекомых (москитов), которых трудно контролировать, поскольку они обитают на обширных территориях планеты.

Висцеральный лейшманиоз является наиболее опасным из трех проявлений болезни. Предполагается, что каждый год возникает около 500000 новых случаев висцеральной формы (кала-азар, или «смертельная болезнь»). Более 200 миллионов человек на сегодняшний день подвергаются риску заражения висцеральным лейшманиозом. Свыше 90 процентов случаев висцерального лейшманиоза возникает в Индии, Бангладеше, Судане, Бразилии и Непале. Большинство смертей случается среди детей. Часто кожа остается обезображенной навсегда.

Инфекции *Leishmania* трудно диагностировать, и обычно предусматривается гистопатологический анализ образцов тканевой биопсии. Однако были разработаны некоторые серологические и иммунологические диагностические анализы (патент США №7008774; Senaldi et al., (1996) J. Immunol. Methods 193:9 5; Zijlstra, et al., (1997) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91:671 673; Badaro et al., (1996) J. Inf. Dis. 173:758 761; Choudhary, S. et al., (1992) J. Comm. Dis. 24:32 36; Badaro, R. et al., (1986) Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:72 78; Choudhary, A. et al., (1990) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84:363 366; и Reed, S. G. et al., (1990) Am. J. Trop. Med. Hyg. 43:632 639). Промастиготы высвобождают продукты метаболизма в культуральную среду с образованием кондиционированной среды. Эти продукты метаболизма являются иммуногенными для хозяина. См. Schnur, L. F. et al., (1972) Isrl. J. Med. Sci. 8:932 942; Sergeiev, V. P. et al., (1969) Med. Parasitol. 38:208 212; El-On, J. et al., (1979) Exper. Parasitol. 47:254 269; and Bray, R. S. et al., (1966) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 60:605 609; патенты США №№6846648, 5912166; 5719263; 5411865).

Приблизительно 40 миллионов человек во всем мире инфицированы ВИЧ, вирусом, который вызывает СПИД. Приблизительно 3 миллиона человек умирают от этой болезни каждый год, 95 процентов из них - в развивающихся странах. Каждый год приблизительно 5 миллионов человек становятся инфицированными ВИЧ. На сегодняшний день в расположенной к югу от Сахары Африке наблюдается наивысшая заболеваемость этой болезнью, но она быстро распространяется на другие страны, такие как Индия, Китай и Россия. Эпидемия распространяется наиболее быстро среди представителей меньшинств. В Соединенных Штатах с 1981 года было зарегистрировано более 950000 случаев СПИД. СПИД поражает людей в самом продуктивном возрасте. Женщины по биологическим и социальным причинам имеют повышенный риск заражения ВИЧ/СПИД.

СПИД вызывается вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который убивает и поражает клетки иммунной системы организма и постепенно уничтожает способность организма бороться с инфекциями и определенными типами злокачественных опухолей. Часто всего ВИЧ передается при незащищенном половом контакте с инфицированным партнером. Наиболее надежное решение этой проблемы заключается в предотвращении

распространения вируса. Создание безопасной, эффективной и доступной вакцины против ВИЧ является одним из путей достижения этой цели. Во всем мире эффективная профилактика доступна менее чем одному из пяти человек с высоким риском инфицирования ВИЧ.

5 Известны способы диагностирования инфекций ВИЧ, включающие вирусную культуру, ПЦР доказательных последовательностей нуклеиновых кислот из образцов пациента и тесты антител на присутствие антител к ВИЧ в сыворотке пациента (см., например, патенты США №№6979535, 6544728, 6316183, 6261762, 4743540).

Согласно некоторым другим вариантам осуществления, как раскрыто в настоящем документе, вакцинные композиции, связанные с ними составы и способы применения 10 могут включать антигены, которые получены из злокачественной клетки, поскольку могут быть пригодны для иммунотерапевтического лечения различных типов злокачественных опухолей. Например, адъювантный состав может найти применение в сочетании с антигенами отторжения опухоли, например, антигенами рака простаты, 15 молочной железы, колоректального, легкого, поджелудочной железы, почечного или меланомы. Типичные злокачественные или полученные из злокачественных клеток антигены включают MAGE 1, 3 и MAGE 4 или другие антигены MAGE, такие как раскрытые в WO 99/40188, PRAME, BAGE, Lage (также известный как NY Eos 1) SAGE и HAGE (WO 99/53061) или GAGE (Robbins and Kawakami, 1996 Current Opinions in 20 Immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (1997 & 1998); Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p. 293). Эти неограничивающие примеры злокачественных антигенов экспрессированы в широком диапазоне типов опухолей, таких как меланома, карцинома легких, саркома и карцинома мочевого пузыря. См., например, патент США №6544518.

25 Другие опухолеспецифические антигены, подходящие для применения с GLA в соответствии с определенными раскрытыми в настоящем документе вариантами осуществления, включают без ограничения опухолеспецифические или связанные с опухолью ганглиозиды, такие как GM₂ и GM₃, или их конъюгаты с белками-носителями; 30 или антиген для применения в GLA вакцинной композиции для индукции или усиления иммунного ответа против злокачественной опухоли может быть аутологичным пептидным гормоном, таким как полноразмерный гонадотропин-высвобождающий гормон (GnRH, WO 95/20600), короткий пептид длиной 10 аминокислот, применимый в лечении многих типов злокачественных опухолей. В другом варианте осуществления используют антигены простаты, такие как специфический антиген простаты (PSA), 35 PAP, PSCA (например, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95(4) 1735-1740 1998), PSMA, или в предпочтительном варианте осуществления антиген, известный как простаза (например, Nelson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 3114-3119; Ferguson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999. 96, 3114-3119; WO 98/12302; патент США №5955306; WO 98/20117; патенты США №№5840871 и 5786148; WO 00/04149. Другие специфические антигены простаты 40 известны из WO 98/137418 и WO /004149. Еще одним является STEAP (PNAS 96 14523 14528 7-12 1999).

Другие связанные с опухолью антигены, применимые в контексте настоящего изобретения, включают Plu-1 (J Biol. Chem 274 (22) 15633-15645, 1999), HASH-1, HasH-2, Cripto (Salomon et al. Bioessays 199, 21:61-70, патент США №5654140) и криптин (патент 45 США №5981215). Кроме того, антигены, особенно применимые в вакцинах для лечения злокачественных опухолей, также включают тирозиназу и сурвивин.

В настоящем документе раскрыты варианты осуществления, касающиеся содержащих GLA вакцинных композиций, содержащих раковый антиген, которые будут применимы

против любого типа злокачественной опухоли, характеризующегося экспрессией связанного с опухолью антигена, например, экспрессией HER-2/neu или других специфических для злокачественной опухоли или связанных со злокачественной опухолью антигенов.

- 5 Диагностика злокачественной опухоли у субъекта, имеющего или предположительно подверженного риску развития злокачественной опухоли, может быть выполнена любым из широкого диапазона принятых в данной области методов, которые могут варьировать в зависимости от ряда факторов, включая клиническую картину, степень развития злокачественной опухоли, тип злокачественной опухоли и другие факторы.
- 10 Примеры методов диагностики злокачественной опухоли включают гистопатологическое, гистоцитохимическое, иммуногистоцитохимическое и иммуногистопатологическое исследование образцов пациента (например, крови, кожной биопсии, биопсии других тканей, хирургических препаратов и т.д.), ПЦР-тесты на определенные гены (например, нуклеиновая кислота) маркеры, серологические тесты
- 15 на циркулирующие связанные со злокачественной опухолью антигены или клетки, несущие такие антигены, или на антитела определенной специфичности, или другие методы, которые известны специалисту в данной области. См., например, патенты США №№6734172; 6770445; 6893820; 6979730; 7060802; 7030232; 6933123; 6682901; 6587792; 6512102; 7078180; 7070931; патентный документ Японии 5-328975; Waslylyk et al., 1993 Eur. J. Bioch. 211(7):18.
- 20

- Вакцинные композиции и способы в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения также могут быть использованы для профилактики или лечения аутоиммунных заболеваний, которые включают заболевания, состояния или нарушения, при которых иммунная система хозяина или субъекта
- 25 вредоносно опосредует иммунный ответ, который направлен против «своих» тканей, клеток, биомолекул (например, пептидов, полипептидов, белков, гликопротеидов, липопротеидов, протеолипидов, липидов, гликолипидов, нуклеиновых кислот, таких как РНК и ДНК, олигосахаридов, полисахаридов, протеогликанов, гликозаминогликанов или т.п., и других молекулярных компонентов клеток и тканей
- 30 субъектов) или эпитопов, например, специфических иммуноопределенных распознаваемых структур, таких как распознаваемые определяющим комплементарность (гипервариабельным) участком (CDR) вариабельной области антитела или CDR Т-клеточного рецептора.

- Аутоиммунные заболевания, таким образом, характеризуются аномальным
- 35 иммунным ответом, вовлекающим или клетки, или антитела, которые в любом случае направлены против нормальных аутологических тканей. Аутоиммунные заболевания у млекопитающих в целом могут быть классифицированы в одну из двух различных категорий: клеточно-опосредованное заболевание (т.е. Т-клеточное) или опосредованные антителами нарушения. Неограничивающие примеры клеточно-опосредованных
- 40 аутоиммунных заболеваний включают рассеянный склероз, ревматоидный артрит, тиреоидит Хашимото, сахарный диабет 1 типа (ювенильный диабет) и аутоиммунный увеоретинит. Опосредованные антителами аутоиммунные нарушения включают без ограничения миастению гравис, системную красную волчанку (или СКВ), болезнь Грейвса, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунную тромбоцитопению,
- 45 аутоиммунную бронхиальную астму, криоглобулинемию, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, первичный склероз желчных путей и пернициозную анемию. Антиген(ы), связанный(е) с системной красной волчанкой, представляет(ют) собой малые ядерные рибонуклеопротеины (snRNP); связанный с болезнью Грейвса

представляет собой тиреотропиновый рецептор, тиреоглобулин и другие компоненты эпителиальных клеток щитовидной железы (Akamizu et al., 1996; Kellerman et al., 1995; Raju et al., 1997; и Texier et al., 1992); связанный с пузырьчаткой представляет собой кадгерин-подобные пемфигусные антигены, такие как десмоглеин-3 и другие адгезивные молекулы (Memar et al., 1996; Stanley, 1995; Plott et al., 1994; и Hashimoto, 1993); а связанный с тромбоцитической тромбоцитопенической пурпурой представляет собой антигены тромбоцитов (см., например, патент США №6929796; Gorski et al. (Eds.), Autoimmunity, 2001, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA; Radbruch and Lipsky, P.E. (Eds.) Current Concepts in Autoimmunity and Chronic Inflammation (Curr. Top. Microbiol. and Immunol.) 2001, Springer, NY).

Аутоиммунитет играет роль более чем в 80 различных заболеваниях, включая диабет 1 типа, рассеянный склероз, волчанку, ревматоидный артрит, склеродермию и болезни щитовидной железы. Интенсивные количественные оценки заболеваемости для большинства аутоиммунных заболеваний отсутствуют. Самые последние исследования, проведенные в конце 1990-ых, показывают, что аутоиммунные заболевания являются третьей наиболее распространенной группой серьезных заболеваний в Соединенных Штатах; и наиболее распространенные аутоиммунные заболевания поражают более чем 8,5 миллионов американцев. Текущие оценки распространенности заболевания варьируют от 5 до 8 процентов населения Соединенных Штатов. Большинство аутоиммунных заболеваний непропорционально поражают женщин. У женщин в 2,7 раза чаще, чем у мужчин, развивается аутоиммунное заболевание. Женщины более предрасположены к аутоиммунным заболеваниям, мужчины, как представляется, имеют более высокие уровни природной активности клеток-киллеров, чем женщины (Jacobsen et al., Clinical Immunology and Immunopathology, 84:223-243, 1997).

Аутоиммунные заболевания возникают, когда иммунная система ошибочно принимает свои ткани за чужие и неадекватно атакует их. Организм может быть по-разному поражен аутоиммунными заболеваниями, включая, например, кишечник (болезнь Крона) и головной мозг (рассеянный склероз). Известно, что аутоантитело атакует собственные клетки или собственные ткани с поражением их функции и в результате вызывает аутоиммунные заболевания, и что аутоантитело может быть выявлено в сыворотке пациента до фактического проявления аутоиммунного заболевания (например, появления клинических признаков и симптомов). Выявление аутоантитела, таким образом, позволяет раннее обнаружение или распознавание наличия или риска развития аутоиммунного заболевания. На основе этих показателей был обнаружен ряд аутоантител против аутоантигенов, и в клинических тестах были измерены аутоантитела против аутоантигенов (например, патенты США №№6919210, 6596501, 7012134, 6919078), тогда как другие виды аутоиммунной диагностики могут включать выявление соответствующего метаболита (например, патент США №4659659) или иммунологической реактивности (например, патенты США №№4614722, 5147785, 4420558, 5298396, 5162990, 4420461, 4595654, 5846758 и 6660487).

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению будут особенно применимы в лечении пожилых людей и/или людей с подавленным иммунитетом, включая субъектов на почечном диализе, субъектов на химиотерапии и/или лучевой терапии, реципиентов трансплантата и т.п. Такие индивидуумы обычно проявляют ослабленные иммунные ответы на вакцины, и, следовательно, применение композиций по настоящему изобретению может усилить иммунные ответы у этих субъектов.

В других вариантах осуществления антиген или антигены, использованные в

композициях по настоящему изобретению, включают антигены, связанные с респираторными заболеваниями, например, вызванными или осложненными бактериальной инфекцией (например, пневмококковой), для профилактики и лечения состояний, таких как хроническая обструктивная легочная болезнь (ХОБЛ). ХОБЛ физиологически определяется присутствием необратимой или частично обратимой обструкции дыхательных путей у пациентов с хроническим бронхитом и/или эмфиземой (Am J Respir Crit Care Med. 1995 Nov; 152(5 Pt 2):S77-121). Обострения ХОБЛ часто вызываются бактериальной (например, пневмококковой) инфекцией (Clin Microbiol Rev. 2001 Apr; 14(2):336-63). В конкретном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению включает GLA адъювант, как описано в настоящем документе, в сочетании с пневмококковой вакциной Prevnar® (Wyeth).

В следующих вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению, содержащие описанный в настоящем документе GLA, использованы в лечении аллергических состояний. Например, в конкретном варианте осуществления композиции используют в десенсибилизирующей терапии аллергии. Такая терапия включает стимуляцию иммунной системы поэтапно повышающимися дозами веществ, к которым у человека аллергия, при этом вещества сформулированы в композиции, содержащие GLA. В конкретных вариантах осуществления композиции используются в лечении аллергий на пищевые продукты, пыльцу, клещей, кошек или жалящих насекомых (например, пчел, шершней, настоящих ос, ос, немок, муравьев Рихтера).

TLR

Как описано в настоящем документе, определенные варианты осуществления по настоящему изобретению предусматривают вакцинные композиции и композиции иммунных адъювантов, включая фармацевтические композиции, которые содержат кроме GLA соединения(й) по настоящему изобретению один или несколько агонистов Toll-подобных рецепторов (агонистов TLR). Toll-подобные рецепторы (TLR) включают трансмембранные рецепторы поверхности клеток системы врожденного иммунитета, которые придают клеткам-хозяевам способность к распознаванию на ранней фазе ряда консервативных микробных молекулярных структур, которые могут присутствовать в большом числе или на большом числе инфекционных патогенов (например, Armant et al., 2002 Genome Biol. 3(8): reviews 3011.1-3011.6; Fearon et al., 1996 Science 272:50; Medzhitov et al., 1997 Curr. Opin. Immunol. 9:4; Luster 2002 Curr. Opin. Immunol. 14:129; Lien et al. 2003 Nat. Immunol. 4:1162; Medzhitov, 2001 Nat. Rev. Immunol. 1:135; Takeda et al., 2003 Ann Rev Immunol. 21:335; Takeda et al. 2005 Int. Immunol. 17:1; Kaisho et al., 2004 Microbes Infect. 6:1388; Datta et al., 2003 J. Immunol. 170:4102).

Индукция опосредованной TLR передачи сигнала для усиления инициации иммунных ответов посредством системы врожденного иммунитета может находиться под влиянием агонистов TLR, которые соединяются с TLR клеточной поверхности. Например, липополисахарид (LPS) может быть агонистом TLR, а именно TLR2 или TLR4 (Tsan et al., 2004 J. Leuk. Biol. 76:514; Tsan et al., 2004 Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286:C739; Lin et al., 2005 Shock 24:206); поли(инозинцитидин) (polyI:C) может быть агонистом TLR, а именно TLR3 (Salem et al., 2006 Vaccine 24:5119); CpG последовательности (олигодезоксинуклеотиды, содержащие неметилированный цитозин-гуанозин или «CpG» динуклеотидные мотивы, например, CpG 7909, Cooper et al., 2005 AIDS 19:1473; CpG 10101 Bayes et al. Methods Find Exp Clin Pharmacol 27:193; Vollmer et al. Expert Opinion on Biological Therapy 5:673; Vollmer et al., 2004 Antimicrob. Agents Chemother. 48:2314; Deng et al., 2004 J. Immunol. 173:5148) могут быть агонистами TLR, а именно TLR9 (Andaloussi et al., 2006 Glia 54:526; Chen et al., 2006 J. Immunol. 177:2373); пептидогликаны могут быть

агонистами TLR2 и/или TLR6 (Soboll et al., 2006 Biol. Reprod. 75:131; Nakao et al., 2005 J. Immunol. 174:1566); 3M003 (4-амино-2-(этоксиметил)- α,α -диметил-6,7,8,9-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-1-этанолгидрат, молекулярная масса 318 Да от 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN, который также является источником родственных соединений 3M001 и 3M002; Gorden et al., 2005 J. Immunol. 174:1259) может быть агонистом TLR7 (Johansen 2005 Clin. Exp. Allerg. 35:1591) и/или агонистом TLR8 (Johansen 2005); флагеллин может быть агонистом TLR5 (Feuillet et al., 2006 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:12487); а антигены гепатита С могут действовать как агонисты TLR, а именно TLR7 и/или TLR9 (Lee et al., 2006 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:1828; Horsmans et al., 2005 Hepatol. 42:724). Другие агонисты TLR известны (например, Schirmbeck et al., 2003 J. Immunol. 171:5198) и могут быть использованы согласно определенным описанным в настоящем документе вариантам осуществления.

Например, в порядке пояснения (см., например, патент США №6544518), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, содержащие неметилированные CpG динуклеотиды («CpG»), известны в качестве адъювантов при введении и системным, и мукозальным путями (WO 96/02555, европейский патент №468520, Davis et al., J. Immunol., 1998. 160(2):870-876; McCluskie и Davis, J. Immunol., 1998, 161(9):4463-6). CpG является аббревиатурой для мотивов цитозин-гуанозинового динуклеотида, присутствующих в ДНК. Центральная роль CG мотива в иммуностимуляции была объяснена Krieg, Nature 374, p546 1995. Подробный анализ показал, что CG мотив должен находиться в контексте определенной последовательности, и что такие последовательности являются обычными в бактериальной ДНК, но редко встречаются в ДНК позвоночных. Иммуностимулирующей последовательностью часто является: пурин, пурин, С, G, пиримидин, пиримидин; где динуклеотидный CG мотив является неметилированным, но другие неметилированные CpG последовательности, как известно, являются иммуностимулирующими и могут быть использованы в определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению. CpG, когда составлен в вакцины, может быть введен в свободном растворе вместе со свободным антигеном (WO 96/02555; McCluskie и Davis, выше) или ковалентно конъюгированным с антигеном (WO 98/16247), или составлен с носителем, таким как гидроксид алюминия (например, Davis et al. выше, Brazolot-Millan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95(26), 15553-8).

Предпочтительные олигонуклеотиды для применения в адъювантах или вакцинах по настоящему изобретению предпочтительно содержат два или более динуклеотидных CpG мотивов, разделенных по меньшей мере тремя, более предпочтительно, по меньшей мере шестью или более нуклеотидами. Олигонуклеотиды по настоящему изобретению типично являются дезоксинуклеотидами. В предпочтительном варианте осуществления межнуклеотидный мостик в олигонуклеотиде является фосфородитиоатом или, более предпочтительно, фосфоротиоатной связью, хотя фосфодиэфирная и другие межнуклеотидные связи подпадают под объем настоящего изобретения, включая олигонуклеотиды со смешанными межнуклеотидными связями. Способы получения фосфоротиоатных олигонуклеотидов или фосфородитиоата описаны в патентах США №№5666153, 5278302 и в WO 95/26204.

Примеры предпочтительных олигонуклеотидов имеют последовательности, которые раскрыты в следующих публикациях; для определенных раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления последовательности предпочтительно содержат фосфоротиоатные модифицированные межнуклеотидные связи:

CPG 7909: Cooper et al., «CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults». AIDS, 2005 Sep 23; 19(14):1473-9.

CpG 10101: Bayes et al., «Gateways to clinical trials». Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2005 Apr; 27(3):193-219.

Vollmer J., «Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9». Expert Opinion on Biological Therapy. 2005 May; 5(5): 673-682.

5 Альтернативные CpG олигонуклеотиды могут включать варианты предпочтительных последовательностей, описанные в процитированных выше публикациях, которые отличаются тем, что они имеют незначащие замены нуклеотидных последовательностей, их вставки, делеции и/или добавления. CpG олигонуклеотиды, использованные в определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, могут быть
10 синтезированы любым способом, известным в данной области (например, из европейского патента №468520). Удобно синтезировать такие олигонуклеотиды с использованием автоматического синтезатора. Как правило, олигонуклеотиды представляют собой дезоксинуклеотиды. В предпочтительном варианте осуществления межнуклеотидная связь в олигонуклеотиде является фосфородиэфирной или, более
15 предпочтительно, фосфотриэфирной связью, хотя фосфодиэфирные также подпадают под объем предусмотренных в данном документе вариантов осуществления. Также предусмотрены олигонуклеотиды, включающие различные межнуклеотидные связи, например, смешанные фосфотриэфирные и фосфодиэфирные. Также могут быть использованы другие межнуклеотидные связи, которые стабилизируют олигонуклеотид.

20 **Кoadъювант**

Определенные варианты осуществления, представленные в настоящем документе, включают вакцинные композиции и композиции иммунологических адъювантов, включая фармацевтические композиции, которые содержат, в дополнение к GLA соединению(ям), по меньшей мере один коадъювант, который относится к компоненту
25 таких композиций, обладает адъювантной активностью, но отличный от GLA. Кoadъювант, обладающий такой адъювантной активностью, включает композицию, которая при введении субъекту, такому как человек (например, человек-пациент), отличный от человека примат, млекопитающее или другой высший эукариотический организм, имеющий компетентную иммунную систему, способна изменять (т.е. повышать
30 или понижать статистически значимым образом, а в определенных предпочтительных вариантах осуществления усиливать или увеличивать) активность и/или длительность иммунного ответа (см., например, Powell и Newman, «Vaccine design - The Subunit and Adjuvant Approach», 1995, Plenum Press, New York). В определенных вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, GLA и желаемый антиген, а также
35 необязательно один или несколько коадъювантов, могут таким образом изменять, например, вызывать или усиливать, иммунный ответ, направленный против желаемого антигена, который может быть введен одновременно с GLA или отдельно по времени и/или пространству (например, в другой анатомический участок) в этом введении, но подразумевается, что определенные варианты осуществления по настоящему
40 изобретению не должны быть столь ограниченными и поэтому предусматривают также введение GLA в композиции, которая не включает точно определенный антиген, но которая может включать один или несколько из агониста TLR, коадъюванта, имидазохинолинолинового модификатора иммунного ответа и иммуномодификатора с двойной структурой «стебель-петля» (dSLIM).

45 Следовательно, и как отмечено выше, коадъюванты включают композиции, отличные от GLA, обладающие адъювантными эффектами, такие как сапонины и сапониновые миметики, включая QS21 и QS21 миметики (см., например, патент США №5057540; европейский патент №0362279B1; WO 95/17210), квасцы, растительные алкалоиды,

такие как томатин, детергенты, такие как (без ограничения) сапонин, полисорбат 80, Span 85 и стеарилтирозин, один или несколько цитокинов (например, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF α , IFN γ), имидазохинолиновый модификатор иммунного ответа и иммуномодификатор с двойной структурой «стебель-петля» (dSLIM, например, Weeratna et al., 2005 Vaccine 23:5263).

Детергенты, включая сапонины, описаны, например, в патенте США №6544518; Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996 Phytomedicine 2:363-386), в патенте США №5057540, Kensil, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55, и в европейском патенте №0362279B1. Структуры в форме частиц, названные иммуностимулирующими комплексами (ISCOMS), включающие фракции Quil A (сапонины), являются гемолитическими и были использованы для изготовления вакцин (Morein, B., европейский патент №0109942B1). Как сообщалось, эти структуры обладают адъювантной активностью (европейский патент №0109942B1; WO 96/11711). Гемолитические сапонины QS21 и QS17 (фракции Quil A, очищенные с помощью ВЭЖХ) были описаны как мощные системные адъюванты, а способ их получения раскрыт в патенте США №5057540 и европейском патенте №0362279B1. Также в этих ссылках описано применение QS7 (негемолитической фракции Quil-A), который действует как мощный адъювант для системных вакцин. Применение QS21 дополнительно описано Kensil et al. (1991. J. Immunology 146:431-437). Также известны комбинации QS21 и полисорбата или циклодекстрина (WO 99/10008). Адъювантные системы в форме частиц, включающие фракции QuilA, такие как QS21 и QS7, описаны в WO 96/33739 и WO 96/11711. Другие сапонины, которые были использованы в системных исследованиях вакцинации, включают сапонины, полученные из других видов растений, таких как *Gypsophila* и *Saponaria* (Bomford et al., Vaccine, 10(9):572-577, 1992).

Эсцин является другим детергентом, родственным сапонинам, для применения в адъювантных композициях в соответствии с вариантами осуществления, раскрытыми в настоящем документе. Эсцин описан в Merck Index (12^{ое} издание: запись 3737) как смесь сапонины, встречающегося в семени конского каштана *Aesculus hippocastanum*. Описано его выделение с помощью хроматографии и очистки (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)), а также с помощью ионообменных смол (Erbring et al., патент США №3238190). Фракции эсцина (также известные как аэсцин) были очищены и определены как биологически активные (Yoshikawa M. et al. (Chem Pharm Bull (Tokyo) 1996 August; 44(8): 1454-1464)). Другим детергентом, также описанным в Merck Index (12^{ое} издание: запись 3204) как сапонин, является дигитонин, который получен из семян *Digitalis purpurea* и очищен согласно методике, описанной Givold et al., J. Am. Pharm. Assoc., 1934, 23, 664; и Rubenstroth-Bauer, Physiol. Chem., 1955, 301, 621.

Другими коадъювантами для применения в соответствии с определенными раскрытыми в настоящем документе вариантами осуществления включают блок-сополимер или биоразлагаемый полимер, который относится к классу полимерных соединений, известных специалистам соответствующей области. Примеры блок-сополимера или биоразлагаемого полимера, которые могут быть включены в GLA вакцинную композицию или GLA иммунный адъювант, включают Pluronic® L121 (BASF Corp., Mount Olive, NJ; см., например, Yeh et al., 1996 Pharm. Res. 13:1693; патент США №5565209), CRL1005 (например, Triozzi et al., 1997 Clin Canc. Res. 3:2355), сополимер молочной и гликолевой кислоты (PLGA), полимолочную кислоту (PLA), сополимер D,L-лактида и гликолида (PLG) и polyI:C (см., например, Powell и Newman, «Vaccine design - The Subunit and Adjuvant Approach», 1995, Plenum Press, New York).

Определенные варианты осуществления предусматривают GLA вакцины и GLA

иммунные адъюванты, которые включают масло, которое в некоторых вариантах осуществления может способствовать коадъювантной активности, а в других вариантах осуществления может дополнительно или альтернативно представлять фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. Множество подходящих масел известно и может быть выбрано для включения в вакцинные композиции и композиции иммунных адъювантов на основе настоящего раскрытия. Примеры таких масел в качестве неограничивающей иллюстрации включают сквален, сквалан, минеральное масло, оливковое масло, холестерин и маннид-моноолеат.

Модификаторы иммунного ответа, такие как имидазохинолиновые модификаторы иммунного ответа, также известны в данной области и также могут быть включены в качестве коадъювантов в определенные раскрытые в настоящем документе варианты осуществления. Определенные предпочтительные имидазохинолиновые модификаторы иммунного ответа включают в качестве неограничивающего примера резиквимод (R848), имиквимод и гардиквимод (Hemmi et al., 2002 Nat. Immunol. 3:196; Gibson et al., 2002 Cell. Immunol. 218:74; Gorden et al., 2005 J. Immunol. 174:1259); эти и другие имидазохинолиновые модификаторы иммунного ответа при соответствующих условиях также могут обладать активностью агониста TLR, как описано в настоящем документе. Другими модификаторами иммунного ответа являются основанные на нуклеиновой кислоте иммуномодификаторы с двойной структурой «стебель-петля» (dSLIM).

Специфические примеры dSLIM, применение которых предусмотрено в определенных раскрытых в настоящем документе вариантах осуществления, могут быть найдены в Schmidt et al., 2006 Allergy 61:56; Weihrauch et al. 2005 Clin Cancer Res. 11(16): 5993-6001; Modern Biopharmaceuticals, J. Knäblein (Editor). John Wiley & Sons, December 6, 2005; (dSLIM обсуждался на страницах 183 - ~200), и в Mologen AG (Berlin, FRG: [найден в сети Интернет 8/18/06 на <http://www.mologen.com/English/04.20-dSLIM.shtml>]).

Как также отмечено выше, одним типом коадъюванта для применения с GLA, как описано в настоящем документе, могут быть алюминиевые коадъюванты, которые обычно упоминаются как «квасцы». Квасцовые коадъюванты основаны на следующих: оксигидроксид алюминия; гидроксифосфат алюминия или различные патентованные соли. Вакцины, в которых применяются квасцовые коадъюванты, могут включать вакцины против штаммов столбняка, HPV, гепатита А, инактивированного вируса полиомиелита и других антигенов, описанных в настоящем документе. Квасцовые коадъюванты являются предпочтительными, поскольку они характеризуются хорошим уровнем безопасности, усиливают ответы антител, стабилизируют антигены и относительно просты для серийного производства (Edelman 2002 Mol. Biotechnol. 21: 129-148; Edelman, R. 1980 Rev. Infect. Dis. 2:370-383).

Другие коадъюванты, которые могут быть скомбинированы с GLA для эффективной иммуностимуляции, включают сапонины и сапониновые миметики, включая QS21 и структурно родственные соединения, вызывающие подобные эффекты и упоминаемые в настоящем документе как QS21 миметики. QS21 был признан предпочтительным коадъювантом. QS21 может включать очищенную с помощью ВЭЖХ нетоксическую фракцию, полученную из коры *Quillaja saponaria Molina*. Получение QS21 раскрыто в патенте США №5057540 (см. также патенты США №№6936255, 7029678 и 6932972).

В определенных вариантах осуществления GLA также может быть скомбинирован с «иммуностимулирующими комплексами», известными как ISCOMS (например, патенты США №№6869607, 6846489, 6027732, 4981684), включающими полученный из сапонаина ISCOMATRIX®, доступный для приобретения, например, у Iscotec (Стокгольм, Швеция) и у CSL Ltd. (Парквилл, Виктория, Австралия).

Рекомбинантный экспрессирующий конструкт

В соответствии с определенными раскрытыми в настоящем документе вариантами осуществления GLA вакцинная композиция может содержать по меньшей мере один рекомбинантный экспрессирующий конструкт, который включает промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген. В следующих определенных вариантах осуществления рекомбинантный экспрессирующий конструкт присутствует в вирусном векторе, таком как аденовирусный, аденоассоциированный вирус, вирус герпес, лентивирусный, поксвирусный или ретровирусный вектор. Композиции и способы создания и использования таких экспрессирующих конструктов и векторов известны в данной области для экспрессии полипептидных антигенов, как представлено в настоящем документе, например, согласно Ausubel et al. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 2006 John Wiley & Sons, NY. Неограничивающие примеры рекомбинантных экспрессирующих конструктов большей частью могут быть найдены, например, в патентах США №№6844192; 7037712; 7052904; 7001770; 6106824; 5693531; 6613892; 6875610; 7067310; 6218186; 6783981; 7052904; 6783981; 6734172; 6713068; 5795577 и 6770445, а также где-либо еще, с раскрытиями, которые могут быть адаптированы к экспрессии полипептидных антигенов, представленных в настоящем документе, для применения в определенных раскрытых в настоящем документе вариантах осуществления.

Иммунный ответ

Таким образом, настоящее изобретение представляет композиции для изменения (т.е. усиления или уменьшения статистически значимым способом, например, относительно соответствующего контроля, как будет известно специалистам в данной области) иммунных ответов у хозяина, способного производить иммунный ответ. Как будет известно специалистам в данной области, иммунным ответом может быть любое активное изменение иммунного статуса хозяина, которое может включать любое изменение в структуре или функции одной или нескольких тканей, органов, клеток или молекул, которые участвуют в поддержании и/или регуляции иммунного статуса хозяина. Обычно иммунные ответы могут быть выявлены любым из ряда хорошо известных параметров, включая без ограничения *in vivo* или *in vitro* определение: растворимых иммуноглобулинов или антител; растворимых медиаторов, таких как цитокины, лимфокины, хемокины, гормоны, факторы роста и т.п., а также других растворимых низкомолекулярных пептидных, углеводных, нуклеотидных и/или липидных медиаторов; клеточных активационных изменений состояния, определенных измененными функциональными или структурными особенностями клеток иммунной системы, например, клеточная пролиферация, измененная подвижность, индукция специализированных активностей, таких как специфическая генная экспрессия или цитолитическое поведение; клеточной дифференцировки клетками иммунной системы, включая измененные профили экспрессии поверхностных антигенов или наступление апоптоза (программированной клеточной смерти); или любого другого критерия, по которому может быть выявлено наличие иммунного ответа.

Часто иммунные ответы могут рассматриваться, например, как способность клеток и тканей иммунной системы хозяина различать свои и чужие структуры на молекулярном и клеточном уровнях, но настоящее изобретение не должно быть ограничено этим. Например, иммунные ответы также могут включать изменения состояния иммунной системы, которые возникают в результате иммунного распознавания своих молекул, клеток или тканей и могут сопровождать множество нормальных состояний, таких как

типичная регуляция компонентов иммунной системы, или могут присутствовать при патологических состояниях, таких как неадекватные аутоиммунные ответы, наблюдаемые при аутоиммунных и дегенеративных заболеваниях. В качестве другого примера, в дополнение к индукции стимулирующей регуляцией специфических активностей иммунной системы (таких как продуцирование антител и/или цитокинов или активация опосредованного клетками иммунитета) иммунные ответы также могут включать супрессию, ослабление или любую другую понижающую регуляцию выявляемого иммунитета, которые могут быть следствием выбранного антигена, пути введения антигена, индукции специфической толерантности или других факторов.

Установление индукции иммунного ответа вакцинами по настоящему изобретению может быть осуществлено любым из ряда иммунологических анализов, хорошо известных среднему специалисту в данной области техники. Такие анализы включают без ограничения *in vivo* или *in vitro* определение: растворимых антител; растворимых медиаторов, таких как цитокины, лимфокины, хемокины, гормоны, факторы роста и т.п., а также других растворимых низкомолекулярных пептидных, углеводных, нуклеотидных и/или липидных медиаторов; клеточных активационных изменений состояния, определенных измененными функциональными или структурными особенностями клеток иммунной системы, например, клеточной пролиферации, измененной подвижности, индукции специализированных активностей, таких как специфическая генная экспрессия или цитолитическое поведение; клеточной дифференцировки клетками иммунной системы, включая измененные профили экспрессии поверхностных антигенов или наступление апоптоза (программированной клеточной смерти). Описания процедур выполнения этих и подобных анализов широко известны и могут быть найдены, например, у Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998; см. также Current Protocols in Immunology; см. также, например, Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986 Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell and Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, 1979 Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green and Reed, 1998 Science 281:1309, и процитированные там ссылки).

Выявление пролиферации антиген-реактивных Т-клеток может быть выполнено согласно ряду известных методик. Например, Т-клеточная пролиферация может быть выявлена измерением интенсивности синтеза ДНК, а антигенная специфичность может быть выявлена регулированием стимулирующего воздействия (например, сенсibilизированные специфическим желаемым антигеном или контрольным антигеном антигенпрезентирующие клетки), которому подвергаются кандидатные антиген-реактивные Т-клетки. Т-клетки, которые были стимулированы к пролиферации, проявляют повышенную интенсивность синтеза ДНК. Типичным способом измерения интенсивности синтеза ДНК является, например, метод импульсного мечения культур Т-клеток ^3H -тимидином, нуклеозидным предшественником, который включается во вновь синтезирующуюся ДНК. Количество включенного ^3H -тимидина может быть выявлено с использованием жидкостного сцинтиляционного спектрофотометра. Другие пути выявления Т-клеточной пролиферации включают измерение повышений в продуцировании интерлейкина-2 (IL-2), потоке Ca^{2+} или поглощении красителя, такого как 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий. Альтернативно, может быть измерен синтез лимфокинов (таких как интерферон-гамма), или количественно может быть определено относительное число Т-клеток, которые могут отвечать на конкретный антиген.

Выявление продуцирования антиген-специфических антител может быть выполнено, например, анализом образца (например, содержащего иммуноглобулин образца, такого как сыворотка, плазма или кровь) от хозяина, обработанного вакциной по настоящему изобретению, с использованием методов *in vitro*, таких как радиоиммуноанализ (RIA),
 5 иммуносорбентные анализы с применением фиксированных ферментов (ELISA), равновесный диализ или иммуноблот на твердой фазе, включая вестерн-блоттинг. В предпочтительных вариантах осуществления анализы ELISA могут дополнительно включать иммобилизацию антигена-мишени на твердой фазе с моноклональным антителом, специфическим к антигену, например, для усиления чувствительности
 10 анализа. Выработка растворимых медиаторов (например, цитокинов, хемокинов, лимфокинов, простагландинов и т.д.) также может быть легко определена твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA), например, с использованием способов, аппаратуры и реагентов, которые легко доступны из коммерческих источников (например, Sigma, Сент-Луис, Миссури; см. также R & D Systems 2006 Catalog, R & D
 15 Systems, Миннеаполис, Миннесота).

Множество других иммунологических параметров может быть проконтролировано с использованием общепринятых анализов, хорошо известных в данной области. Они могут включать, например, анализы опосредованной антителами клеточной цитотоксичности (ADCC), ответы *in vitro* вторичных антител, проточный
 20 иммуноцитофлуориметрический анализ различных субпопуляций клеток периферической крови или лимфоидных мононуклеарных клеток с использованием общепринятых систем маркерных антигенов, иммуногистохимию или другие подходящие анализы. Информация об этих и других анализах может быть найдена, например, у Rose et al. (Eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th Ed., 1997 American Society of
 25 Microbiology, Washington, DC.

Соответственно, предполагается, что вакцинные и адъювантные композиции, представленные в настоящем документе, будут способны индуцировать или усиливать у хозяина по меньшей мере один иммунный ответ, который выбирают из Т-лимфоцитарного ответа Т_H1-типа, Т-лимфоцитарного ответа Т_H2-типа, цитотоксического
 30 Т-лимфоцитарного (CTL) ответа, ответа антител, цитокинового ответа, лимфокинового ответа, хемокинового ответа и воспалительного ответа. В определенных вариантах осуществления иммунный ответ может включать по меньшей мере одно из продуцирования одного или множества цитокинов, причем цитокин выбирают из
 35 интерферона-гамма (IFN γ), фактора некроза опухоли-альфа (TNF α), продуцирования одного или множества интерлейкинов, причем интерлейкин выбирают из IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 и IL-23, продуцирования одного или множества хемокинов, причем хемокин выбирают из MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CCL4 и CCL5, и лимфоцитарного ответа, который выбирают из ответа Т-клеток памяти,
 40 ответа В-клеток памяти, ответа эффекторных Т-клеток, ответа цитотоксических Т-клеток и ответа эффекторных В-клеток. См., например, WO 94/00153; WO 95/17209; WO 96/02555; патенты США №№6692752; 7084256; 6977073; 6749856; 6733763; 6797276; 6752995; 6057427; 6472515; 6309847; 6969704; 6120769; 5993800; 5595888; Smith et al., 1987 J Biol Chem. 262:6951; Kriegler et al., 1988 Cell 53:45 53; Beutler et al., 1986 Nature 320:584; патенты США №№6991791; 6654462; 6375944.
 45

Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции, как правило, содержат по меньшей мере одно GLA соединение по настоящему изобретению и могут дополнительно содержать один или несколько компонентов, представленных в настоящем документе, которые выбирают,

например, из антигена, агониста TLR, коадъюванта (включая необязательно цитокин, имидазохинолиновый иммуномодулятор и/или dSLIM) и/или рекомбинантного экспрессирующего конструкта, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, наполнителем или разбавителем.

5 Таким образом, в конкретных аспектах настоящее изобретение относится к «монотерапии» GLA, где описанный в настоящем документе GLA включают в состав композиции, которая по существу свободна от других антигенов, и вводят субъекту для стимуляции иммунного ответа, например, неспецифического иммунного ответа, с целью лечения или профилактики заболевания или другого состояния, такой как для
10 лечения инфекции некоторым микроорганизмом, для лечения сезонного ринита, и т.п. В одном варианте осуществления, например, в композициях и способах по настоящему изобретению используют GLA соединение для стимуляции иммунного ответа у субъекта. В другом варианте осуществления GLA находится в форме спрея, необязательно представленного в наборе.

15 GLA может быть предпочтительно включен в состав стабильной эмульсии. В одном конкретном варианте осуществления, например, предоставлена композиция, содержащая GLA соединение по настоящему изобретению в стабильной эмульсии, по существу свободной от других антигенов.

В других конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция
20 представляет собой вакцинную композицию, которая содержит как GLA, так и антиген, и может дополнительно содержать один или несколько представленных в настоящем документе компонентов, которые выбирают из агониста TLR, коадъюванта (включая, например, цитокин, имидазохинолиновый иммуномодулятор и/или dSLIM) и т.п. и/или рекомбинантный экспрессирующий конструкт, в сочетании с фармацевтически
25 приемлемым носителем, наполнителем или разбавителем.

Типичные носители должны быть нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях. Для вакцин (GLA + нуклеиновая кислота) или для вакцин (GLA + антиген), как правило, вводят приблизительно от 0,001 мкг/кг приблизительно до 100
30 мг/кг массы тела, обычно путем внутрикожного, подкожного, внутримышечного или внутривенного введения, или другими путями.

В более конкретном варианте осуществления доза составляет приблизительно от 0,001 мкг/кг приблизительно до 1 мг/кг. В другом конкретном варианте осуществления доза составляет приблизительно от 0,001 мкг/кг приблизительно до 50 мкг/кг. В другом конкретном варианте осуществления доза составляет приблизительно от 0,001 мкг/кг
35 приблизительно до 15 мкг/кг.

В другом конкретном варианте осуществления количество вводимого GLA составляет приблизительно от 0,01 мкг/доза приблизительно до 5 мг/доза. В другом конкретном варианте осуществления количество вводимого GLA составляет приблизительно от 0,1 мкг/доза приблизительно до 1 мг/доза. В другом конкретном варианте осуществления
40 количество вводимого GLA составляет приблизительно от 0,1 мкг/доза приблизительно до 100 мкг/доза. В другом конкретном варианте осуществления количество вводимого GLA составляет приблизительно от 0,1 мкг/доза приблизительно до 10 мкг/доза.

Для специалиста в данной области техники очевидно, что количество и частота введения будет зависеть от ответа хозяина. «Фармацевтически приемлемые носители»
45 для терапевтического применения хорошо известны в области фармацевтики и описаны, например, в Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Например, могут быть использованы стерильный солевой раствор и фосфатно-буферный солевой раствор при физиологическом pH. В фармацевтической композиции

могут содержаться консерванты, стабилизаторы, красители и даже вкусоароматизаторы. Например, в качестве консервантов могут быть добавлены бензоат натрия, сорбиновая кислота и сложные эфиры парагидроксibenзойной кислоты (*Id.* стр. 1449). Кроме того, могут применяться антиоксиданты и способствующие суспендированию вещества (*Id.*).

5 Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к солям соединений по настоящему изобретению, полученным из сочетания таких соединений и органической или неорганической кислоты (кислотно-аддитивные соли) или органического или неорганического основания (основно-аддитивные соли). Композиции по настоящему изобретению могут применяться как в форме свободного основания, так и соли, причем
10 обе формы рассматриваются как подпадающие под объем настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции могут принимать любую форму, которая позволяет вводить композицию пациенту. Например, композиция может быть в форме твердого тела, жидкости или газа (аэрозоля). Стандартные пути введения включают без ограничения пероральный, местный, парентеральный (например, сублингвально или
15 буккально), сублингвальный, ректальный, вагинальный и интраназальный (например, в виде спрея). Используемый в настоящем документе термин «парентеральный» включает ионтофоретическое (например, патенты США №7033598; №7018345; №6970739), сонофоретическое (например, патенты США №4780212; №4767402; №4948587; №5618275; №5656016; №5722397; №6322532; №6018678), термальное
20 (например, патенты США №5885211; №6685699), пассивное трансдермальное (например, патенты США №3598122; №3598123; №4286592; №4314557; №4379454; №4568343; №5464387; патент Великобритании №2232892; патенты США №6871477; №6974588; №6676961) введение, введение с помощью микроиглы (например, патенты США №6908453; №5457041; №5591139; №6033928), а также подкожные инъекции,
25 внутривенные, внутримышечные, интратеральные, интракавернозные, интратекальные, интрамеатальные, интрауретральные инъекционные или инфузионные методики. В конкретных вариантах осуществления описанную в настоящем документе композицию (включая вакцинную и фармацевтическую композиции) вводят внутрикожно посредством методики, выбранной из ионтофореза, микрокавитации, сонофореза или
30 введения с помощью микроигл.

Фармацевтическую композицию составляют таким образом, чтобы сделать содержащиеся в ней активные ингредиенты биодоступными после введения композиции пациенту. Композиции, которые будут вводиться пациенту, принимают форму одной или нескольких единиц дозирования, где, например, таблетка может представлять собой
35 однократную единицу дозирования, а контейнер с одним или несколькими соединениями по настоящему изобретению в форме аэрозоля может содержать множество единиц дозирования.

Для перорального введения могут присутствовать наполнитель и/или связующее вещество. Примерами являются сахароза, каолин, глицерин, декстрины крахмала,
40 альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза и этилцеллюлоза. Могут присутствовать красители и/или вкусоароматизаторы. Можно использовать покровную оболочку.

Композиция может принимать форму жидкости, например, эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. В качестве двух примеров, жидкость может быть для перорального введения или для доставки путем инъекции. Если предполагается
45 пероральное введение, то предпочтительные композиции содержат одно или несколько из подсластителя, консервантов, красителя/пигмента и усилителя вкуса. В композицию, предполагаемую для введения путем инъекции, может быть включено одно или несколько из поверхностно-активного вещества, консерванта, увлажнителя, вещества,

способствующего диспергированию, вещества, способствующего суспендированию, буфера, стабилизатора и изотонического раствора.

Используемая в настоящем документе жидкая фармацевтическая композиция, как в форме раствора, суспензии, так и в другой подобной форме, может содержать один или несколько из следующих носителей или наполнителей: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, жирные масла, такие как сквален, сквалан, минеральное масло, моноолеат маннида, холестерин и/или синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные вещества, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфат натрия; хелатирующие вещества, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты и вещества для коррективки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат может быть помещен в ампулы, шприцы одноразового применения или флаконы для многократного применения, сделанные из стекла или пластика. Инъекционные фармацевтические композиции предпочтительно являются стерильными.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическая или вакцинная композиция по настоящему изобретению содержит стабильную водную суспензию с размером частиц менее 0,2 мкм и дополнительно содержит по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, состоящей из фосфолипидов, жирных кислот, поверхностно-активных веществ, детергентов, сапонинов, фторированных липидов и т.п.

В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению составлена таким образом, что она может быть переведена в аэрозольное состояние.

Также может быть желательным включить в вакцинную или фармацевтическую композицию другие компоненты, такие как средства доставки, включая без ограничения соли алюминия, эмульсии типа «вода в масле», биоразлагаемые масляные основы, эмульсии типа «масло в воде», биоразлагаемые микрокапсулы и липосомы. Примеры дополнительных иммуностимулирующих веществ (коадъювантов), применяемых в таких средствах доставки, также описаны выше и могут включать N-ацетилмурамил-L-аланин-D-изоглутамин (MDP), глюкан, IL-12, GM-CSF, γ -интерферон и IL-12.

Хотя в фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть использован любой подходящий носитель, известный специалисту в данной области техники, тип носителя будет варьировать в зависимости от способа введения и того, желательно ли замедленное высвобождение. Для парентерального введения, такого как подкожная инъекция, носитель предпочтительно содержит воду, солевой раствор, спирт, жир, воск или буфер. Для перорального введения может быть использован любой из вышеуказанных носителей или твердый носитель, такой как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлоза, глюкоза, сахароза или карбонат магния. В качестве носителей для фармацевтических композиций по настоящему изобретению также могут использоваться биоразлагаемые микросферы (например, сополимер полимолочной кислоты и галактида). Подходящие биоразлагаемые микросферы раскрыты, например, в патентах США №4897268 и №5075109. В этой связи предпочтительно, чтобы микросфера была больше, чем приблизительно 25 микрон.

Фармацевтические композиции (включая содержащие GLA вакцины и содержащие GLA иммунологические адъюванты) также могут содержать разбавители, такие как буферы, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, низкомолекулярные

(приблизительно менее 10 остатков) полипептиды, белки, аминокислоты, углеводороды, включая глюкозу, сахарозу или декстрины, хелатирующие вещества, такие как EDTA, глутатион и другие стабилизаторы и наполнители. Нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с неспецифическим сывороточным альбумином, представляют собой типичные подходящие разбавители. Предпочтительно, продукт может быть включен в состав виде лиофилизата с использованием подходящих растворов наполнителей (например, сахарозы) в качестве разбавителей.

Как описано выше, в конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение включает композиции, способные к доставке молекул нуклеиновых кислот, кодирующих целевые антигены. Такие композиции включают рекомбинантные вирусные векторы (например, ретровирусы (см. WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 и WO 94/03622), аденовирус (см. Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Li et al., Hum. Gene Ther. 4:403-409, 1993; Vincent et al., Nat. Genet. 5:130-134, 1993; and Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219, 1994), поксвирус (см. патент США №4769330; патент США №5017487; и WO 89/01973)), молекулы рекомбинантно экспрессирующего ДНК-конструкта в комплексе с поликатионной молекулой (см. WO 93/03709) и ассоциированные с липосомами нуклеиновые кислоты (см. Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851, 1987). В конкретных вариантах осуществления ДНК может быть связана с убитым или инактивированным аденовирусом (см. Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992; Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6094, 1992). Другие подходящие композиции включают сочетания ДНК-лиганд (см. Wu et al., J. Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989) и липид-ДНК (см. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989).

В дополнение к непосредственным методикам *in vivo*, могут применяться методики *ex vivo*, при которых клетки извлекают из хозяина, модифицируют и помещают в то же самое или другое животное-хозяина. Очевидно, что для *ex vivo* введения кодирующих антиген молекул нуклеиновой кислоты в клетках ткани можно использовать любую из указанных выше композиций. Протоколы для вирусных, физических и химических способов введения хорошо известны в данной области техники.

Соответственно, настоящее изобретение применимо для усиления или индукции иммунного ответа в хозяине, пациенте или в клеточной культуре. Используемый в настоящем документе термин «пациент» относится к любому теплокровному животному, предпочтительно человеку. Пациент может страдать от инфекционного заболевания, рака, такого как рак молочной железы, или от аутоиммунного заболевания, или может находиться в норме (то есть, без определяемого заболевания и/или инфекции). Термин «клеточная культура» представляет собой любой препарат, содержащий иммунокомпетентные клетки или выделенные клетки иммунной системы (включая без ограничения Т-клетки, макрофаги, моноциты, В-клетки и дендритные клетки). Такие клетки могут быть выделены с помощью любой из целого ряда методик, хорошо известных специалистам в данной области техники (например, центрифугирование в градиенте плотности Фиколл-гипак). Клетки могут быть (но не обязательно) выделены из пациента, страдающего от рака, и могут быть введены пациенту после обработки.

В конкретных вариантах осуществления жидкая композиция, предназначенная либо для парентерального, либо для перорального введения, должна содержать такое количество содержащей GLA вакцинной композиции, чтобы получилась подходящая дозировка. Обычно такое количество составляет по меньшей мере 0,01% масс. антигена в композиции. Будучи предназначенным для перорального введения, такое количество может варьировать приблизительно от 0,1 и приблизительно до 70% масс. от композиции.

Предпочтительные пероральные композиции содержат приблизительно от 4 и приблизительно до 50% масс. антигена. Предпочтительные композиции и препараты готовят так, что парентеральная единица дозирования содержит от 0,01 до 1% масс. от активной композиции.

- 5 Фармацевтическая композиция может быть предназначена для местного введения, причем в этом случае носитель может соответствующим образом содержать основу раствора, эмульсии, мази или геля. Основа, например, может содержать одно или несколько из следующих веществ: вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители, такие как вода и спирт, и эмульгаторы и
- 10 стабилизаторы. В фармацевтической композиции для местного введения могут присутствовать загустители. Будучи предназначенной для чрескожного введения, композиция может включать чрескожный пластырь или устройство для ионтофореза. Местные лекарственные формы могут содержать концентрацию антигена (например, вакцинная композиция с GLA-антигеном) или GLA (например, иммунологическая
- 15 адъювантная композиция; GLA производства Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; например, продукт номер 699800) приблизительно от 0,1 приблизительно до 10% мас./об. (масса на единицу объема).

- Композиция может быть предназначена для ректального введения в форме, например, суппозитория, который разжижается в прямой кишке и высвобождает лекарство.
- 20 Композиция для ректального введения может содержать масляную основу в качестве подходящего не вызывающего раздражение наполнителя. Такие основы включают без ограничения ланолин, масло какао и полиэтиленгликоль. В способах по настоящему изобретению вакцинные композиции/адъюванты могут вводиться посредством использования вкладки(ок), гранулы (гранул), лекарственной(ых) формы(форм) с
- 25 замедленным высвобождением, пластыря(ей) или лекарственной(ых) формы(форм) с быстрым высвобождением.

- В некоторых вариантах осуществления также предусмотрены наборы, содержащие описанные в настоящем документе содержащие GLA вакцинные композиции и/или содержащие GLA иммунологические адъювантные композиции, которые могут быть
- 30 предоставлены в одном или нескольких контейнерах. В одном варианте осуществления все компоненты содержащих GLA вакцинных композиций и/или содержащих GLA иммунологических адъювантных композиций присутствуют вместе в одном контейнере, но варианты осуществления по настоящему изобретению не предназначены для подобного ограничения и также предполагают наличие двух или нескольких
- 35 контейнеров, в которых, например, содержащая GLA иммунологическая адъювантная композиция отделена от антигенного компонента и не контактирует с ним. В порядке неограничивающей теории полагают, что в некоторых случаях с пользой может быть осуществлено введение только содержащей GLA иммунологической адъювантной композиции, тогда как в других случаях такое введение может быть осуществлено с
- 40 пользой при разделении во времени и/или в пространстве (например, в анатомически разные места) от введения антигена, тогда как еще в других случаях субъекту с пользой проводят введение описанной в настоящем документе содержащей GLA вакцинной композиции, содержащей и антиген, и GLA, а также необязательно другие описанные в настоящем документе компоненты.

- 45 Контейнер, в соответствии с такими вариантами осуществления наборов, может представлять собой любой подходящий контейнер, баллон, флакон, ампулу, пробирку, чашку, коробку, бутылку, колбу, сосуд, лоток, лунку однолуночного или многолуночного устройства, резервуар, бак, и т.п. или другое устройство, в котором

раскрытые в настоящем документе композиции могут размещаться, храниться и/или транспортироваться, и может быть обеспечен доступ для извлечения содержимого.

Обычно такой контейнер может быть изготовлен из материала, который совместим с предполагаемым использованием, и из которого может легко проводиться извлечение содержимого. Предпочтительные примеры таких контейнеров включают герметичные стеклянные и/или пластиковые или повторно герметизируемые пробирки и ампулы, включая содержащие резиновую диафрагму или другие герметизирующие средства, совместимые с извлечением содержимого с использованием иглы или шприца. Такие контейнеры могут быть, например, изготовлены из стекла или химически совместимого пластика или смолы, которые могут быть сделаны из вещества, которое позволяет эффективное извлечение вещества из контейнера и/или защищает вещество, например, от разрушающих условий, таких как ультрафиолетовый свет или перепады температур, или от внедрения нежелательных контаминантов, включая микробные контаминанты, или могут быть покрыты им. Контейнеры предпочтительно являются стерильными или стерилизуемыми и изготовлены из материалов, которые будут совместимы с любым носителем, наполнителем, растворителем, основой и т.п., которые могут быть использованы для суспендирования или растворения описанных в настоящем документе вакцинных композиций, и/или иммунологических адъювантных композиций, и/или антигенов, и/или конструкторов с рекомбинантной экспрессией и т.п.

Эмульсионные системы также могут быть использованы в составлении композиций по настоящему изобретению. Например, были описаны многие однофазные или многофазные эмульсионные системы. Было высказано предположение, что адъюванты эмульсии типа «масло в воде» *per se* применимы в качестве адъювантной композиции (европейский патент 0399843B), а сочетания эмульсий типа «масло в воде» и других активных веществ также были описаны в качестве адъювантов для вакцин (WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Были описаны другие адъюванты масляных эмульсий, такие как эмульсии типа «вода в масле» (патент США №5422109; европейский патент 0480982B2) и «вода в масле» в водных эмульсиях (патент США №5424067; европейский патент 0480981B). Адъюванты масляных эмульсий для применения по настоящему изобретению могут быть натуральными или синтетическими и могут быть минеральными или органическими. Примеры минеральных и органических масел очевидны специалисту в данной области техники.

В конкретном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению содержит эмульсию типа «масло в воде», где GLA включен в масляную фазу. В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению содержит эмульсию типа «масло в воде», где GLA включен в масляную фазу и присутствует дополнительный компонент, такой как коадъювант, агонист TLR и т.п., описанный в настоящем документе.

Для того чтобы любая композиция типа «масло в воде» была пригодна для введения человеку, масляная фаза эмульсионной системы предпочтительно содержит метаболизируемое масло. Значение термина «метаболизируемое масло» хорошо известно в данной области техники. Термин «метаболизируемый» может быть определен как «способный к преобразованию в ходе обмена веществ» (Dorland's illustrated Medical Dictionary, W. B. Saunders Company, 25th edition (1974)). Масло может представлять собой любое растительное масло, рыбий жир, животный жир или синтетическое масло, которое является нетоксичным для реципиента и способно к преобразованию в ходе обмена веществ. Обычными источниками растительных масел являются орехи (арахисовое масло), семена и зерна. Синтетические масла также являются частью настоящего

изобретения и могут включать коммерчески доступные масла, такие как NEOBEE® и другие.

Например, сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаен) представляет собой ненасыщенное масло, которое в больших количествах обнаруживается в жире печени акулы, и в меньших количествах в оливковом масле, масле ростков пшеницы, масле рисовых отрубей и дрожжах, и представляет собой особо предпочтительное масло для применения по настоящему изобретению. Сквален представляет собой метаболизируемое масло с преимуществом в том обстоятельстве, что оно является промежуточным продуктом в биосинтезе холестерина (Merck index, 10th Edition, entry no. 8619). Особо предпочтительные масляные эмульсии представляют собой эмульсии типа «масло в воде», и в частности эмульсии типа «сквален в воде». Кроме того, наиболее предпочтительные адъюванты масляной эмульсии по настоящему изобретению содержат антиоксидант, которым предпочтительно является масляный α -токоферол (витамин Е, европейский патент 0382271B1). В WO 95/17210 и WO 99/11241 раскрыты адъюванты эмульсий, основанные на сквалене, α -токофероле и TWEEN® 80, необязательно включенные в один состав с иммуностимуляторами QS21 и/или 3D-MPL (которые рассмотрены выше). В WO 99/12565 раскрыто усовершенствование таких скваленовых эмульсий путем добавления стерина в масляную фазу. Дополнительно в масляную фазу может быть добавлен триглицерид, такой как трикаприлин ($C_{27}H_{50}O_6$), для стабилизации эмульсии (WO 98/56414).

Размер масляных капель, обнаруживаемых в стабильной эмульсии типа «масло в воде», составляет в диаметре предпочтительно менее 1 микрона, и может по существу находиться в пределах 30-600 нм, предпочтительно по существу в пределах 30-500 нм, и наиболее предпочтительно по существу в пределах 150-500 нм, и в частности приблизительно 150 нм, как измерено методом фотон-корреляционной спектроскопии. В этой связи, 80% из числа масляных капель должны находиться в предпочтительных пределах, предпочтительно более чем 90% и наиболее предпочтительно более чем 95% из числа масляных капель находятся в пределах определенного размера. Количества компонентов, присутствующих в масляных эмульсиях по настоящему изобретению, находятся обычно в пределах от 2 до 10% для масла, такого как сквален; и, при наличии, от 2 до 10% α -токоферола; и от 0,3 до 3% поверхностно-активного вещества, такого как полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Предпочтительно соотношение масло/ α -токоферол равно или меньше, чем 1, так как это обеспечивает более стабильную эмульсию. В количестве приблизительно 1% также может содержаться Span 85. В некоторых случаях может быть полезным, если вакцины по настоящему изобретению дополнительно содержат стабилизатор.

Способ получения эмульсий типа «масло в воде» хорошо известен специалисту в данной области техники. Обычно этот способ включает смешивание масляной фазы с поверхностно-активным веществом, таким как раствор PBS/TWEEN80®, с последующей гомогенизацией с использованием гомогенизатора. Например, для гомогенизации небольших объемов жидкости будет подходящим способ, который включает пропускание смеси один, два или несколько раз через иглу шприца. В равной степени, для получения меньших или больших объемов эмульсии может быть модифицирован процесс эмульгирования в микрофлюидайзере (микроструйная машина M110S с максимумом в 50 циклов обработки в течение 2 минут при максимальном входном давлении 6 бар (выходное давление приблизительно 850 бар)). Такая модификация может быть достигнута путем проведения обычных экспериментов, включающих измерение полученной эмульсии, до тех пор, пока не будет получен препарат с

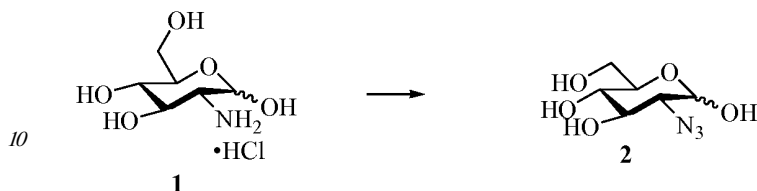
масляными каплями необходимого размера.

Последующие примеры представлены в порядке иллюстрации, а не в порядке ограничения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

2-Азидо-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозид (2)

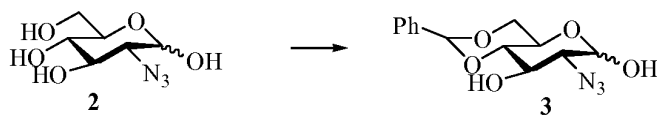


Азид натрия (2,78 г, 42,7 ммоль) растворяли в воде (7 мл) и толуоле (7 мл). Смесь охлаждали до 0°C при энергичном перемешивании. По каплям добавляли трифторметансульфоновый ангидрид (4,57 мл, 27,2 ммоль), и перемешивали смесь в течение 30 мин при 0°C. Температуру повышали до 10°C, и перемешивали двухфазную смесь в течение 2 ч. По каплям добавляли насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия до завершения выделения газа. Две фазы разделяли, и экстрагировали водный слой толуолом (2×7 мл). Объединенные органические слои использовали в последующей реакции диазопереноса.

Глюкозамин 1 (2,04 г, 9,45 ммоль), гидрокарбонат натрия (3,21 г, 38,22 ммоль) и пентагидрат сульфата меди(II) (90,5 мг, 0,362 ммоль) растворяли в воде (12,3 мл). Добавляли полученный выше маточный раствор трифторметансульфонового азид (21 мл), а затем добавляли метанол (81 мл) с получением гомогенной системы. Смесь голубого цвета энергично перемешивали при комнатной температуре. Полное расходование амина отслеживали по методу ТСХ (окрашивание нингидрином), а также определяли по изменению цвета смеси с голубого на зеленый. Растворители удаляли в условиях вакуума на роторном испарителе, поддерживая температуру строго ниже 25°C. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0%→40% метанол/дихлорметан в течение 50 мин, 85 мл/мин) с получением продукта 2 (1,93 г, 99%) в виде бесцветной жидкости. ¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) (смесь диастереомеров 1/1) δ 5,18 (д, *J*=3,4 Гц, 0,5H), 4,51 (д, *J*=8,0 Гц, 0,5H), 3,89-3,63 (м, 3H), 3,32-3,26 (м, 2H), 3,11-3,06 (м, 1H).

ПРИМЕР 2

2-Азидо-2-дезоксид-4,6-О-бензилиден-*D*-глюкопиранозид (3)

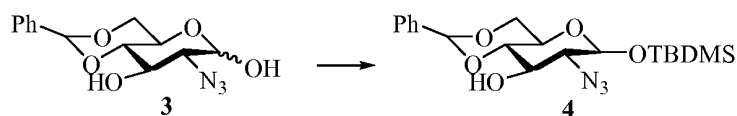


К раствору соединения 2 (2,00 г, 9,75 ммоль) в DMF (40 мл) добавляли бензальдегида диметилацеталь (1,65 г, 10,8 ммоль) и камфорсульфоновую кислоту (90 мг). Сосуд соединяли с вакуумной системой, и нагревали смесь при 50°C в масляной бане. Спустя 3 ч смесь концентрировали с использованием роторного испарителя. Остаток повторно растворяли в диэтиловом эфире (50 мл) и Et₃N (2 мл), а затем в насыщенном бикарбонате натрия (50 мл). Водный слой экстрагировали диэтиловым эфиром (3×50 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия и фильтровали. После удаления растворителей с использованием роторного испарителя остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0%→100% этилацетат/гексаны в течение 50 мин, 85 мл/мин) с получением

продукта 3 (2,58 г, 90%) в виде бесцветной жидкости. ^1H -ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ 7,49-7,32 (м, 5H), 5,58 (с, 1H), 4,64 (д, $J=3,8$ Гц, 1H), 4,25-3,41 (м, 5H), 3,23-3,20 (м, 1H).

ПРИМЕР 3

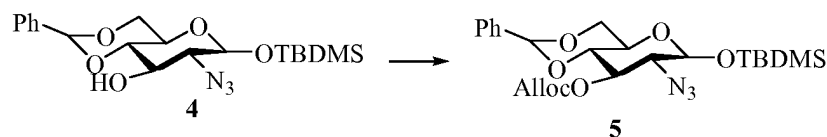
трет-Бутилдиметилсилил-2-азидо-4,6-О-бензилиден-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (4)



К смеси соединения 3 (1,45 г, 4,94 ммоль) и имидазола (768 мг, 11,3 ммоль) в CH_2Cl_2 (40 мл) при 0°C добавляли трет-бутилдиметилсилилхлорид (820 мг, 5,44 ммоль). После перемешивания раствора в течение ночи добавляли насыщенный бикарбонат натрия (20 мл), и экстрагировали смесь диэтиловым эфиром (3×30 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной флэш-хроматографии (колонка RediSep 80 г, элюирование градиентом 0% $\rightarrow$ 70% этилацетат/гексаны в течение 40 мин, 60 мл/мин) с получением продукта 4 (1,5 г, 74%) в виде бесцветного твердого вещества. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,46-7,43 (м, 2H), 7,35-7,32 (м, 3H), 5,48 (с, 1H), 4,59 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 4,23 (дд, $J=10,2, 5,0$ Гц, 1H), 3,73 (т, $J=10,2$ Гц, 1H), 3,56-3,51 (м, 2H), 3,31-3,28 (м, 2H), 2,72 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 0,91 (с, 9H), 0,14 (с, 3H), 0,13 (с, 3H).

ПРИМЕР 4

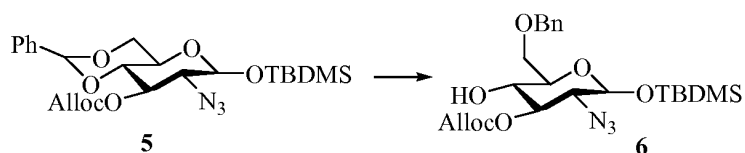
трет-Бутилдиметилсилил-3-О-аллилоксикарбонил-2-азидо-4,6-О-бензилиден-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (5)



К раствору соединения 4 (1,50 г, 3,68 ммоль) и тетраметилэтилендиамина (TMEDA) (0,78 мл, 5,2 ммоль) в дихлорметане (DCM) (50 мл) при 0°C по каплям добавляли аллилхлорформат (0,78 мл, 7,3 ммоль). Смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры, и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 10 ч. Смесь разбавляли DCM (50 мл) и промывали насыщенным водным NaHCO_3 (2×100 мл) и соевым раствором (2×50 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной флэш-хроматографии (колонка RediSep 80 г, элюирование градиентом 0% $\rightarrow$ 50% этилацетат/гексаны в течение 40 мин, 60 мл/мин) с получением продукта 5 (1,57 г, 87%) в виде бесцветного твердого вещества. $R_f=0,40$ (гексаны/этилацетат, 3/1, об./об.). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,44-7,41 (м, 2H), 7,35-7,32 (м, 3H), 5,98-5,85 (м, 1H), 5,48 (с, 1H), 5,38-5,22 (м, 2H), 4,88 (т, $J=11,4$ Гц, 1H), 4,72-4,64 (м, 3H), 4,32-4,27 (м, 1H), 3,81-3,65 (м, 2H), 3,50-3,42 (м, 2H), 0,94 (с, 9H), 0,18 (с, 3H), 0,17 (с, 3H).

ПРИМЕР 5

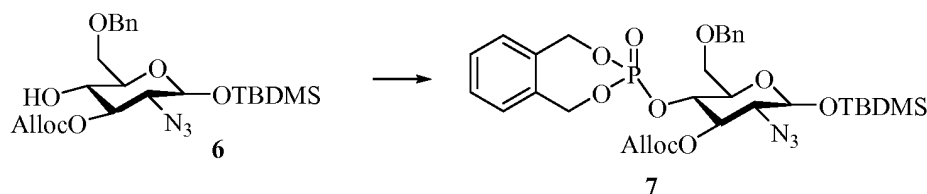
трет-Бутилдиметилсилил-3-О-аллилоксикарбонил-2-азидо-6-О-бензил-2-дезоксид-D-глюкопиранозид (6)



Суспензию соединения 5 (320 мг, 0,651 ммоль) и молекулярных сит (4 Å, 200 мг) в THF (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем добавляли NaCNBH₃ (246 мг, 3,91 ммоль). К этой смеси по каплям добавляли раствор хлороводорода (2 М в диэтиловом эфире) до момента, пока смесь не становилась кислой (~5 мл, pH=5). После перемешивания еще в течение 0,5 ч реакционную смесь гасили добавлением твердого NaHCO₃, разбавляли диэтиловым эфиром (100 мл) и промывали насыщенным водным NaHCO₃ (2×100 мл) и соевым раствором (2×50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали, концентрировали в условиях вакуума, и очищали остаток по методу колоночной флэш-хроматографии (колонка RediSep 40 г, элюирование градиентом 0%→100% этилацетат/гексаны в течение 40 мин, 40 мл/мин) с получением продукта 6 (273 мг, 85%) в виде бесцветного твердого вещества. R_f=0,42 (гексаны/этилацетат, 4/1, об./об.). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,39-7,34 (м, 5H), 5,99-5,89 (м, 1H), 5,40-5,26 (м, 2H), 4,67-4,56 (м, 5H), 3,72-3,70 (м, 3H), 3,48-3,46 (м, 2H), 3,37 (дд, J=9,6, 8,4 Гц, 1H), 3,01 (ушир.с, 1H), 0,94 (с, 9H), 0,17 (с, 6H).

ПРИМЕР 6

трет-Бутилдиметилсилил-3-О-аллилоксикарбонил-2-азидо-6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3λ⁵-3Н-2,4,3-бензодиоксафосфеин-3-ил)-D-глюкопиранозид (7)

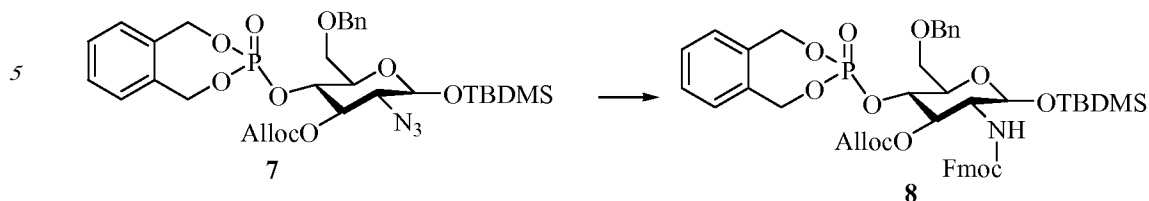


К раствору соединения 6 (5,47 г, 11,1 ммоль) и 1Н-тетразола (3% вес. в ацетонитриле, 35,5 ммоль, 104 мл) добавляли N,N-диэтил-1,5-дигидро-3Н-2,4,3-бензодиоксафосфеин-3-амин (5,3 г, 22 ммоль). После перемешивания реакционной смеси при комнатной температуре в течение 15 мин ее охлаждали до -20°C, перемешивали еще в течение 10 мин при этой температуре, а затем добавляли mCPBA (8,40 г, 50-55% вес., 24,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при -20°C в течение 20 мин и концентрировали в условиях вакуума. Остаток повторно растворяли в DCM (30 мл) и промывали насыщенным водным NaHCO₃ (40 мл). Водный слой экстрагировали DCM (3×50 мл). Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной флэш-хроматографии (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0%→100% этилацетат/гексаны в течение 60 мин, 85 мл/мин) с получением продукта 7 (4,85 г, 65%) в виде бледно-желтого масла. R_f=0,40 (гексаны/этилацетат, 1/1, об./об.). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,35-7,18 (м, 9H), 5,98-5,85 (м, 1H), 5,41-5,05 (м, 6H), 4,64 (т, J=10,1 Гц, 1H), 4,58-4,52 (м, 6H), 3,83 (д, J=9,0 Гц, 1H), 3,72-3,61 (м, 2H), 3,41 (дд, J=10,5, 7,4 Гц, 1H), 0,92 (с, 9H), 0,16 (с, 3H), 0,15 (с, 3H).

ПРИМЕР 7

трет-Бутилдиметилсилил-3-О-аллилоксикарбонил-6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-

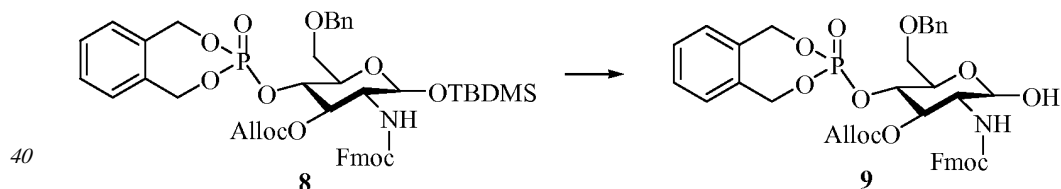
3-оксо-3λ⁵-3Н-2,4,3-бензодиоксафосфепин-3-ил)-2-(9-флуоренилметоксикарбониламино)-D-глюкопиранозид (8)



К перемешанной суспензии 7 (700 мг, 1,04 ммоль) и порошкового цинка (676 мг, 10,4 ммоль) в DCM (15 мл) по каплям добавляли уксусную кислоту (0,30 мл, 5,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, после чего ее разбавляли этилацетатом (50 мл). Твердые вещества удаляли путем фильтрации и промывали этилацетатом (2×10 мл). Объединенные фильтраты промывали насыщенным водным NaHCO₃ (2×40 мл) и соевым раствором (2×40 мл). Органическую фазу сушили (MgSO₄) и фильтровали, и концентрировали фильтрат в условиях вакуума с получением неочищенного промежуточного продукта-амин в виде бледно-желтого масла. R_f=0,21 (гексаны/этилацетат, 1/1, об./об.). К перемешанному раствору неочищенного амина и диизопропилэтиламина (DIPEA) (0,22 мл, 1,3 ммоль) в DCM (15 мл) при 0°C добавляли 9-флуоренилметилоксикарбонилхлорид (Fmoc-Cl) (323 мг, 1,25 ммоль). Реакционную смесь нагревали и перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч, после чего ее разбавляли DCM (40 мл) и промывали соевым раствором (2×50 мл). Органическую фазу сушили (MgSO₄) и фильтровали. Фильтрат концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 40 г, элюирование градиентом 0%→100% этилацетат/гексаны в течение 30 мин, 40 мл/мин) с получением продукта 8 (337 мг, 73% в две стадии) в виде твердого вещества белого цвета. R_f=0,54 (гексаны/этилацетат, 1/1, об./об.). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,78-7,20 (м, 17H), 5,92-5,82 (м, 1H), 5,49-5,16 (м, 8H), 4,69-4,06 (м, 5H), 4,49-4,28 (м, 2H), 3,88-3,61 (м, 3H), 3,60-3,51 (м, 2H), 3,32 (ушир.с, 1H), 0,94 (с, 9H), 0,14 (с, 3H), 0,10 (с, 3H).

ПРИМЕР 8

3-О-Аллилоксикарбонил-6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3λ⁵-3Н-2,4,3-бензодиоксафосфепин-3-ил)-2-(9-флуоренилметоксикарбониламино)-D-глюкопиранозид (9)

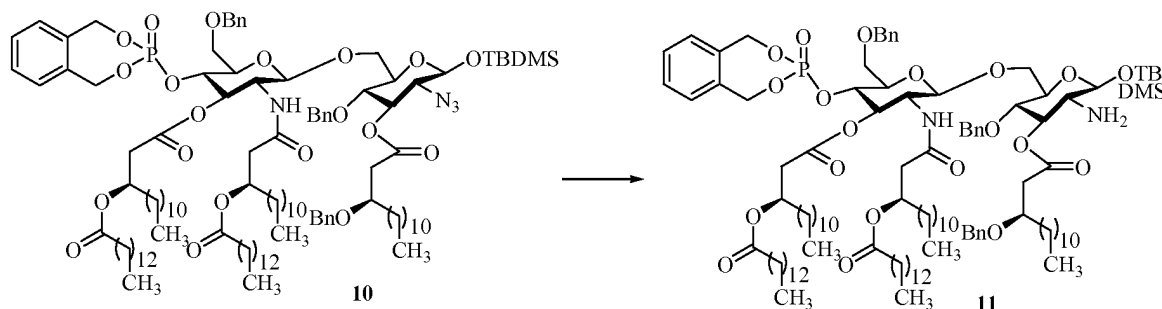


К перемешанному раствору 8 (6,00 г, 6,88 ммоль) в THF (50 мл) по каплям добавляли фтороводород/пиридин (6 мл, 0,2 моль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч, после чего ее разбавляли диэтиловым эфиром (100 мл), а затем промывали насыщенным водным NaHCO₃ (2×40 мл) и соевым раствором (2×40 мл). Органическую фазу сушили (MgSO₄) и фильтровали. Фильтрат концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0%→80%

этилацетат/гексаны в течение 60 мин, 85 мл/мин) с получением продукта 9 (4,34 г, 83%) в виде бледно-желтого масла. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,75-7,20 (м, 17H), 5,92-5,82 (м, 1H), 5,27-5,06 (м, 9H), 4,59-4,55 (м, 5H), 4,41-4,39 (м, 1H), 4,25-4,01 (м, 5H), 3,85-3,65 (м, 2H).

ПРИМЕР 9

трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{3-О-аллилоксикарбонил-6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодиоксафосфепин-3-ил)-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]- β -D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензилоксидодеканоил]-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (11)



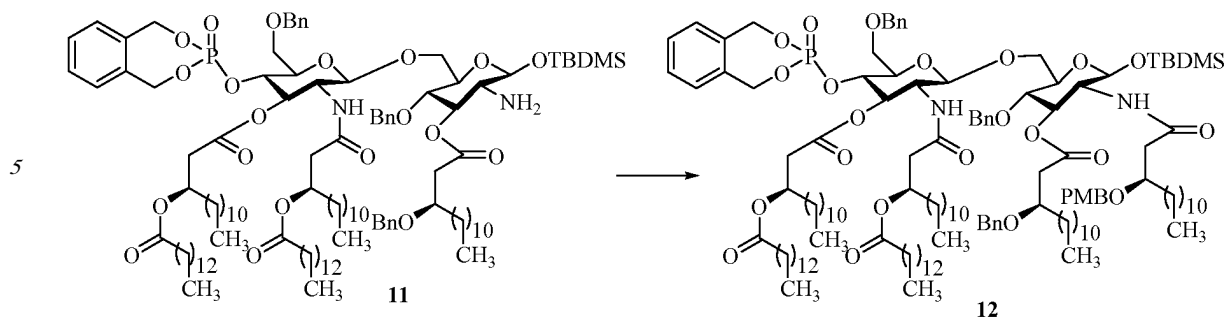
Суспензию 10 (получение см. далее в тексте) (350 мг, 0,172 ммоль), цинк (1,3 г, 21 ммоль) и уксусную кислоту (0,70 мл, 12 ммоль) в DCM (20 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Смесь разбавляли диэтиловым эфиром. Твердые вещества удаляли путем фильтрации, и промывали остаток диэтиловым эфиром (2 $\times$ 10 мл). Объединенные фильтраты промывали насыщенным водным NaHCO_3 (2 $\times$ 15 мл) и соевым раствором (2 $\times$ 15 мл). Органическую фазу сушили (MgSO_4) и фильтровали.

Фильтрат концентрировали в условиях вакуума, и очищали остаток по методу колоночной хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 12 г, элюирование градиентом 0% $\rightarrow$ 60% этилацетат/гексаны в течение 35 мин, 30 мл/мин) с получением продукта 11 (220 мг, 64%) в виде бледно-желтого сиропа. R_f =0,29 (гексаны/этилацетат,

5/2, об./об.). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,37-7,24 (м, 20H), 6,20 (д, J =7,2 Гц, 1H), 5,59 (т, J =9,6 Гц, 1H), 5,31 (м, 1H), 5,12-4,97 (м, 6H), 4,62-4,44 (м, 7H), 4,05-3,24 (м, 9H), 2,68-2,12 (м, 9H), 1,64-1,59 (м, 13H), 1,27 (ушир.м, 95H), 0,94 (м, 25H), 0,13 (с, 6H). MSBP (m/z) (положит.) расчит. для $\text{C}_{117}\text{H}_{193}\text{N}_2\text{O}_{20}\text{PSi}$ 2005,37; обнаруж. 2006,3729 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ПРИМЕР 10

трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{3-О-аллилоксикарбонил-6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодиоксафосфепин-3-ил)-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]- β -D-глюкопиранозил}-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензилоксидодеканоил]-2-[(R)-3-4-метоксибензилокситетрадеканоил]-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (12)

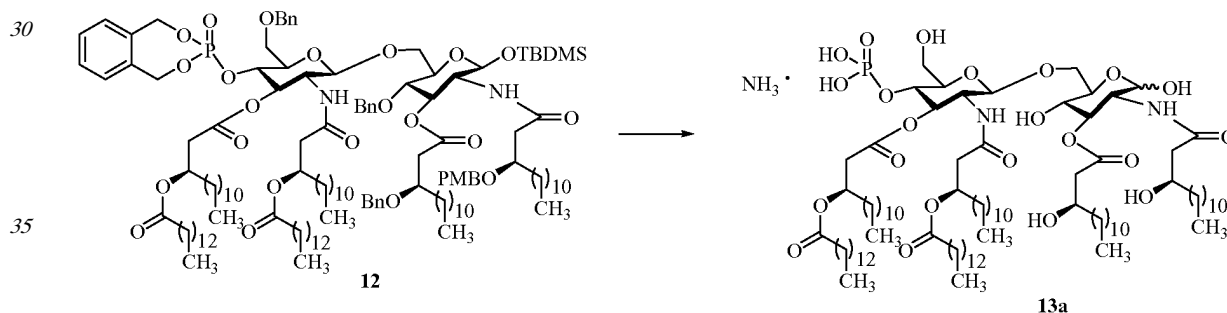


10 К раствору амина 11 (93 мг, 0,046 ммоль) в DCM (10 мл) при комнатной температуре добавляли пиридин (21 мг, 0,27 ммоль), (R)-3-(4-метоксибензилокси)тетрадеcanoилхлорид (получение см. далее в тексте, соединение 35) (40 мг, 0,12 ммоль) и 4-
 15 диметиламинопиридин (DMAP) (1 мг), и перемешивали смесь в течение ночи. Смесь переносили в делительную воронку и разбавляли диэтиловым эфиром (20 мл) и насыщенным бикарбонатом натрия (20 мл). Водный слой экстрагировали диэтиловым эфиром (3×20 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 12 г, элюирование градиентом 0%→80% этилацетат/гексаны в течение 35 мин, 30 мл/мин) с получением
 20 продукта 12 (81 мг, 74%) в виде бесцветной жидкости. $R_f=0,34$ (гексаны/этилацетат, 3/2, об./об.). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,34-7,20 (м, 20H), 6,89-6,86 (м, 4H), 6,15 (т, $J=9,0$ Гц, 1H), 5,57-5,55 (м, 1H), 5,31-4,99 (м, 8H), 4,57-4,44 (м, 11H), 4,06-3,33 (м, 15H), 2,63-2,57 (м, 5H), 2,33-2,27 (м, 9H), 1,57 (м, 8H), 1,27 (ушир.м, 112H), 0,88-0,82 (м, 27H), 0,08 (с, 3H),
 25 0,04 (с, 3H). МСВР (m/z) (положит.) рассчит. для $\text{C}_{139}\text{H}_{227}\text{N}_2\text{O}_{23}\text{PSi}$ 2351,62; обнаруж.

2352,6343 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ПРИМЕР 11

Липид А (13a)

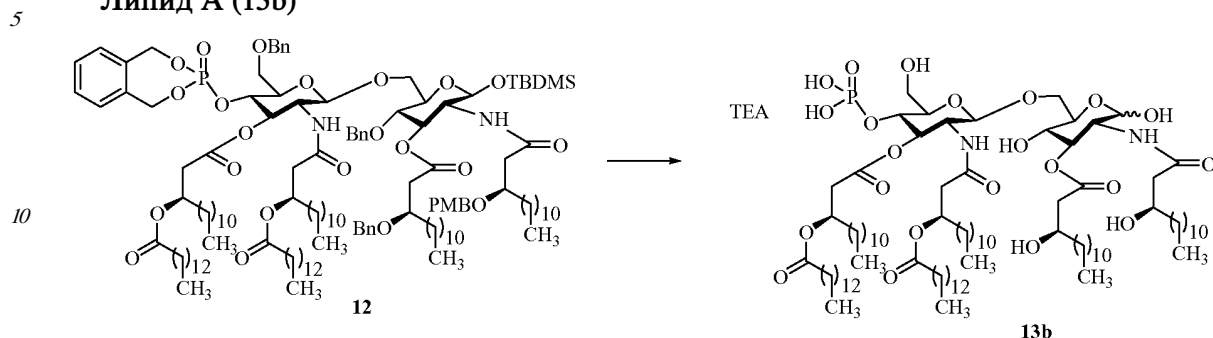


40 Суспензию 12 (10 мг, 0,0042 ммоль) и палладиевую чернь (15,0 мг) в безводном THF (5 мл) перемешивали встряхиванием в атмосфере H_2 (50 фунт./кв.дюйм) при комнатной температуре в течение 30 ч. Катализатор удаляли путем фильтрации. Остаток промывали THF (2×1 мл). Раствор охлаждали до -40°C и нейтрализовали добавлением аммиака в метаноле (0,1 мл, 7 М), и концентрировали без нагревания в условиях вакуума. Остаток очищали по методу хроматографии (колонка RediSep 12 г, элюирование хлороформ/метанол/вода 8/2/0,1 в течение 30 мин, 30 мл/мин) с получением 13a (4 мг, 54%) в виде бесцветной пленки. Продукт повторно растворяли в воде и метаноле (об./об., 1/1, 2 мл)
 45 и лиофилизировали с получением продукта 13a в виде порошка белого цвета. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 6,00-5,00 (м, 1H), 4,50-3,50 (м, 2H), 3,00-2,00 (м, 3H), 2,00-1,00 (м, 50H),

0,81 (м, 18H). МС (многорежимный источник, отрицат.) рассчит. для $C_{96}H_{181}N_2O_{22}P$
1745,28; обнаруж. 1745,0 $[M-H]^-$.

ПРИМЕР 12

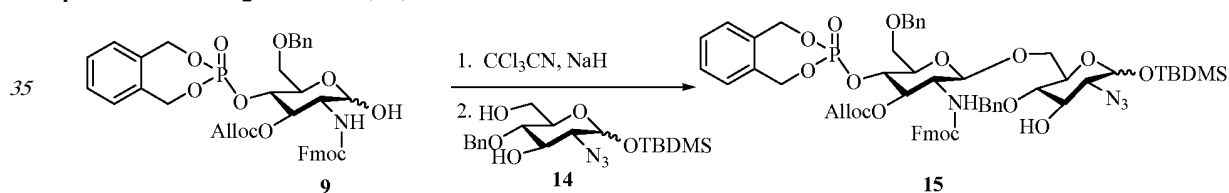
Липид А (13b)



Суспензию 12 (27 мг, 0,011 ммоль) и палладиевую чернь (41,0 мг) в безводном THF (12 мл) перемешивали встряхиванием в атмосфере H_2 (50 фунт./кв.дюйм) при комнатной температуре в течение 30 ч. Катализатор удаляли путем фильтрации. Остаток промывали THF (2×3 мл). Раствор нейтрализовали добавлением триэтиламина (TEA) (0,1 мл) и концентрировали без нагревания в условиях вакуума. Объединенные фильтраты концентрировали в условиях вакуума и очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 12 г, элюирование хлороформ/метанол/вода 8/2/0,1 в течение 30 мин, 30 мл/мин) с получением 13b (5 мг, 25%) в виде бесцветной пленки. Продукт повторно растворяли в воде и метаноле (об./об., 1/1, 2 мл) и лиофилизировали с получением продукта 13b в виде порошка белого цвета. 1H -ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 5,17 (ушир., 2H), 4,23-3,62 (м, 5H), 3,11-3,07 (кв., $J=2,8$ Гц, 2H), 2,51-2,12 (м, 6H), 1,56-1,00 (м, 69H), 0,92-0,84 (м, 18H). MS (многорежимный источник, отрицат.) расчет. для $C_{96}H_{181}N_2O_{22}P$ 1745,28; обнаруж. 1744,1 $[M-H]^-$.

Пример 13

30 трет-Бутилдиметилсилил-6-О-[3-О-аллилоксикарбонил-6-О-бензил-2-дезоксидигидро-3-оксо-3λ5-3Н-2,4,3-бензодиоксафосфеин-3-ил)-2-(9-флуоренилметоксикарбониламино)-β-D-глюкопиранозил]-2-азидо-4-О-бензил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (15)

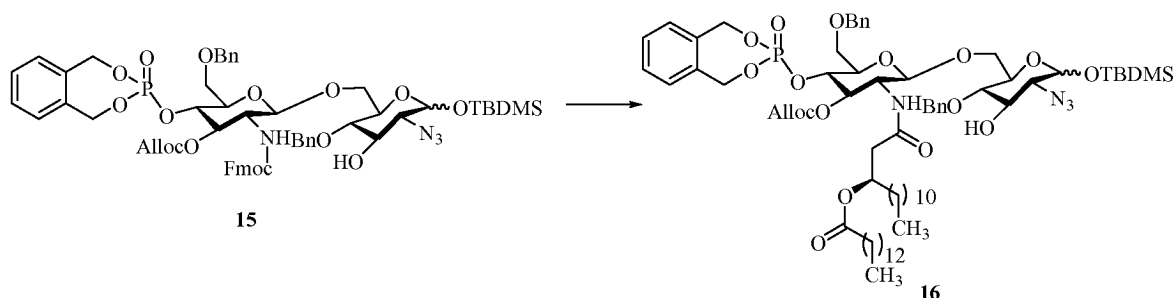


Соединение 9 (89 мг, 0,12 ммоль) растворяли в безводном DCM (3 мл). Добавляли трихлорацетонитрил (1,0 мл), а затем гидрид натрия (1,0 мг, 60% в минеральном масле). Спустя 15 мин по методу ТСХ обнаруживали присутствие 9, поэтому добавляли дополнительное количество гидрида натрия (1 мг, 60% в минеральном масле). Спустя 15 мин по методу ТСХ обнаруживали завершение реакции. Смесь концентрировали в условиях вакуума и наносили на колонку с SiO₂, предварительно обработанную Et₃N, и элюировали 50% этилацетатом/гексанами с получением промежуточного продукта трихлорацетимида (76,9 мг, 71%), который использовали без дополнительной очистки. Суспензию трихлорацетимида (76,9 мг, 0,0852 ммоль), акцептора 14 (получение см. далее в тексте) (52,34 мг, 0,1277 ммоль) и молекулярных сит (4 Å, 500 мг) в DCM (5,0

мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь охлаждали (-60°C), и добавляли TMSOTf (1,54 мкл, 0,0851 ммоль). После перемешивания реакционной смеси в течение 30 мин ее гасили добавлением твердого NaHCO_3 . Твердые вещества удаляли путем фильтрации, и концентрировали фильтрат в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 2/1 (об./об.)) с получением 15 (55 мг, 40%) в виде бесцветного твердого вещества. ^1H -ЯМР (500 МГц, CD_3COCD_3) δ 7,86-7,22 (м, 22H), 6,98 (д, $J=9,0$ Гц, 1H), 5,85 (м, 1H), 5,41 (т, $J=9,0$ Гц, 1H), 5,38-5,21 (м, 3H), 5,10-5,02 (м, 3H), 4,91 (д, $J=11,0$ Гц, 2H), 4,72-4,46 (м, 7H), 4,23-4,15 (м, 4H), 3,93-3,80 (м, 4H), 3,69-3,66 (м, 1H), 3,54 (ушир.с, 3H), 3,20 (дд, $J_1=8,0$ Гц, $J_2=8,0$ Гц, 1H), 0,95 (с, 9H), 0,17 (с, 6H); ^{13}C -ЯМР (125 МГц, CD_3COCD_3) δ 207,00, 156,61, 155,51, 145,22, 144,82, 142,06, 142,01, 139,98, 139,57, 136,68, 136,62, 133,02, 132,94, 129,85, 129,83, 129,15, 129,05, 128,95, 128,91, 128,82, 128,61, 128,49, 128,41, 128,21, 128,17, 128,0, 127,92, 126,19, 126,09, 125,98, 120,79, 118,60, 118,52, 101,41, 97,57, 78,78, 78,10, 76,84, 75,98, 75,88, 75,43, 75,30, 75,17, 74,70, 74,07, 70,63, 69,76, 69,64, 69,27, 69,15, 69,10, 69,02, 68,97, 67,73, 67,17, 57,29, 54,94, 26,11, 18,51; МСВР (m/z) рассчит. для $\text{C}_{59}\text{H}_{69}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{PSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1149,4293; обнаруж. 1149,4238.

ПРИМЕР 14

трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{3-О-аллилоксикарбонил-6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодиоксафосфефин-3-ил)-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]- β -D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (16)



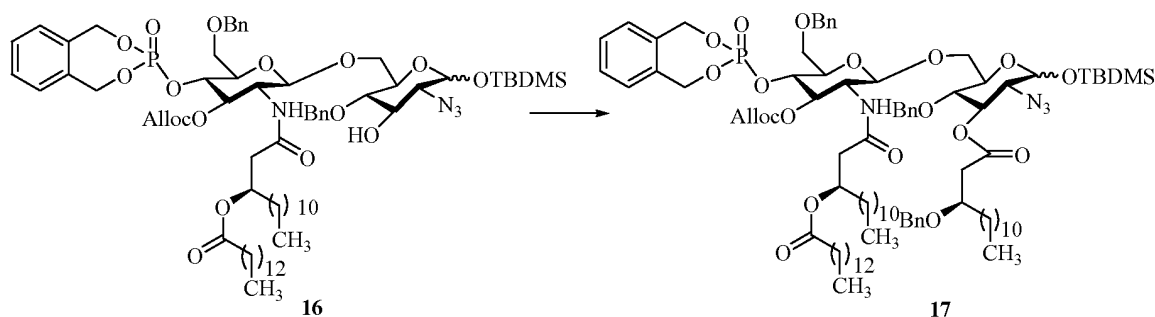
К раствору 15 (800 мг, 0,696 ммоль) в DCM (10 мл) по каплям добавляли 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (220 мкл, 1,47 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего ее концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (DCM/метанол, 100/1 $\rightarrow$ 100/3 (об./об.)) с получением свободного амина (648 мг, 99%) в виде бесцветного сиропа. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,36-7,17 (м, 14H), 5,96-5,88 (м, 1H), 5,40-5,06 (м, 7H), 4,84-4,50 (м, 9H), 4,21 (д, $J=13,5$ Гц, 1H), 4,15-4,11 (м, 1H), 3,82 (м, 1H), 3,79-3,42 (м, 5H), 3,34-3,19 (м, 2H), 2,96-2,90 (м, 1H), 2,34 (д, $J=4,5$ Гц, 1H), 0,90 (с, 9H), 0,13 (с, 6H). МСВР (m/z) рассчит. для $\text{C}_{44}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{PSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 927,3613; обнаруж. 927,3569.

К перемешанному раствору (R)-3-додеканоилтетрадекановой кислоты (получение см. далее в тексте, соединение 40) (381 мг, 0,81 ммоль) в DCM (10 мл) добавляли N,N-дициклогексилкарбодиимид (DCC) (230 мг, 1,11 ммоль). После перемешивания реакционной смеси в течение 10 мин добавляли свободный амин (648 мг, 0,699 ммоль) в DCM (10 мл), и продолжали перемешивание еще в течение 12 ч. Нерастворимые вещества удаляли путем фильтрации, и промывали остаток DCM (2 $\times$ 2 мл). Объединенные

фильтраты концентрировали в условиях вакуума, и очищали остаток по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 2/1 (об./об.)) с получением 16 (450 мг, 47%) в виде белого твердого вещества. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,35-7,17 (м, 14H), 5,94-5,86 (м, 2H), 5,47 (т, $J=9,0$, 10,5 Гц, 1H), 5,37 (д, $J=2,5$ Гц, 1H), 5,34 (д, $J=2,5$ Гц, 1H), 5,24 (д, $J=13,5$ Гц, 1H), 5,13-4,97 (м, 6H), 4,75 (д, $J=11,0$ Гц, 1H), 4,66-4,49 (м, 7H), 4,00 (д, $J=17,0$ Гц, 2H), 3,83 (д, $J=10,5$ Гц, 1H), 3,75-3,56 (м, 4H), 3,49-3,36 (м, 5H), 3,20 (м, 1H), 2,42-2,17 (м, 4H), 1,93 (д, $J=11,5$ Гц, 1H), 1,70 (м, 2H), 1,23 (ушир.с, 36H), 0,92 (с, 9H), 0,89-0,86 (м, 6H), 0,14 (с, 6H); МСВР (m/z) рассчит. для $\text{C}_{72}\text{H}_{111}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{PSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1363,7529; обнаруж. 1363,7487.

ПРИМЕР 15

трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{3-О-аллилоксикарбонил-6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодиоксафосфефин-3-ил)-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]- β -D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензилокситетрадеканоил]-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (17)

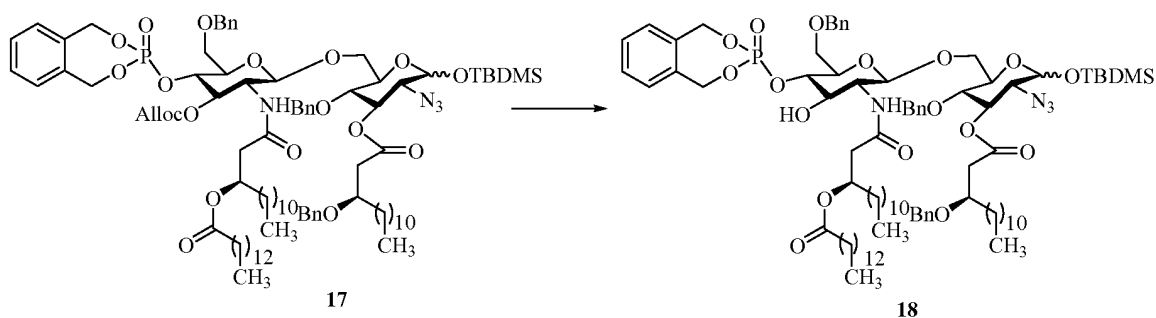


Смесь (R)-3-бензилокситетрадекановой кислоты (получение см. далее в тексте, соединение 33) (120 мг, 0,540 ммоль) и DCC (171 мг, 0,830 ммоль) в DCM (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем добавляли дисахарид 16 (451 мг, 0,331 ммоль) в DCM (5 мл) и DMAP (25 мг, 0,21 ммоль).

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 ч, после чего удаляли твердые вещества путем фильтрации. Остаток промывали DCM (2×4 мл). Объединенные фильтраты концентрировали в условиях вакуума, и очищали остаток по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 4/1 (об./об.)) с получением 17 (540 мг, 97%) в виде твердого вещества белого цвета. $R_f=0,41$ (гексаны/этилацетат, 2:1 (об./об.)). ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,33-7,15 (м, 19H), 5,94-5,85 (м, 2H), 5,47 (т, $J=9,5$ Гц, 1H), 5,37 (д, $J=17,5$ Гц, 1H), 5,22 (д, $J=10,0$ Гц, 1H), 5,10-4,95 (м, 7H), 4,62-4,43 (м, 10H), 4,0-3,96 (м, 3H), 3,90-3,81 (м, 2H), 3,74-3,67 (м, 3H), 3,56-3,42 (м, 6H), 3,33-3,27 (м, 1H), 2,60-2,21 (м, 6H), 1,24 (ушир.с, 54H), 0,91 (с, 9H), 0,87-0,84 (м, 9H), 0,14 (с, 6H). МСВР (m/z) рассчит. для $\text{C}_{93}\text{H}_{143}\text{N}_4\text{O}_{19}\text{PSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1679,9931; обнаруж. 1679,9934.

ПРИМЕР 16

трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодиоксафосфефин-3-ил)-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]- β -D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензилокситетрадеканоил]-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (18)

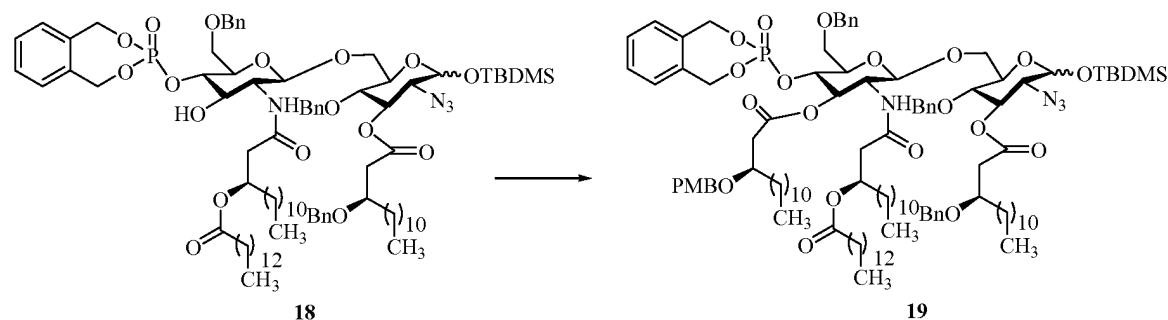


К раствору 17 (1,66 г, 0,980 ммоль), *n*-BuNH₂ (0,19 мл, 1,97 ммоль) и HCOOH (74,5 мкл, 1,98 ммоль) в THF (20 мл) добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (228 мг, 0,198 ммоль). После перемешивания реакционной смеси при комнатной температуре в течение 20 мин ее разбавляли DCM (40 мл) и последовательно промывали водой (40 мл), насыщенным водным NaHCO₃ (2×40 мл) и соевым раствором (40 мл).

Органическую фазу сушили (MgSO₄) и фильтровали. Фильтрат концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 4/3 (об./об.)) с получением соединения 18 (1,43 г, 91%). $R_f=0,5$ (гексаны/этилацетат, 1:1 (об./об.)). ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 7,33-7,11 (м, 19H), 6,2 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 5,46 (т, $J=9,0$ Гц, 1H), 5,04-4,90 (м, 9H), 4,55-4,38 (м, 8H), 3,92 (д, $J=10,0$ Гц, 1H), 3,84-3,76 (м, 1H), 3,75-3,7 (м, 4H), 3,53-3,44 (м, 2H), 3,43-3,32 (м, 2H), 3,25-3,20 (м, 1H), 2,61-2,10 (м, 12H), 1,23 (ушир.с, 54H), 0,90 (с, 9H), 0,88-0,84 (м, 9H), 0,12 (с, 6H). МСВР (m/z) расчит. для C₈₉H₁₃₉N₄O₁₇PSi [M+H]⁺ 1595,972; обнаруж. 1595,9713.

ПРИМЕР 17

трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3λ⁵-3Н-2,4,3-бензодиоксафосфеин-3-ил)-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]-3-О-[(R)-3-(пара-метокси)бензилокситетрадеканоил]-β-D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензилокситетрадеканоил]-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (19)

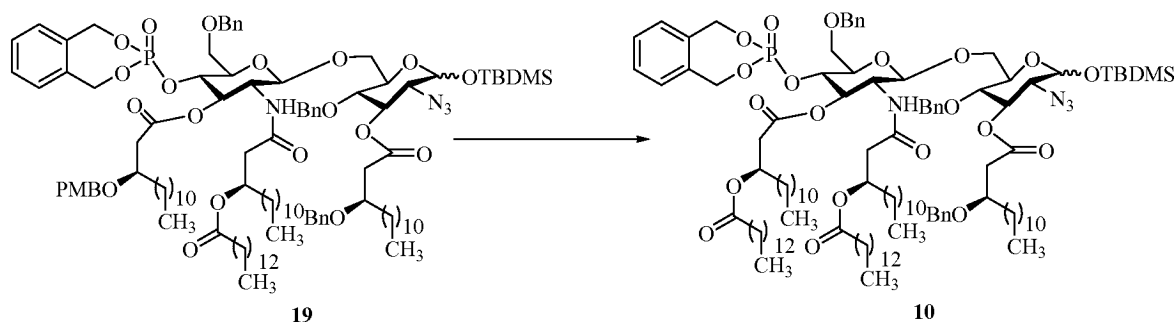


Раствор (R)-3-(пара-метокси)бензилокситетрадекановой кислоты (получение см. далее в тексте, соединение 34, 424 мг, 1,16 ммоль) и DCC (369 мг, 1,79 ммоль) в DCM (15 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, и добавляли спирт 18 (1,43 г, 0,896 ммоль) в DCM (10 мл) и DMAP (54,72 мг, 0,4479 ммоль). Реакционную смесь перемешивали еще в течение 14 ч, после чего твердые вещества удаляли путем фильтрации и промывали DCM (2×5 мл). Объединенные фильтраты концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 4/1 (об./об.)) с получением 19 (1,15 г, 66%) в виде твердого вещества белого цвета. $R_f=0,46$ (гексаны/этилацетат, 2/1 (об./об.)). ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 7,38-6,79 (м, 23H), 5,73 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 5,55 (т, $J=9,5$ Гц, 1H), 5,20-

4,88 (м, 8H), 4,66-4,47 (м, 12H), 4,33 (д, $J=12,5$ Гц, 1H), 4,0-3,66 (м, 12H), 3,61-3,40 (м, 5H), 3,36-3,27 (м, 3H), 2,67 (д, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,60-2,22 (м, 6H), 1,27 (ушир.с, 72H), 0,93 (с, 9H), 0,92-0,87 (м, 12H), 0,16 (с, 6H). МСВР (m/z) рассчит. для $C_{111}H_{173}N_4O_{20}PSi$ $[M+H]^+$, 1942,2228; обнаруж. 1942,2289.

ПРИМЕР 18

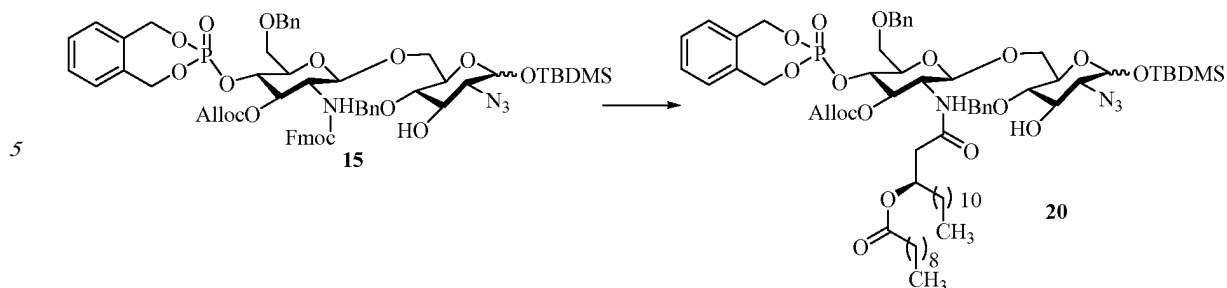
трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3λ⁵-3Н-2,4,3-бензодиафосфепин-3-ил)-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]-3-О-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоил]-β-D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензилокситетрадеканоил]-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (10)



К перемешанному раствору 19 (1,15 г, 0,592 ммоль) в смеси DCM и H₂O (11 мл, 10/1 (об./об.)) добавляли 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон (DDQ) (202 мг, 0,890 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего ее разбавляли DCM. Смесь промывали соевым раствором (20 мл), сушили (MgSO₄) и концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 3/1 (об./об.)) с получением спирта в виде бесцветного сиропа (1,01 г, 94%). $R_f=0,50$ (гексаны/этилацетат, 5/3 (об./об.)). К раствору спирта (1,01 г, 0,554 ммоль) и пиридина (0,35 мл, 4,33 ммоль) в DCM (20 мл) добавляли миристилохлорид (0,74 мл, 2,7 ммоль). После перемешивания реакционной смеси при комнатной температуре в течение 12 ч ее разбавляли DCM и промывали насыщенным водным NaHCO₃ (2×40 мл) и соевым раствором (40 мл). Органическую фазу сушили (MgSO₄) и фильтровали. Фильтрат концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 4/1 (об./об.)) с получением 10 (680 мг, 57%) в виде твердого вещества белого цвета. $R_f=0,46$ (гексаны/этилацетат, 5/2 (об./об.)). ¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 7,37-7,24 (м, 19H), 6,23 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 5,58 (т, $J_1=J_2=9,5$ Гц, 1H), 5,32-5,27 (м, 1H), 5,16-4,99 (м, 6H), 4,78-4,44 (м, 7H), 4,03 (д, $J=10,5$ Гц, 1H), 3,99-3,20 (м, 10H), 2,65-2,21 (м, 10H), 1,61-1,51 (м, 10H), 1,27 (ушир.с, 94H), 1,21 (ушир.с, 25H), 0,12 (с, 6H).

ПРИМЕР 19

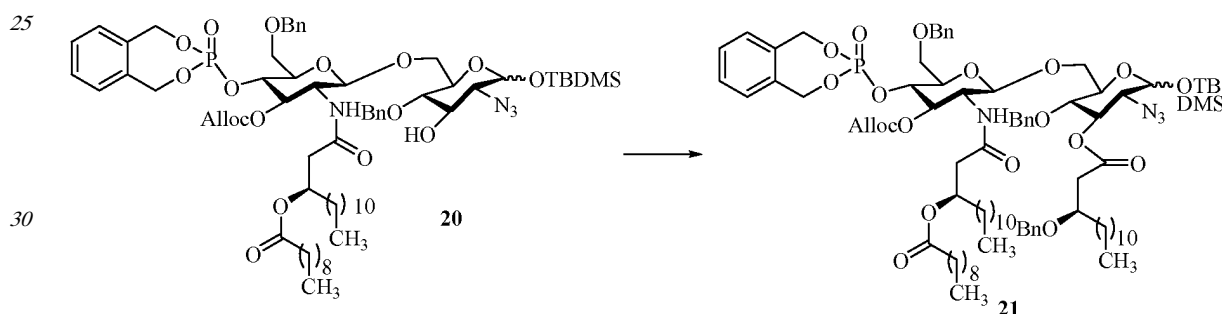
трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{3-О-аллилоксикарбонил-6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3λ⁵-3Н-2,4,3-бензодиафосфепин-3-ил)-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]-β-D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (20)



10 Соединение 15 (1,23 г, 1,07 ммоль) ацилировали способом, аналогичным описанному для синтеза соединения 16 (пример 14) с использованием DCC (430 мг, 2,08 ммоль), требуемого липида (соединение 40, пример 36, 630 мг, 1,59 ммоль) и триэтиламина (161 мг, 1,59 ммоль), с получением 20 (1,05 г, 81%) в виде бесцветного масла. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,35-7,17 (м, 14H), 5,91-5,86 (м, 2H), 5,47 (т, $J=9,0$, 10,5 Гц, 1H), 5,34 (д, $J=17$ Гц, 1H), 5,24 (д, $J=10,5$ Гц, 1H), 5,10-4,98 (м, 8H), 4,75 (д, $J=11,5$ Гц, 1H), 4,66-4,49 (м, 8H), 4,00 (д, $J=11,0$ Гц, 2H), 3,83 (д, $J=11,0$ Гц, 1H), 3,75-3,69 (м, 2H), 3,49-3,36 (м, 4H), 3,20 (м, 1H), 2,40-2,26 (м, 4H), 1,24 (ушир.с, 32H), 0,92 (с, 9H), 0,89-0,86 (м, 6H), 0,14 (с, 6H); МС (многорежимный источник, положит.) $m/z=1307$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ПРИМЕР 20

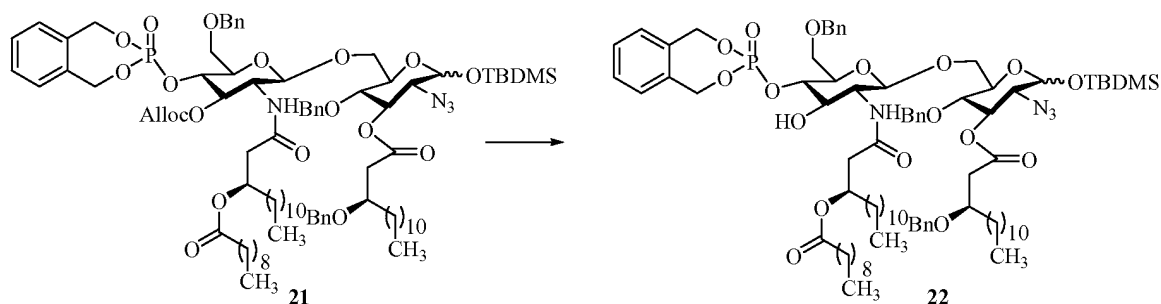
20 трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{3-О-аллилоксикарбонил-6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодиоксафосфеин-3-ил)-2-[(R)-3-деканойлокситетрадеканойламино]- β -D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензилокситетрадеканойл]-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (21)



35 Соединение 20 (1,43 г, 1,18 ммоль) ацилировали способом, аналогичным описанному для синтеза соединения 17 (пример 15) с использованием DCC (453 мг, 2,20 ммоль), требуемого липида (477 мг, 1,43 ммоль) и N,N-диметил-4-аминопиридина (67 мг, 0,548 ммоль), с получением 21 (1,60 г, 83%) в виде бесцветного масла. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,33-7,15 (м, 19H), 5,94-5,85 (м, 2H), 5,48 (т, $J=9,0$ Гц, 1H), 5,34 (д, $J=17,5$ Гц, 1H), 5,22 (д, $J=10,0$ Гц, 1H), 5,12-4,96 (м, 7H), 4,63-4,46 (м, 11H), 3,97 (д, $J=10,5$ Гц, 1H), 3,89-3,85 (м, 2H), 3,74-3,68 (м, 3H), 3,55-3,52 (м, 2H), 3,47-3,41 (м, 1H), 3,28 (м, 1H), 2,61-2,22 (м, 8H), 1,59-1,52 (м, 6H), 1,98 (м, 2H), 1,23 (ушир.с, 44H), 0,90 (с, 9H), 0,88-0,84 (м, 9H), 0,12 (с, 6H); МС (многорежимный источник, положит.) $m/z=1625$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ПРИМЕР 21

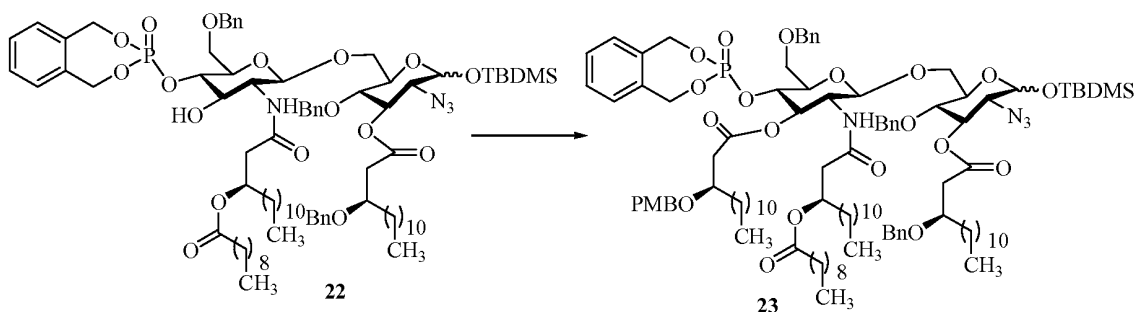
45 трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодиоксафосфеин-3-ил)-2-[(R)-3-додеканойлокситетрадеканойламино]- β -D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензилокситетрадеканойл]-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (22)



Соединение 21 (1,60 г, 0,985 ммоль) использовали во взаимодействии, аналогичном описанному для синтеза соединения 18 (пример 16). Соответственно, с использованием тетракис(трифенилфосфин)палладия (227 мг, 0,196 ммоль), муравьиной кислоты (74 мкл, 1,97 ммоль) и н-бутиламина (144 мг, 1,97 ммоль) получали 22 (1,25 г, 82%) в виде твердого вещества желтого цвета. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,33-7,15 (м, 19H), 6,20 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 5,38-4,95 (м, 6H), 4,86 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 4,60-4,46 (м, 10H), 3,97-3,71 (м, 8H), 3,68-3,48 (м, 5H), 3,31-3,27 (м, 3H), 2,62-2,55 (м, 2H), 2,50-2,42 (м, 3H), 2,40-2,22 (м, 5H), 1,23 (ушир.с, 44H), 0,90 (с, 9H), 0,88-0,84 (м, 9H), 0,12 (с, 6H); МС (многорежимный источник, положит.) $m/z=1539$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ПРИМЕР 22

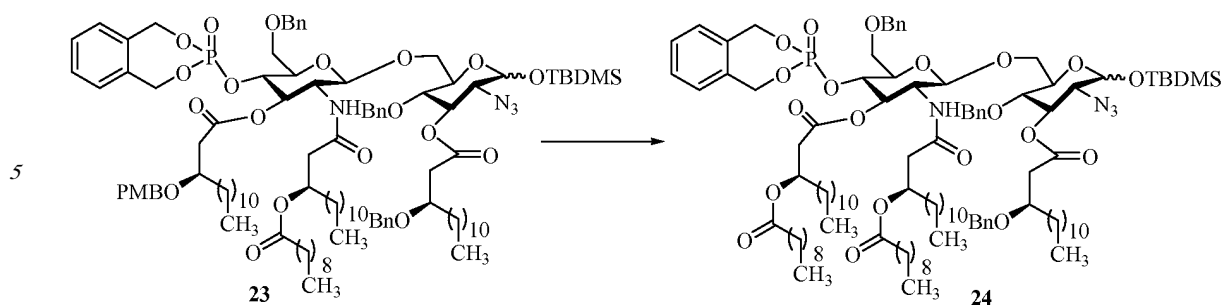
трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодифосфеин-3-ил)-2-[(R)-3-деканойлокситетрадеканойламино]-3-О-[(R)-3-(пара-метокси)бензильокситетрадеканойл]- β -D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензильокситетрадеканойл]-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (23)



Соединение 22 (1,25 г, 0,811 ммоль) ацилировали способом, аналогичным описанному для синтеза соединения 19 (пример 17) с использованием DCC (335 мг, 1,62 ммоль), требуемого липида (соединение 34, пример 32, 386 мг, 1,06 ммоль) и N,N-диметил-4-аминопиридина (50 мг, 0,41 ммоль), с получением 23 (440 мг, 29%) в виде бесцветного масла. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,38-6,79 (м, 23H), 5,71 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 5,55 (т, $J=9,5$ Гц, 1H), 5,06-4,85 (м, 9H), 4,66-4,45 (м, 12H), 3,97 (д, $J=11,0$ Гц, 1H), 3,90-3,69 (м, 9H), 3,60-3,55 (м, 3H), 3,37-3,29 (м, 2H), 2,65 (д, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,61-2,55 (м, 1H), 2,48-2,42 (м, 1H), 2,35-2,21 (м, 3H), 2,11-2,05 (м, 1H), 1,62-1,59 (м, 8H), 1,27 (ушир.с, 62H), 0,93 (с, 9H), 0,92-0,87 (м, 12H), 0,16 (с, 6H); МС (многорежимный источник, положит.) $m/z=1886$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ПРИМЕР 23

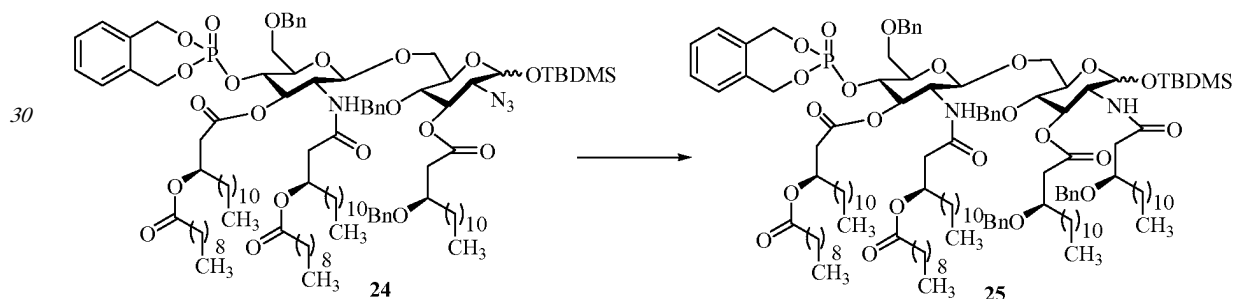
трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодифосфеин-3-ил)-2-[(R)-3-деканойлокситетрадеканойламино]-3-О-[(R)-3-деканойлокситетрадеканойл]- β -D-глюкопиранозил}-2-азидо-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензильокситетрадеканойл]-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (24)



С соединения 23 (446 мг, 0,236 ммоль) сначала снимали защиту с использованием DDQ (80 мг, 0,35 ммоль), а затем следовали методике, описанной для промежуточного продукта 10. Указанный промежуточный продукт (343 мг, 0,194 ммоль) затем ацилировали способом, аналогичным описанному для синтеза соединения 10 с использованием деканоилхлорида (185 мг, 0,970 ммоль) и пиридина (123 мг, 1,55 ммоль), с получением 24 (343 мг, 76%) в виде бесцветного масла. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,39-7,22 (м, 14H), 6,15 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 5,54 (т, $J=9,5$ Гц, 1H), 5,28-5,24 (м, 1H), 5,14-4,96 (м, 8H), 4,60-4,45 (м, 10H), 3,99 (д, $J=10,5$ Гц, 1H), 3,90-3,85 (м, 1H), 3,80-3,65 (м, 4H), 3,55 (м, 3H), 3,46-3,39 (м, 1H), 3,32-3,27 (м, 1H), 2,66-2,53 (м, 3H), 2,46-2,41 (м, 1H), 2,35-2,18 (м, 7H), 1,61-1,51 (м, 10H), 1,26 (ушир.с, 78H), 0,95 (с, 9H), 0,92-0,90 (м, 15H), 0,19 (с, 3H), 0,18 (с, 3H).

ПРИМЕР 24

трет-Бутилдиметилсилил-6-О-{6-О-бензил-2-дезоксид-4-О-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3Н-2,4,3-бензодифосфеин-3-ил)-2-[(R)-3-деканоилокситетрадеканоиламино]-3-О-[(R)-3-деканоилокситетрадеканоил]- β -D-глюкопиранозил]-4-О-бензил-3-О-[(R)-3-бензилокситетрадеканоил]-2-[(R)-3-бензилокситетрадеканоиламино]-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (25)



Суспензию 24 (296 мг, 0,154 ммоль), цинка (100 мг, 1,52 ммоль) и уксусной кислоты (53 мкл, 0,93 ммоль) в DCM (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч, после чего ее разбавляли этилацетатом (25 мл). Твердые вещества удаляли путем фильтрации и промывали этилацетатом (2 $\times$ 25 мл), и промывали объединенные фильтраты насыщенным водным NaHCO_3 (2 $\times$ 100 мл) и солевым раствором (200 мл).

Органическую фазу сушили (Na_2SO_4) и фильтровали. Фильтрат концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 2,5/1 (об./об.)) с получением амина в виде бледно-

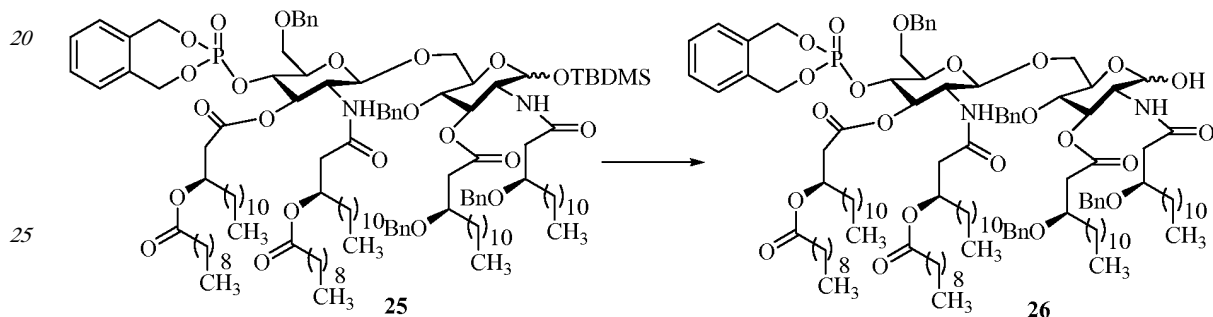
желтого сиропа (245 мг, 84%). ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,39-7,22 (м, 14H), 6,15 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 5,54 (т, $J=9,5$ Гц, 1H), 5,29-5,23 (м, 1H), 5,13-4,93 (м, 8H), 4,62-4,30 (м, 9H), 4,00 (д, $J=10,5$ Гц, 1H), 3,88-3,65 (м, 6H), 3,56-3,53 (м, 2H), 3,46-3,41 (м, 1H), 2,66-2,58 (м, 4H), 2,54-2,45 (м, 2H), 2,35-2,17 (м, 7H), 1,64-1,42 (м, 12H), 1,26 (ушир.с, 78H), 0,87 (с, 24H),

0,13 (с, 6H).

К перемешанному раствору (R)-3-бензилокситетрадеканоилхлорида (228 мг, 0,646 ммоль), DMAP (15,79 мг, 0,1292 ммоль) и пиридина (83 мкл, 1,0 ммоль) в DCM (5,0 мл) добавляли амин. Реакционную смесь перемешивали в течение 14 ч. Смесь разбавляли CH_2Cl_2 , промывали насыщенным NaHCO_3 /солевым раствором, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу ТСХ на силикагеле (гексаны/этилацетат, 3,5/1 (об./об.)) с получением 25 (450 мг, >100%) в виде твердого вещества белого цвета. $R_f=0,54$ (гексаны/этилацетат, 2/1 (об./об.)). ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,39-7,22 (м, 19H), 6,14-6,10 (м, 2H), 5,57 (т, $J=9,5$ Гц, 1H), 5,29-5,24 (м, 1H), 5,13-4,93 (м, 7H), 4,61-4,41 (м, 10H), 4,00 (д, $J=10,5$ Гц, 1H), 3,89-3,79 (м, 8H), 3,72-3,66 (м, 4H), 3,57-3,35 (м, 3H), 2,73-2,57 (м, 10H), 2,39-2,15 (м, 10H), 1,71-1,64 (м, 7H), 1,26 (ушир.с, 93H), 0,88 (с, 24H), 0,83 (с, 9H).

ПРИМЕР 25

6-O-{6-O-Бензил-2-дезоксид-4-O-(1,5-дигидро-3-оксо-3 λ^5 -3H-2,4,3-бензодиоксафосфеин-3-ил)-2-[(R)-3-деканойлокситетрадеканоиламино]-3-O-[(R)-3-деканойлокситетрадеканоил]- β -D-глюкопиранозил}-4-O-бензил-3-O-[(R)-3-бензилокситетрадеканоил]-2-[(R)-3-бензилокситетрадеканоиламино]-2-дезоксид- α -D-глюкопираноза (26)

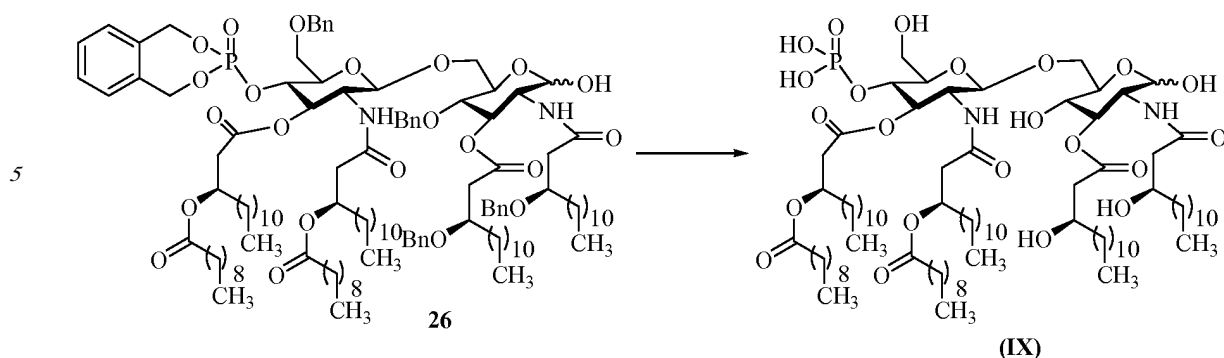


К перемешанному раствору 25 (450 мг, 0,204 ммоль) в THF (5 мл) по каплям добавляли фтороводород/пиридин (1,12 мл, 43,1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 ч. Смесь разбавляли этилацетатом (100 мл) и промывали насыщенным водным NaHCO_3 (2x80 мл) и солевым раствором.

Органическую фазу сушили (Na_2SO_4) и фильтровали. Фильтрат концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 3/1 $\rightarrow$ 4/3 (об./об.)) с получением 26 (180 мг, 42%) в виде твердого вещества белого цвета. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,39-7,19 (м, 19H), 6,31 (д, $J=7,0$ Гц, 1H), 6,24 (д, $J=9,5$ Гц, 1H), 5,57-5,48 (м, 2H), 5,40 (т, $J=9,5$ Гц, 1H), 5,28-5,21 (м, 1H), 5,14-4,96 (м, 8H), 4,68-4,41 (м, 12H), 4,23-4,19 (м, 1H), 4,13-4,06 (м, 1H), 3,94-3,66 (м, 9H), 3,38-3,28 (м, 2H), 2,67-2,58 (м, 3H), 2,44-2,20 (м, 11H), 1,58 (ушир.с, 12H), 1,26 (ушир.с, 93H), 0,91-0,81 (м, 18H).

ПРИМЕР 26

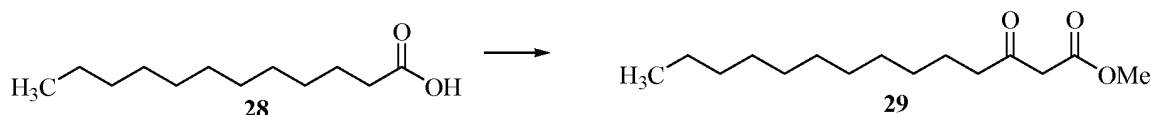
(3R)-((2R,3S,4R,5S)-3-((R)-3-(Деканоилокси)тетрадеканамидо)-2-(((3S,4R,5S)-3,6-дигидрокси-5-((R)-3-гидрокситетрадеканамидо)-4-((R)-3-гидрокситетрадеканоилокси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)метокси)-6-(гидроксиметил)-5-(фосфоноокси)тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-3-(деканоилокси)тетрадеканоат (IX)



Соединение 26 (180 мг, 0,0858 ммоль) растворяли в безводном THF (15 мл). К смеси добавляли палладиевую чернь (0,225 г) и гидрировали в атмосфере водорода (50 фунт./кв.дюйм) в течение ночи. Смесь фильтровали через слой диатомовой земли. Фильтрат охлаждали до -40°C , и добавляли раствор аммиака в метаноле (1,8 мл, 4 М). Смесь концентрировали в условиях вакуума без нагревания. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле, элюируя смесью хлороформ/метанол/вода (80/20/1, об./об.) с получением целевого соединения (IX) (102 мг, 73%). Анализ по методу ТСХ и ^1H -ЯМР показал наличие примеси и неясное близко идущее пятно (ТСХ в $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CMA}$, 4/1). Остаток подвергали хроматографии (колонка RediSep 12 г, элюирование следующим градиентом: изократ. CH_2Cl_2 в течение 5 объемов колонки (ОК), градиент $\rightarrow 25\%$ СМА в течение 10 ОК, изократ. в течение 10 ОК, градиент $\rightarrow 100\%$ СМА в течение 10 ОК, изократ. при 100% СМА в течение 10 ОК, 20 мл/мин) с получением целевого продукта (57 мг, 25%). По методу ТСХ в объединенных и концентрированных фракциях все еще обнаруживали очень малое количество примеси, идущее сразу за целевым продуктом. Остаток повторно очищали по методу хроматографии на силикагеле (две колонки RediSep 12 г последовательно; тот же градиент, что и указанный выше) с получением 8,9 мг целевого продукта (чистого, исходя из ТСХ-анализа) и 11,9 мг слегка загрязненного продукта после растворения в метаноле/воде/хлороформе и лиофилизации. Общий выход (20,8 мг, 14%) в виде не совсем твердого вещества белого цвета. $R_f=0,40$ СМА. ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,40-5,30 (ушир.с, 2H), 4,10-4,00 (м, 4H), 3,70-3,60 (м, 4H), 2,83-2,76 (м, 1H), 2,75-2,20 (м, 13H), 2,10-1,90 (ушир., 9H), 1,40-1,00 (ушир., 106H), 0,90-0,70 (ушир., 18H). МС (многорежимный источник, отрицат.) $m/z=1632$ $[\text{M}-\text{H}]^-$.

ПРИМЕР 27

Метил-3-оксотетрадеканоат (29)

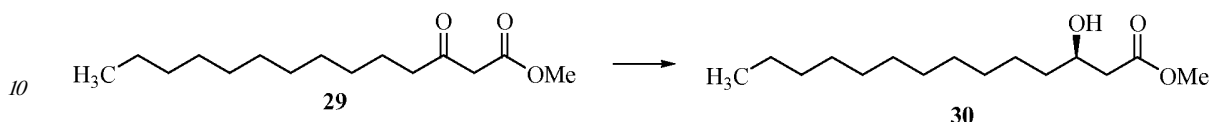


К суспензии этоксида магния (10,82 г, 94,61 ммоль) в 1,4-диоксане (100 мл) добавляли метилгидромалонат (25,0 г, 189 ммоль) в 1,4-диоксане (100 мл). Полученную взвесь перемешивали в течение ночи. Смесь концентрировали в условиях вакуума. В отдельном сосуде лауриновую кислоту (28, 20,85 г, 104,1 ммоль) растворяли в 1,4-диоксане (50 мл), и при комнатной температуре добавляли раствор CDI (16,88 г, 104,1 ммоль) в 1,4-диоксане (150 мл). Полученный раствор перемешивали в течение ночи. Смесь переносили в сосуд с малонатом метилмагния. Полученную суспензию нагревали с обратным холодильником в течение ночи. Смесь концентрировали в условиях вакуума. Остаток

повторно растворяли в DCM (300 мл) и фильтровали через слой силикагеля (10 г). Растворитель выпаривали в условиях пониженного давления. Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (360 г RediSep колонка, элюирование градиентом 0%→30% этилацетат/гексаны в течение 80 мин, 100 мл/мин) с получением

ПРИМЕР 28

(R)-Метил-3-гидрокситетрадеканоат (30)

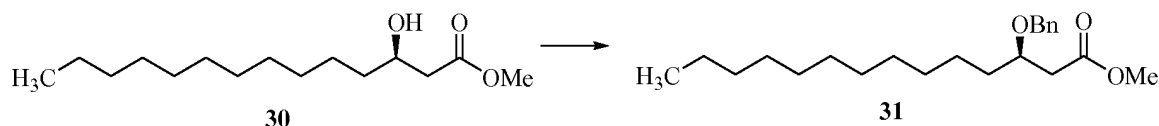


Взвесъ метил-3-оксотетрадеканоата (29, 29,0 г, 113 ммоль) в метаноле (120 мл) барботировали N₂ в стеклянном фильтре реактора высокого давления емкостью 300 мл в течение 10 минут. Добавляли дихлор-R-2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтилрутений (897 мг, 1,10 ммоль). Смесь помещали в компактный реактор Parr серии 5500. Реактор заполняли H₂ (60 фунт./кв.дюйм) и трижды выпускали газ. Реактор заполняли H₂ (60 фунт./кв.дюйм) и перемешивали (1200 об./мин) с нагреванием до 50°C в течение 20 ч. Реактор охлаждали до комнатной температуры, и концентрировали

полученный оранжевый раствор в условиях вакуума. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0%→40% этилацетат/гексаны в течение 60 мин, 85 мл/мин) с получением продукта 30 (28,5 г, 97% выход) в виде твердого вещества белого цвета.

ПРИМЕР 29

(R)-Метил-3-(бензилокси)тетрадеканоат (31)

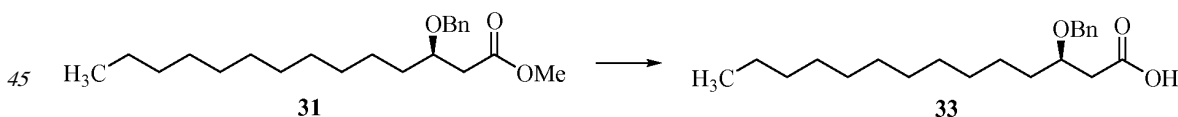


К раствору соединения 30 (2,8 г, 10,83 ммоль) и бензилтрихлорацетимидата (3,4 г, 14 ммоль) в DCM (100 мл) при 0°C по каплям добавляли трифторметансульфоновую кислоту (0,24 мл, 2,7 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 6 ч и нагревали до комнатной температуры. Смесь промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (300 мл) и водой (300 мл), и сушили органический слой над Na₂SO₄. Осушитель

удаляли путем фильтрации, и удаляли растворители с использованием роторного испарителя. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 80 г, элюирование градиентом 0%→30% этилацетат/гексаны в течение 60 мин, 60 мл/мин) с получением продукта 31 (1,2 г, 32%) в виде бесцветной жидкости. ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,30-7,05 (м, 5H), 4,51 (с, 2H), 3,90-3,80 (м, 1H), 3,70 (с, 3H), 2,58-2,45 (м, 2H), 1,80-1,60 (м, 2H), 1,50-1,20 (м, 18H), 0,85 (т, J=5,8 Гц, 3H).

ПРИМЕР 30

(R)-3-(бензилокси)тетрадекановая кислота (33)

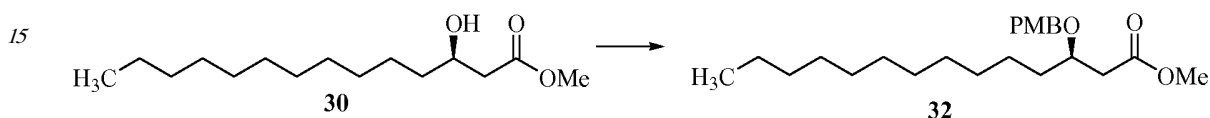


Сложный эфир 31 (1,3 г, 3,73 ммоль) растворяли в смеси THF/MeOH/CH₃CN (об./об./об., 1/1/1, 90 мл). Добавляли моногидрат гидроксида лития (235 мг, 5,6 ммоль) в виде

раствора в воде (30 мл), и перемешивали смесь в течение ночи. Количество растворителя уменьшали в условиях вакуума приблизительно до 30 мл. К оставшемуся водному раствору добавляли 1 М соляную кислоту для снижения значения pH до 3. Водный слой экстрагировали диэтиловым эфиром (3×40 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия. Осушитель удаляли путем фильтрации, и удаляли растворители с использованием роторного испарителя. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 40 г, элюирование градиентом 0%→50% этилацетат/гексаны в течение 40 мин, 40 мл/мин) с получением продукта 33 (990 мг, 79%) в виде бесцветной жидкости. ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,30-7,05 (м, 5H), 4,51 (с, 2H), 3,90-3,80 (м, 1H), 2,58-2,45 (м, 2H), 1,80-1,60 (м, 2H), 1,50-1,20 (м, 18H), 0,85 (т, J=5,8 Гц, 3H).

ПРИМЕР 31

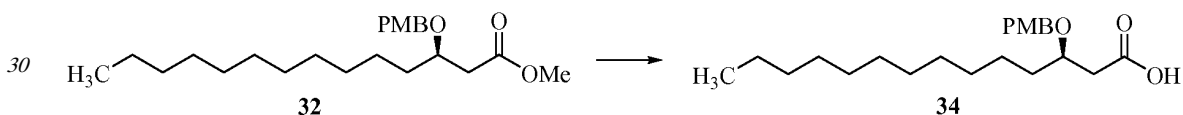
(R)-Метил-3-(4-метоксибензилокси)тетрадеканоат (32)



К раствору соединения 30 (3,50 г, 12,9 ммоль) и 4-метоксибензилтрихлорацетимидата (4,65 г, 17,3 ммоль) в DCM (100 мл) добавляли камфорсульфоновую кислоту (450 мг, 1,92 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Смесь промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (300 мл) и водой (300 мл) и сушили над Na₂SO₄. Осушитель удаляли путем фильтрации и удаляли растворители с использованием роторного испарителя. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0%→30% этилацетат/гексаны в течение 70 мин, 85 мл/мин) с получением продукта 32 (4,01 г, 81%) в виде бесцветной жидкости.

ПРИМЕР 32

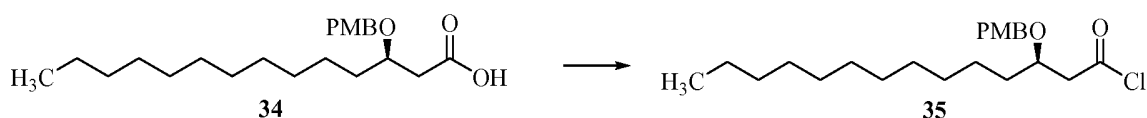
(R)-3-(4-Метоксибензилокси)тетрадекановая кислота (34)



Сложный эфир 32 (4,01 г, 10,4 ммоль) растворяли в смеси THF/MeOH/CH₃CN (об./об./об., 1/1/1, 90 мл). Добавляли моногидрат гидроксида лития (874 мг, 20,8 ммоль) в виде раствора в воде (30 мл), и перемешивали смесь в течение ночи. Количество растворителя уменьшали в условиях вакуума приблизительно до 30 мл. К оставшемуся водному раствору добавляли 1 М соляную кислоту для снижения значения pH до 3. Водный слой экстрагировали диэтиловым эфиром (3×40 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия. Осушитель удаляли путем фильтрации и удаляли растворители с использованием роторного испарителя. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0%→50% этилацетат/гексаны в течение 60 мин, 85 мл/мин) с получением продукта 34 (3,37 г, 89%) в виде бесцветной жидкости. ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,22 (д, J=6,1 Гц, 2H), 6,82 (д, J=6,1 Гц, 2H), 4,46 (с, 2H), 3,81 (м, 1H), 3,75 (с, 3H), 2,65-2,49 (м, 2H), 1,80-1,60 (м, 2H), 1,50-1,20 (м, 18H), 0,85 (т, J=5,8 Гц, 3H).

ПРИМЕР 33

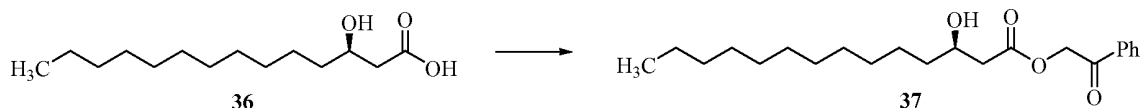
(R)-3-(4-Метоксибензилокси)тетрадеканоилхлорид (35)



К раствору кислоты 34 (500 мг, 1,37 ммоль) в DCM (5 мл) добавляли диметилформамид (DMF) (100 мг, 1,37 ммоль), и охлаждали полученную смесь до -10°C . По каплям добавляли оксалилхлорид (174 мг, 1,37 ммоль) в DCM (5 мл). Раствор оставляли нагреваться до комнатной температуры в течение 1 ч. После того как по методу ТСХ было показано отсутствие кислоты, смесь концентрировали в условиях вакуума и использовали без дополнительной очистки.

ПРИМЕР 34

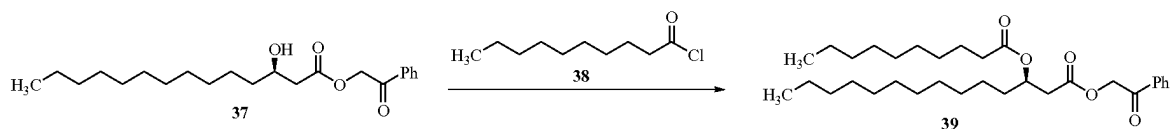
(R)-2-Оксо-2-фенилэтил-3-гидрокситетрадеканоат (37)



К раствору (R)-3-гидрокситетрадекановой кислоты (36, получение см. далее в тексте) (9,55 г, 39,1 ммоль) и триэтиламина (5,90 г, 58,6 ммоль) в этилацетате (500 мл) при комнатной температуре добавляли 2-бромацетофенон (7,90 г, 39,1 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 ч. Осадок удаляли путем фильтрации, и концентрировали фильтрат в условиях вакуума. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0% $\rightarrow$ 30% этилацетат/гексаны в течение 50 мин, 85 мл/мин) с получением продукта 37 (10,2 г, выход 72%) в виде твердого вещества белого цвета.

ПРИМЕР 35

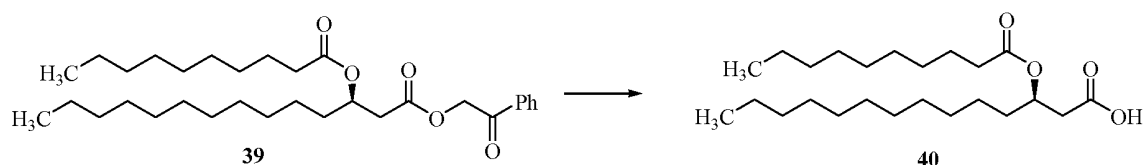
(R)-2-Оксо-2-фенилэтил-3-деcanoилокситетрадеканоат (39)



К раствору 37 (4,80 г, 13,2 ммоль) и пиридина (2,10 г, 26,5 ммоль) в DCM (100 мл) при 0°C добавляли деаноилхлорид (38, 2,8 г, 4,8 ммоль). Смесь перемешивали в течение 14 ч, позволяя температуре повыситься до комнатной температуры. Смесь промывали насыщенным раствором NaHCO_3 (100 мл) и соевым раствором (100 мл) и сушили над Na_2SO_4 . Осушитель удаляли путем фильтрации и удаляли растворители с использованием роторного испарителя. Остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0% $\rightarrow$ 40% этилацетат/гексаны в течение 50 мин, 85 мл/мин) с получением продукта 39 (6,68 г, 97%) в виде бесцветной жидкости.

ПРИМЕР 36

(R)-3-(Деаноилокси)тетрадекановая кислота (40)

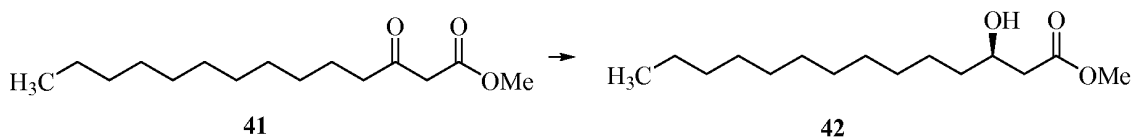


Сложный эфир 39 (10,15 г, 20,77 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (100 мл). Добавляли цинк (15,5 г, 237 ммоль), и нагревали смесь с обратным холодильником в течение 4 ч. Уксусную кислоту удаляли в условиях вакуума, и подвергали остаток азеотропной перегонке с толуолом. Остаток очищали по методу хроматографии на

силикагеле (колонка RediSep 120 г, элюирование градиентом 0%→60% этилацетат/гексаны в течение 50 мин, 85 мл/мин) с получением продукта 40 (7,2 г, 89%) в виде бесцветной жидкости. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 5,23-5,19 (м, 1H), 2,62-2,55 (м, 2H), 2,34-2,25 (м, 2H), 1,65-1,58 (м, 2H), 1,28-1,20 (м, 32H), 0,85 (м, 6H).

ПРИМЕР 37

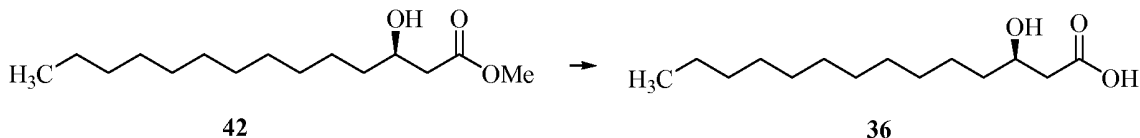
(R)-Метил-3-гидрокситетрадеcanoат (42)



Взвесь метил-3-оксотетрадеcanoата (41, 5,27 г, 20,6 ммоль) в метаноле (30 мл) барботировали N_2 в стеклянном фильтре реактора высокого давления емкостью 300 мл в течение 10 минут. Добавляли дихлор-R-2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтилрутеный (142 мг, 1,1 ммоль), и помещали смесь в компактный реактор Parr серии 5500. Реактор заполняли H_2 (60 фунт./кв.дюйм) и трижды выпускали газ. Затем реактор заполняли конечной порцией H_2 (60 фунт./кв.дюйм), и перемешивали (600 об/мин) при нагревании при 50°C в течение 20 ч. Затем реактор охлаждали до комнатной температуры, и концентрировали смесь в условиях вакуума. Полученный остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле, элюируя градиентом 0%→50% этилацетат/гексаны, с получением 42 (3,97 г, 74%) в виде твердого вещества не совсем белого цвета. ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 4,00-3,98 (м, 1H), 3,71 (с, 3H), 2,82 (д, $J=6,5$ Гц, 1H), 2,62-2,30 (м, 2H), 1,54-1,39 (м, 3H), 1,27 (ушир.с, 17H), (м, 20H), 0,86 (т, $J=7,0$ Гц, 3H).

ПРИМЕР 38

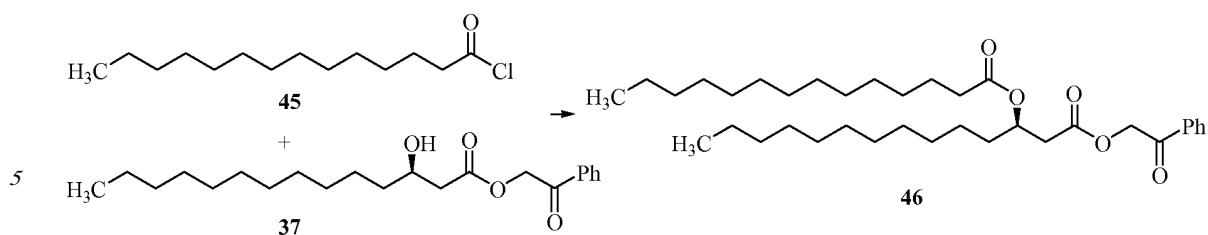
(R)-3-Гидрокситетрадекановая кислота (36)



К раствору (R)-метил-3-гидрокситетрадеcanoата (42, 8,17 г, 31,5 ммоль) в THF (66 мл) и воде (66 мл) добавляли моногидрат гидроксида лития (1,98 г, 47,2 ммоль), и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем смесь разбавляли диэтиловым эфиром (1 л), и корректировали значение pH до ~3 добавлением 1N раствора соляной кислоты. Затем раствор экстрагировали диэтиловым эфиром (200 мл) и органические фракции объединяли и сушили над Na_2SO_4 . Na_2SO_4 удаляли путем фильтрации, и концентрировали фильтрат в условиях вакуума с получением (R)-3-гидрокситетрадекановой кислоты (36, 7,59 г, 98%) в виде твердого вещества не совсем белого цвета. ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 3,99-3,94 (м, 1H), 2,45-2,39 (м, 2H), 1,47 (ушир.с, 3H), 1,29 (ушир.с, 17H), 0,89 (т, $J=7,0$ Гц, 3H).

ПРИМЕР 39

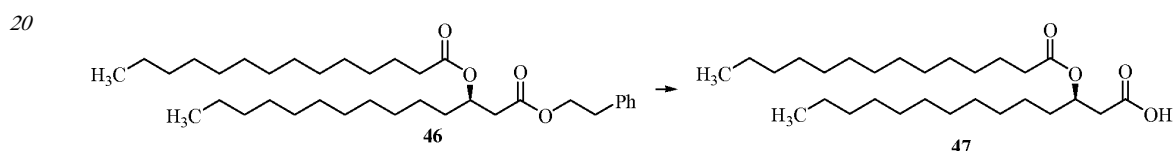
(R)-2-Оксо-2-фенилэтил-3-тетрадеcanoилокситетрадеcanoат (46)



К раствору (R)-2-оксо-2-фенилэтил-3-гидрокситетрадеканоата (37, полученного в соответствии с примером 34, 10,8 г, 29,8 ммоль) в пиридине (40 мл) добавляли миристоилхлорид (45, 8,83 г, 35,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 ч. Затем смесь концентрировали в условиях вакуума, и удаляли остаток пиридина путем растворения остатка в толуоле (100 мл) и концентрирования в условиях вакуума. Полученный остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле, элюируя градиентом 0%→20% этилацетат/гексаны, с получением 46 (16,31 г, 83%) в виде бесцветного масла. ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,90 (м, 2H), 7,64-7,57 (м, 1H), 7,50-7,45 (м, 2H), 5,33 (с, 2H), 5,31-5,27 (м, 1H), 2,80-2,70 (м, 2H), 2,33-2,26 (т, $J=4,5$ Гц, 2H), 1,65-1,58 (м, 2H), 1,31-1,21 (м, 40H), 0,85 (т, $J=10,0$ Гц, 6H).

ПРИМЕР 40

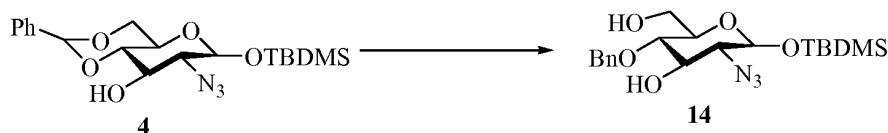
(R)-3-(Тетрадеканоилокси)тетрадекановая кислота (47)



К раствору 46 (16,28 г, 28,42 ммоль) в уксусной кислоте (150 мл) добавляли цинковую пыль (24,42 г, 373,3 ммоль). Затем смесь нагревали с обратным холодильником (115°C) в течение 3 ч. Затем смесь концентрировали в условиях вакуума, и удаляли остаток пиридина путем растворения остатка в толуоле (100 мл) и концентрирования в условиях вакуума. Полученный остаток очищали по методу хроматографии на силикагеле, элюируя градиентом 0%→30% этилацетат/гексаны, с получением (R)-бензил-3-(тетрадеканоилокси)тетрадекановой кислоты (47, 11,14 г, выход 86%) в виде бесцветного масла. ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 5,29-5,18 (м, 1H), 2,62-2,55 (м, 2H), 2,34-2,25 (м, 2H), 1,65-1,58 (м, 3H), 1,28-1,20 (м, 40H), 0,85 (м, 6H).

ПРИМЕР 41

трет-Бутилдиметилсилил-2-азидо-4-О-бензил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (14)



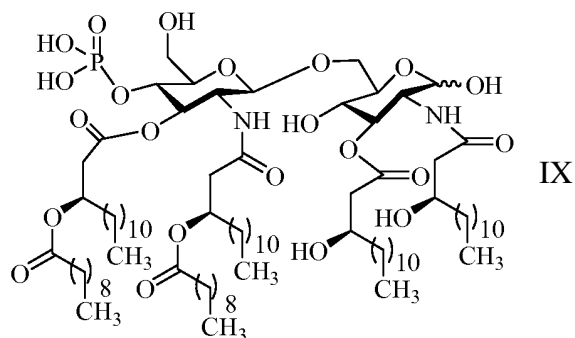
Соединение 4 (полученное в соответствии с примером 3, 1,32 г, 3,36 ммоль) растворяли в растворе BH_3 (1 М) в THF (18,1 мл, 18,1 ммоль). После перемешивания смеси при 0°C в течение 5 мин по каплям добавляли трифторметансульфонат дибутилбора (1 М в DCM, 3,62 мл, 3,62 ммоль), и перемешивали реакционную смесь при 0°C еще в течение 1 ч. Последовательно добавляли триэтиламин (0,5 мл) и метанол (~0,5 мл) до завершения выделения газа (H_2). Растворители выпаривали в условиях вакуума, и повторно упаривали остаток с метанолом (3×50 мл). Остаток очищали по методу колоночной хроматографии на силикагеле (гексаны/этилацетат, 8/1 (об./об.)) с получением 14 (0,67

г, 49%) в виде бесцветного масла. $R_f=0,40$ (гексаны/этилацетат, 3/1 (об./об.)). ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,32-7,31 (м, 5H), 4,81 (д, $J=11,4$ Гц, 1H), 4,70 (д, $J=11,4$ Гц, 1H), 4,55 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 3,84 (м, 1H), 3,70 (дд, 1H, $J=12,0$, 1,5 Гц, 1H), 3,49-3,43 (м, 2H), 3,33 (ушир.с, 1H), 3,22-3,17 (м, 1H), 0,92 (с, 9H), 0,14 (с, 6H).

ПРИМЕР 42

Индукция Th1-типа иммунного ответа *in vivo*

В этом примере продемонстрирован Th1-тип иммуностимулирующей активности *in vivo* типичного GLA соединения по настоящему изобретению, имеющего следующее строение (IX):



Соединение IX использовали в вакцине, содержащей антигенный полипептид *Mycobacterium tuberculosis*, называемый ID83. Использовали стандартные иммунологические методики и реагенты (Current Protocols in Immunology, Coligan et al. (Eds.) 2006 John Wiley & Sons, NY). Мышей (по четыре животных линии C57BL/6 в группе) иммунизировали трижды с интервалами в три недели антигеном ID83 (8 мкг на животное для каждой иммунизации) в воде, антигеном ID83 (8 мкг на животное для каждой иммунизации) в составе стабильной эмульсионной основы, или антигеном ID83 (8 мкг на животное для каждой иммунизации) в составе стабильной эмульсии, содержащей (i) GLA-SE (10 мкг на животное для каждой иммунизации) или (ii) соединение IX (10 мкг на животное для каждой иммунизации).

Через неделю после каждой инъекции у мышей осуществляли отбор крови для оценки антиген-специфического антителогенеза (IgG1 и IgG2c). Через три недели после последней иммунизации мышей умерщвляли и выделяли селезенки для анализа Т-клеточно-зависимой секреции IFN- γ в ответ на антигенную стимуляцию *in vitro* по методу ELISPOT в соответствии с опубликованными способами (Id.). Секреция IFN- γ была ассоциирована с Th1 защитным фенотипом в отношении инфекции *M. tuberculosis*.

На фигуре 1 представлены данные ELISPOT по анти-ID83 продукции IFN- γ , индуцированной у мышей через три недели после третьей иммунизации с использованием антигена ID83 и содержащих ID83 компонент антигенов (Rv2608, Rv1813 и Rv3620) в составе стабильной эмульсии (SE) 10 мкг соединения IX, по сравнению с ID83 в составе GLA-SE, SE или в воде. Представлены средние значения и стандартная ошибка среднего секретирующих IFN- γ клеток на миллион спленоцитов в каждой группе. Термин «GLA-SE», используемый в примерах в настоящем документе, относится к стабильной эмульсии соединения, описанного в публикации находящегося в совместном владении патента США №20080131466, где R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} линейный алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_{13} линейный алкил.

У всех животных наблюдался эквивалентный ответ на ConA, сильный клеточный активатор и митоген. Вакцинация (ID83 + соединение IX) индуцировала сильные ID83-

антиген-специфические цитокиновые ответы, тогда как в контрольных группах (ID83 + вода) или (ID83+SE) наблюдали слабые ответы или отсутствие таковых. Такое же количество секретирующих IFN- γ клеток выявляли в спленоцитах, полученных от мышей, иммунизированных (ID83 + соединение IX) или (ID83+GLA-SE), после повторной стимуляции содержащими ID83 компонент антигенами, Rv2608, Rv1813 и Rv3620.

В заключение, соединение IX в стабильной масляной лекарственной форме с вакцинным антигеном *M. tuberculosis* типа ID83 индуцировал преимущественно антиген-специфические иммунные ответы клеточного типа (Т-клеточного), ассоциированные с защитным Th1 фенотипом.

ПРИМЕР 43

Индукция Th1- и Th2-типа иммунного ответа *in vivo*

В этом примере продемонстрированы Th1-тип и Th2-тип иммуностимулирующей активности *in vivo* соединения IX в вакцине, содержащей антиген *Mycobacterium tuberculosis*, называемый ID83. Использовали стандартные иммунологические методики и реагенты Current Protocols in Immunology, Coligan et al. (Eds.) 2006 John Wiley & Sons, NY).

Мышей (по четыре животных линии C57BL/6 на группу) иммунизировали трижды с интервалами в три недели антигеном ID83 (8 мкг на животное для каждой иммунизации), который применяли отдельно или в составе стабильной эмульсии, содержащей соединение IX (10 мкг на животное для каждой иммунизации). Через неделю после каждой иммунизации осуществляли отбор крови для сбора сыворотки и исследовали сывороточное содержание специфичных к ID83 антител IgG1 и IgG2c по методу ELISA в соответствии с опубликованными способами (Id.). Преобладание либо IgG1, либо IgG2c изотипа антитела ассоциируют с Th2 или Th1 ответами, соответственно. Было показано, что Th1 ответ необходим для защиты от инфекции *Mycobacterium tuberculosis*.

Как представлено на фигуре 2, вакцинация ID83 в воде индуцировала преимущественно образование антиген-специфического IgG1 антитела. Напротив, вакцинация (ID83+SE), (ID83+ соединение IX-SE) или (ID83+GLA-SE) индуцировала повышение титров антитела IgG2c, и преобразовывала фенотип до смешанного IgG1/IgG2c антиген-специфического антителогенеза.

ПРИМЕР 44

Индукция TLR4-зависимой иммуностимуляции в клетках человека

В этом примере продемонстрирована иммуностимулирующая активность соединения IX в отношении клеток человека. Соединение IX тестировали *in vitro* с использованием HEK293 клеток (InvivoGen) с экспрессирующими векторами, кодирующими 1) TLR4, MD-2 и CD14, или 2) TLR2 и TLR6, для определения активности соединения и его зависимости от TLR4, и для исключения активации TLR2. Указанные линии HEK293 клеток были затем стабильно трансфицированы NF-kB-репортерным вектором pNifty-2 так, что после активации TLR-связанного пути передачи сигнала в ростовую среду секретируется щелочная фосфатаза. Линии трансфицированных клеток высевали в 96-луночные планшеты по 5×10^4 клеток на лунку и стимулировали в течение 16-24 часов, культивируя их в среде, содержащей последовательные разведения соединения IX и других адъювантов. Активность секретируемой щелочной фосфатазы измеряли в культуральных средах с использованием метода анализа QUANTIBLue® (InvivoGen). Данные измеряли как усиление продукции NF-kB по сравнению с отрицательным контролем (PBS). С использованием этого метода анализа соединение IX продемонстрировало более чем двукратное усиление продукции NF-kB при таких низких

концентрациях, как 0,1 мкг/мл (фигура 3). Результаты этих экспериментов продемонстрировали выраженную активность агониста TLR4 для соединения IX, которая, по-видимому, не ассоциирована с индукцией TLR2. Соединение IX было сконструировано на основании структурных особенностях описанной атомной структуры MD2 и TLR4. В этой связи, факт его связывания и проявленный профиль активности, аналогичный таковому для коммерчески одобренного агониста TLR4 (MPL®), является поразительным и неожиданным результатом. Более конкретно, профиль активности соединения IX выгодным образом быстро выходит на плато с увеличением концентрации, до того момента, как можно было бы ожидать повышение содержания цитокинов до отметки, когда себя могут проявить отрицательные побочные эффекты. Таким образом, предполагается, что соединение IX и другие типичные соединения по настоящему изобретению могут быть безопасно введены в широком диапазоне концентраций, что крайне желательно в контексте воспроизводимости исходов заболеваний у пациентов и для безопасности при задании диапазона доз для взрослых и детей. В этой связи, низкая цитокиновая активность соединения IX является поразительным и желаемым результатом, который дополнительно облегчает его безопасное применение в клинических лекарственных формах.

ПРИМЕР 45

Индукция иммуностимулирующих цитокинов в клетках крови человека

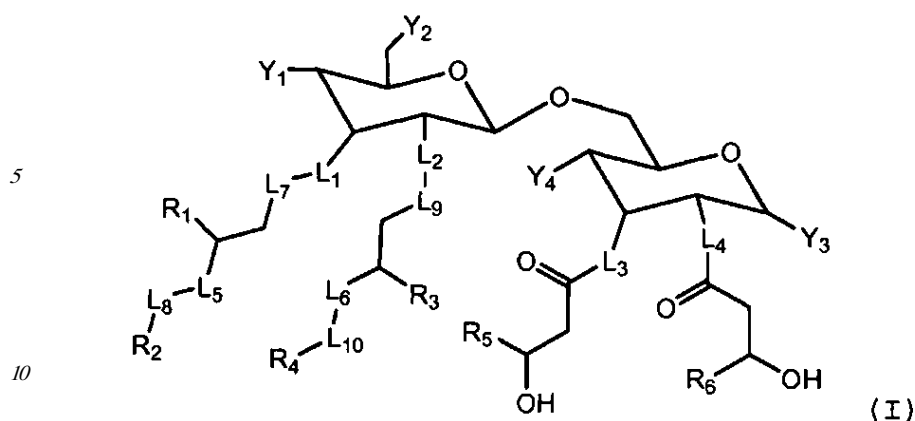
В этом примере клетки цельной крови человека стимулировали соединением IX и проводили ELISA-анализ для обнаружения индукции иммуностимулирующих цитокинов. Последовательные разведения (1:5) соединения IX и других адъювантов проводили в фосфатно-буферном растворе в 96-луночной планшете всего в 7 разведениях. По 100 мкл свежееотобранной крови человека от двух разных доноров смешивали и инкубировали со 100 мкл разбавления адъюванта. После 20-часовой инкубации планшеты центрифугировали и собирали надосадочные жидкости (~70 мкл), избегая попадания красных клеток крови, и хранили при температуре -20°C до проведения ELISA-анализов на MIP-1-α и TNF-α с использованием стандартных биохимических методик. Результаты указанных экспериментов дополнительно подтвердили, что соединение IX обладает иммуностимулирующей активностью в отношении основных клеток крови человека (фигура 4). Кроме того, эти первичные результаты на донорах имитируют результаты, наблюдаемые в линиях клеток человека, и распространяют эти важные открытия в отношении возможных диапазонов доз и профилей безопасности для этого соединения.

Все патенты США, публикации заявок на выдачу патента США, заявки на выдачу патента США, зарубежные патенты, заявки на выдачу зарубежных патентов и непатентные публикации, упомянутые выше в настоящем описании и/или перечисленные в спецификации заявки, включены во всей их полноте в настоящий документ посредством ссылки.

Из вышеизложенного следует понимать, что хотя конкретные варианты осуществления настоящего изобретения были описаны в настоящем документе для целей пояснения, могут быть сделаны различные модификации без выхода за рамки сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно, настоящее изобретение не ограничено, за исключением прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. GLA (глюкопиранозиллипидный адъювант) соединение, имеющее следующую структуру (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆ являются одинаковыми или различными и независимо

представляют собой -O- или -NH-;

L₇, L₈, L₉ и L₁₀ являются одинаковыми или различными и независимо отсутствуют или представляют собой -C(=O)-;

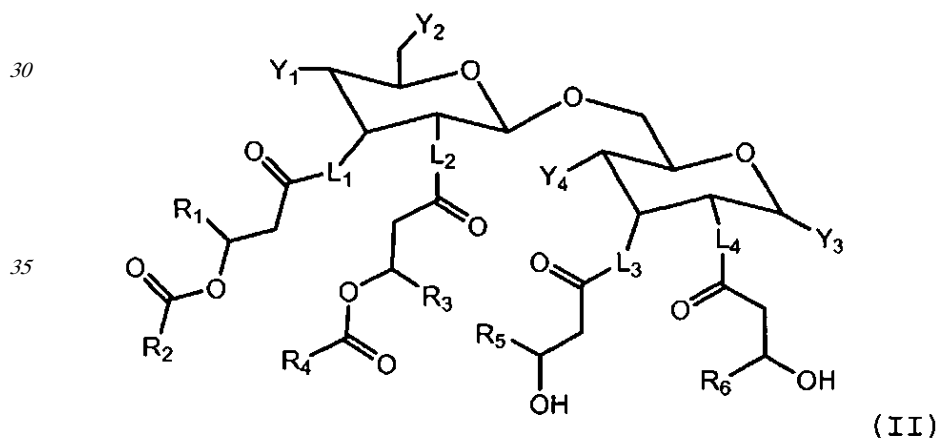
Y₁ представляет собой -OP(O)(OH)₂;

Y₂, Y₃ и Y₄ каждый представляет -OH;

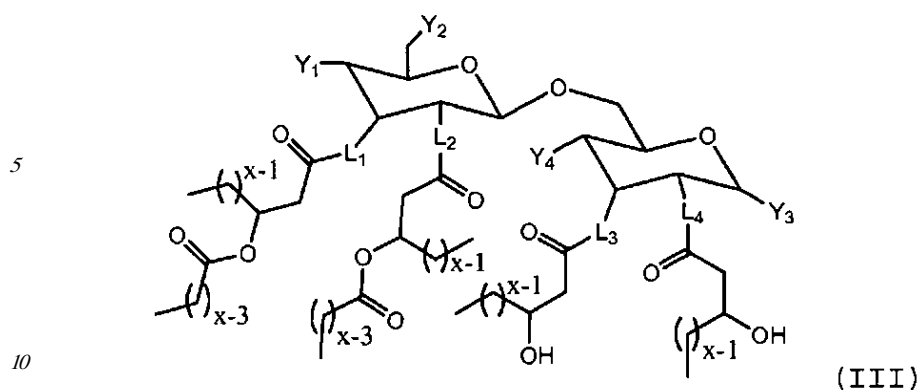
R₁, R₃, R₅ и R₆ являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой C₈₋₁₃алкил; и

R₂ и R₄ являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой C₆₋₁₁алкил.

2. GLA соединение по п. 1, где L₅ и L₆ оба представляют собой -O-, а каждый из L₇, L₈, L₉ и L₁₀ представляет собой -C(=O)-, и GLA соединение имеет следующую формулу (II):

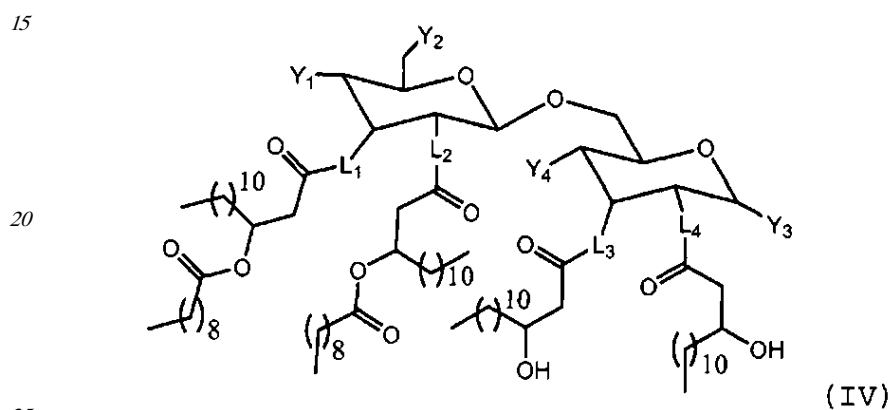


3. GLA соединение по п. 2, где каждый из R₁, R₃, R₅ и R₆ представляет собой C_xалкил, где x является постоянной и выбран из целых чисел от 8 до 13, а R₂ и R₄ оба представляют собой C_{x-2}алкил, и GLA соединение имеет следующую формулу (III):

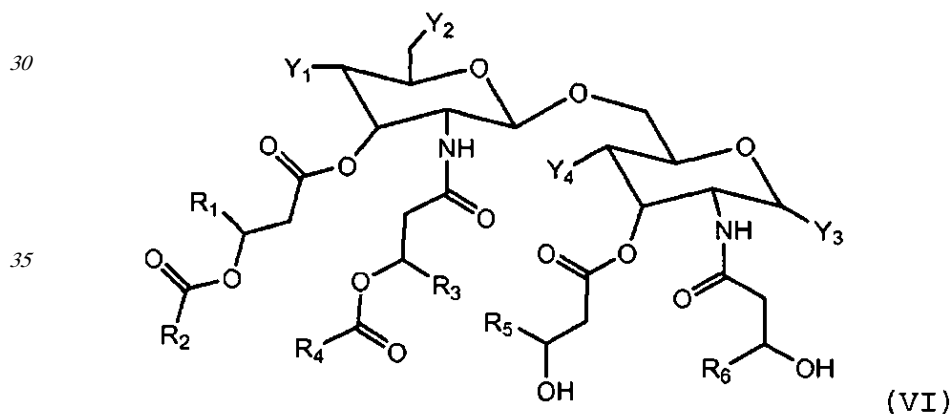


4. GLA соединение по п. 3, где x выбирают из целых чисел от 10 до 12.

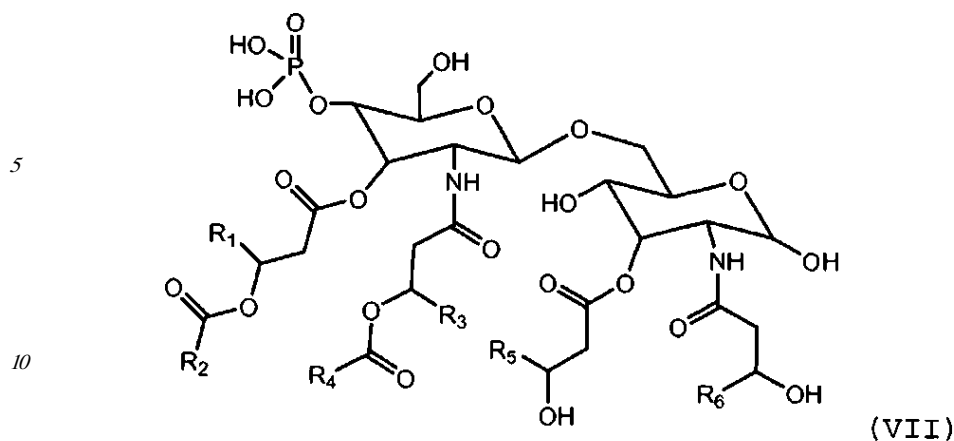
5. GLA соединение по п. 4, где x равен 11, и GLA соединение имеет следующую структуру (IV):



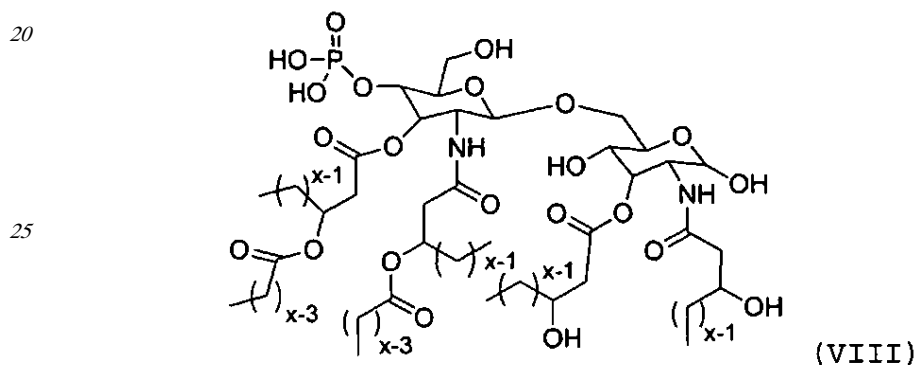
6. GLA соединение по п. 2, где L_1 и L_3 оба представляют собой -O-, а L_2 и L_4 оба представляют собой -NH-, и GLA соединение имеет следующую формулу (VI):



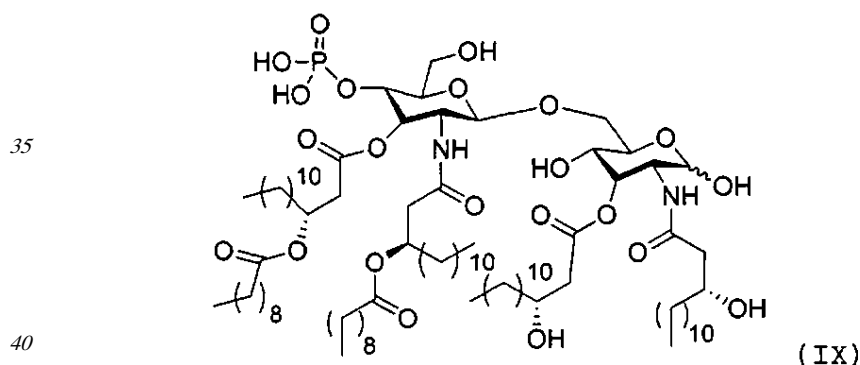
7. GLA соединение по п. 2, где Y_1 представляет собой $-OP(O)(OH)_2$, каждый из Y_2 ; Y_3 и Y_4 представляет собой -OH, L_1 и L_3 оба представляют собой -O-, и L_2 и L_4 оба представляют собой -NH-, и GLA соединение имеет следующую формулу (VII):



8. GLA соединение по п. 2, где Y_1 представляет собой $-OP(O)(OH)_2$, каждый из Y_2 , Y_3 и Y_4 представляет собой $-OH$, L_1 и L_3 представляют собой $-O-$, L_2 и L_4 оба представляют собой $-NH-$, каждый из R_1 , R_3 , R_5 и R_6 представляет собой C_x алкил, где x является постоянной и выбирают из целых чисел от 8 до 13, и R_2 и R_4 оба представляют собой C_{x-2} алкил, и GLA соединение имеет следующую формулу (VIII):



9. GLA соединение по п. 8, где x равен 11, и GLA соединение имеет следующую структуру (IX):



10. Вакцинная композиция для стимулирования антиген-специфических иммунных ответов, содержащая соединение по любому из пп. 1-9 в сочетании с антигеном или с рекомбинантным экспрессирующим вектором, кодирующим антиген.

11. Вакцинная композиция по п. 10, где рекомбинантный экспрессирующий конструкт представляет собой вирусный вектор.

12. Вакцинная композиция по п. 11, где вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из аденовирусного вектора, адено-ассоциированного вирусного вектора, герпесвирусного вектора, лентивирусного вектора, поксивирусного вектора и

ретровирусного вектора.

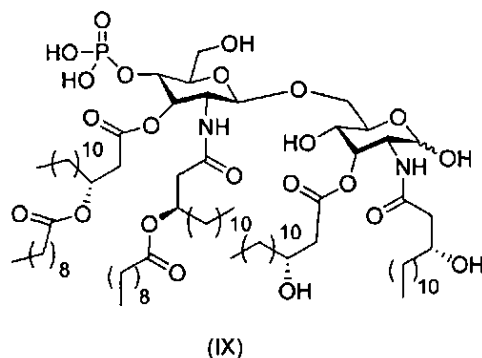
13. Способ индукции или усиления антиген-специфического иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту вакцинной композиции по п. 10.

14. Фармацевтическая композиция для стимулирования неспецифического иммунного ответа, содержащая соединение по любому из пп. 1-9 и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

15. Способ стимуляции неспецифического иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 14.

16. Вакцинная композиция для стимулирования неспецифического иммунного ответа у субъекта, содержащая соединение по п. 1.

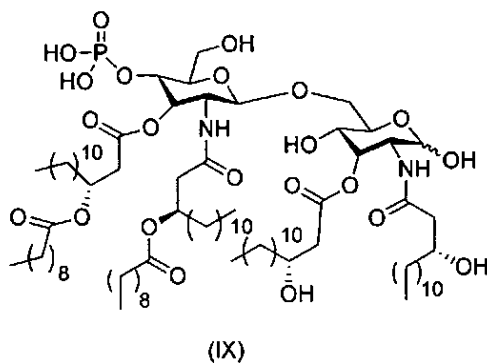
17. Вакцинная композиция по п. 16, где соединение имеет следующую структуру



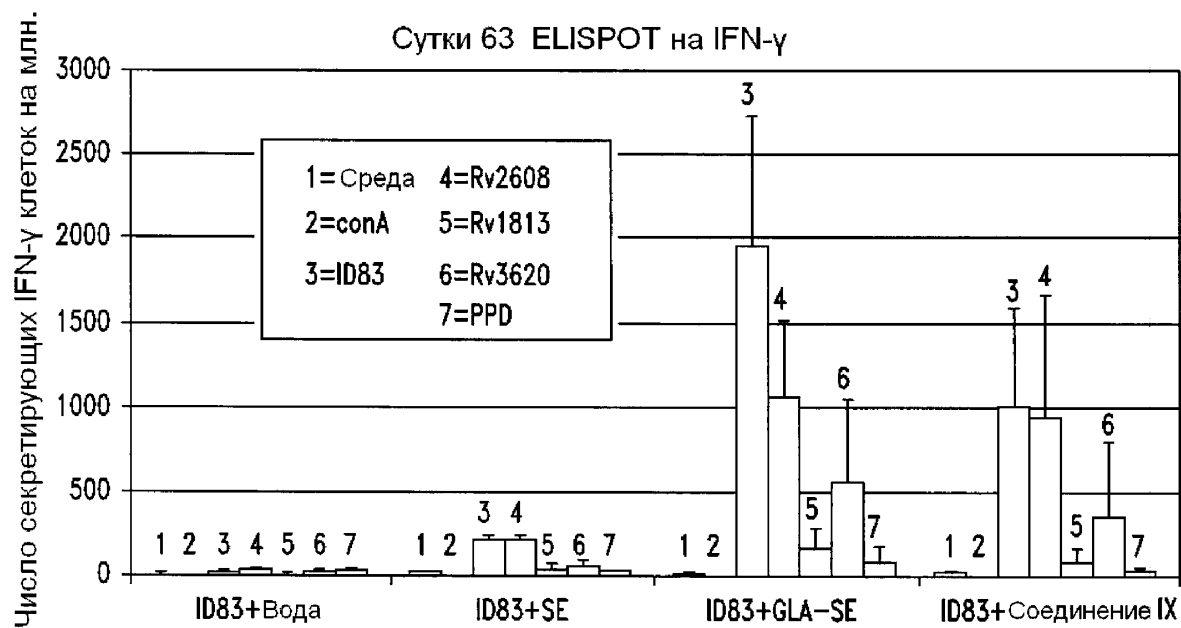
18. Вакцинная композиция по п. 16, которая по существу свободна от антигенов.

19. Способ стимулирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей соединение по п. 1.

20. Способ по п. 19, где соединение имеет следующую структуру



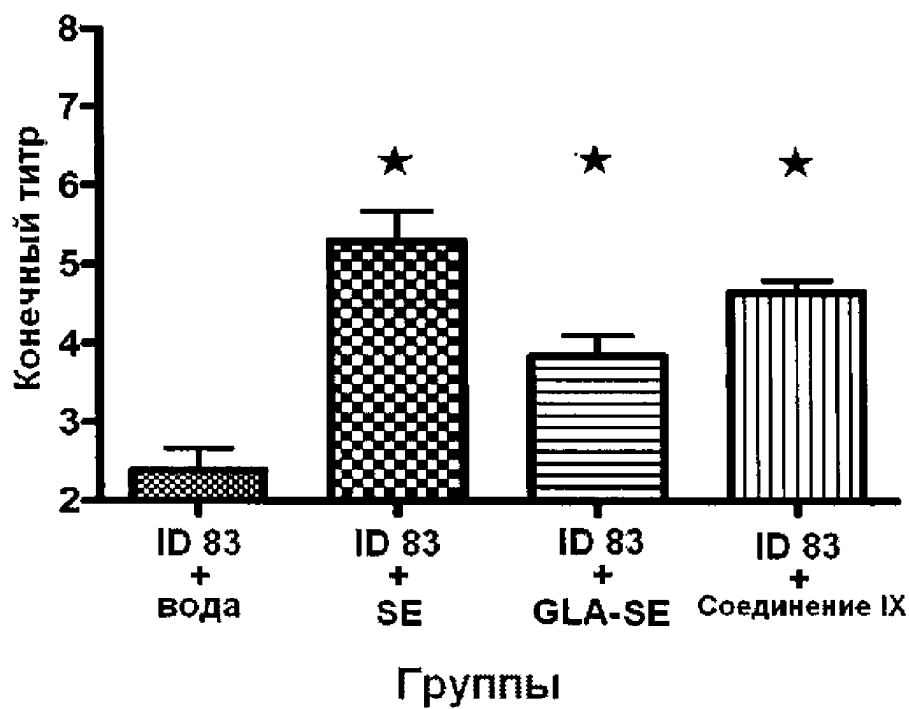
21. Способ по п. 19, где композиция по существу свободна от антигенов.



1=Media	4=Rv2608
2=conA	5=Rv1813
3=ID83	6=Rv3620
	7=PPD

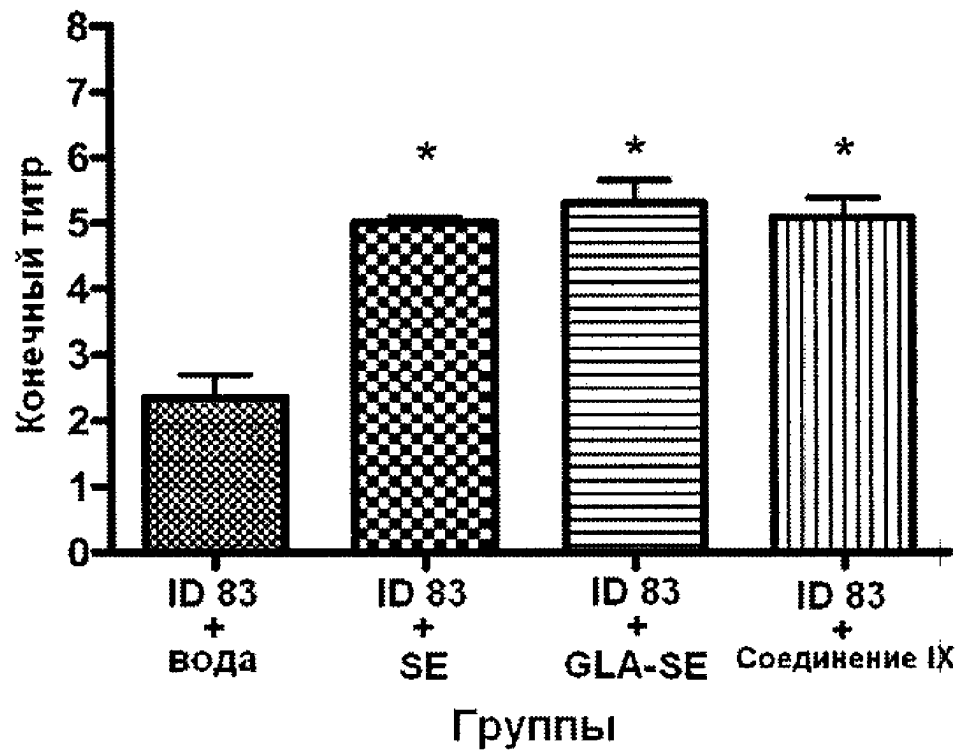
ФИГ. 1

Stat IgG1 против ID83 (Сутки 7)



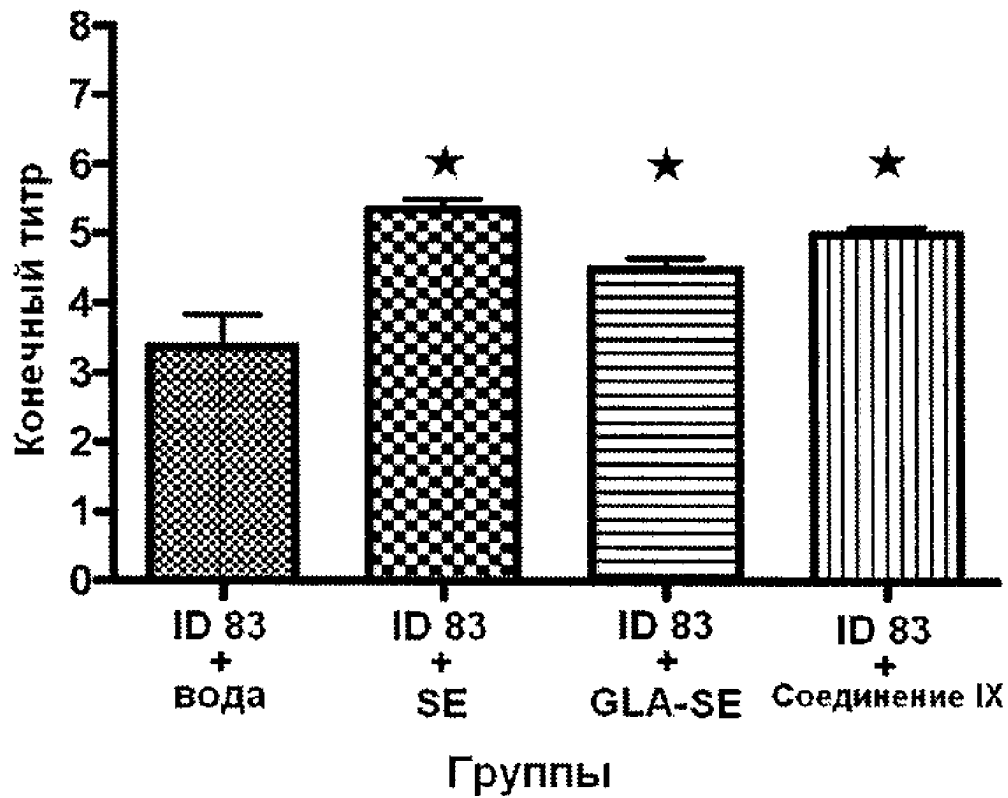
ФИГ. 2А

Stat IgG2c против ID83 (Сутки 7)



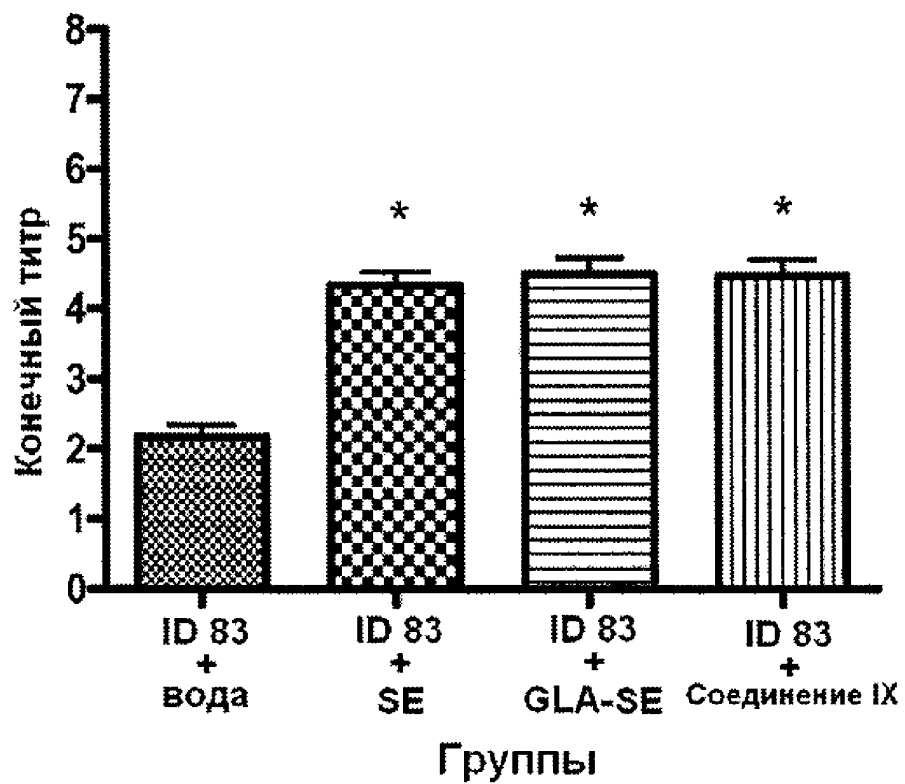
ФИГ. 2В

Stat IgG1 против ID83 **(Сутки 21)**



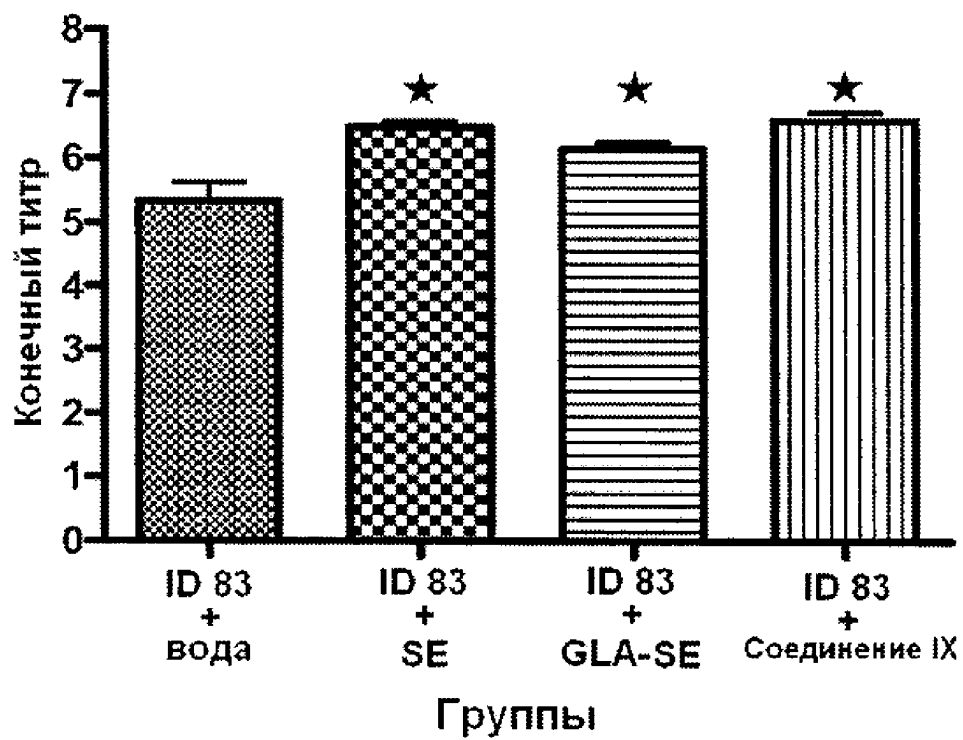
ФИГ. 2С

Stat IgG2c против ID83 (Сутки 21)



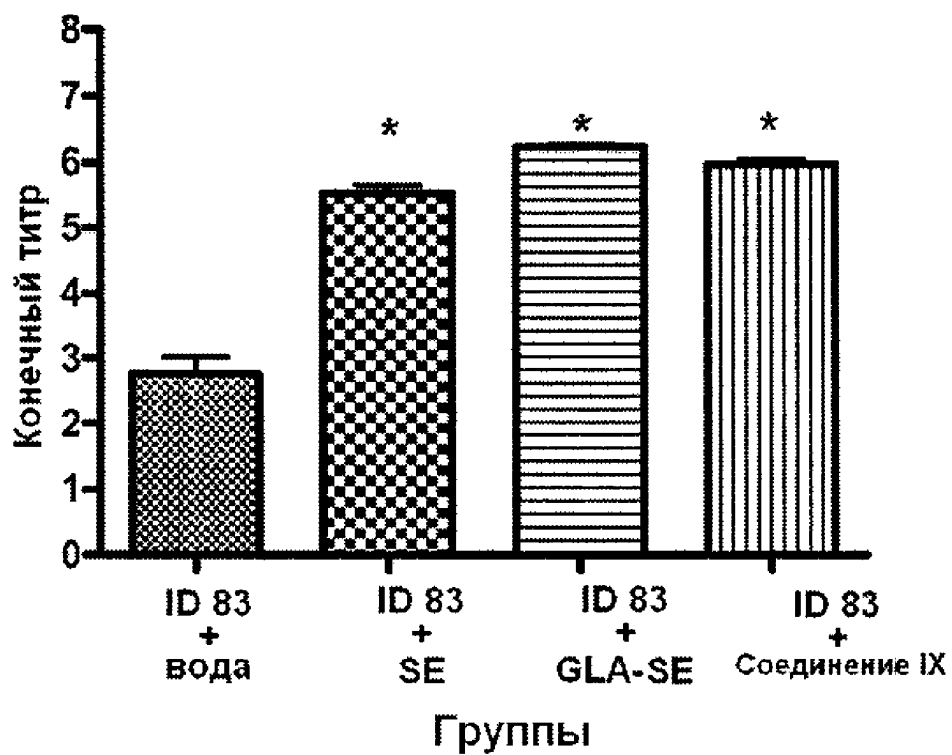
ФИГ. 2D

Stat IgG1 против ID83 (Сутки 42)

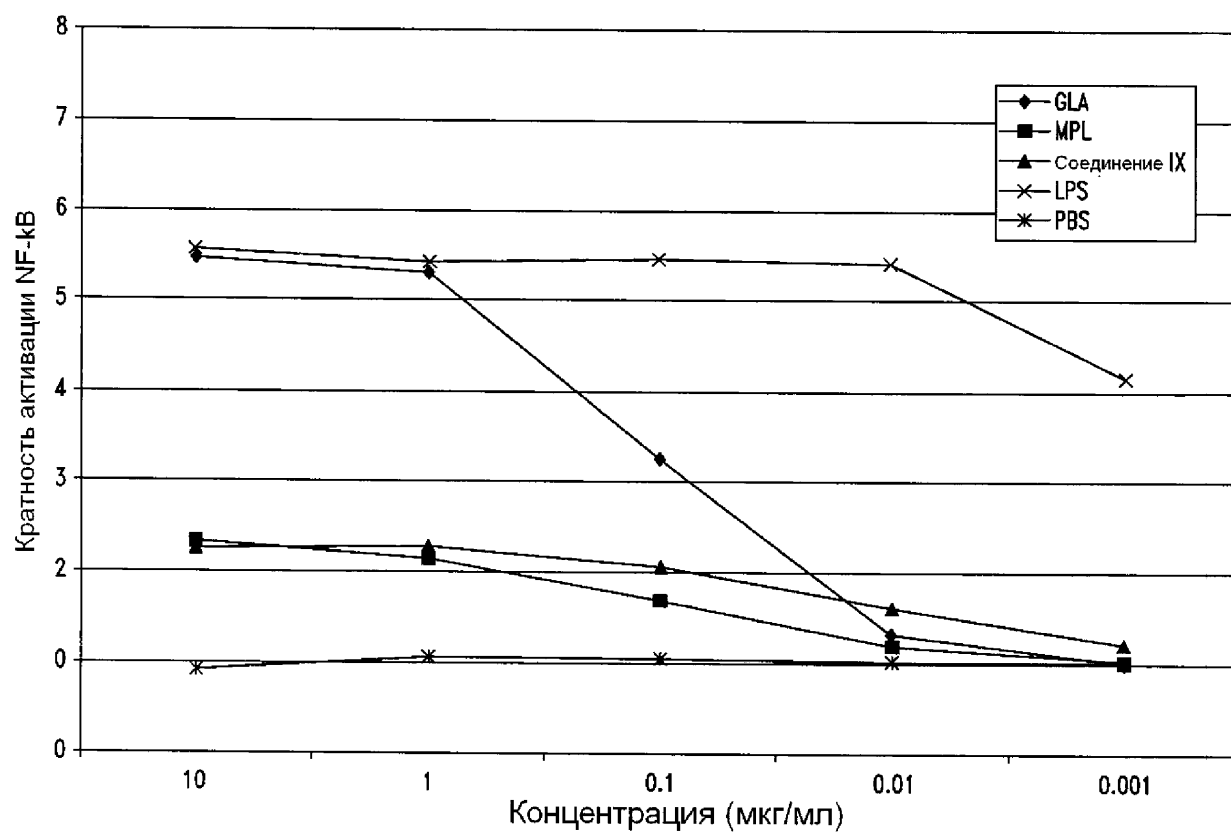


ФИГ. 2Е

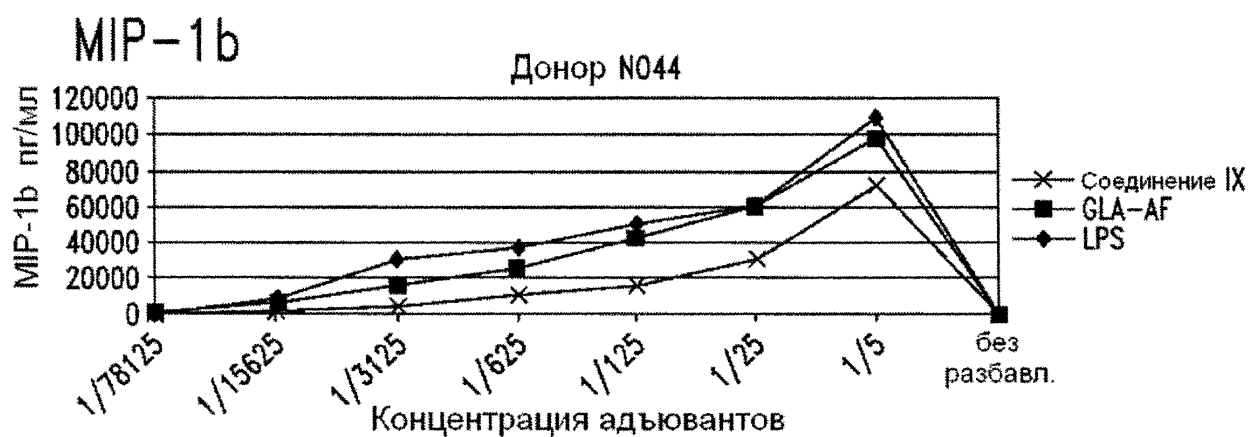
Stat IgG2c против ID83 (Сутки 42)



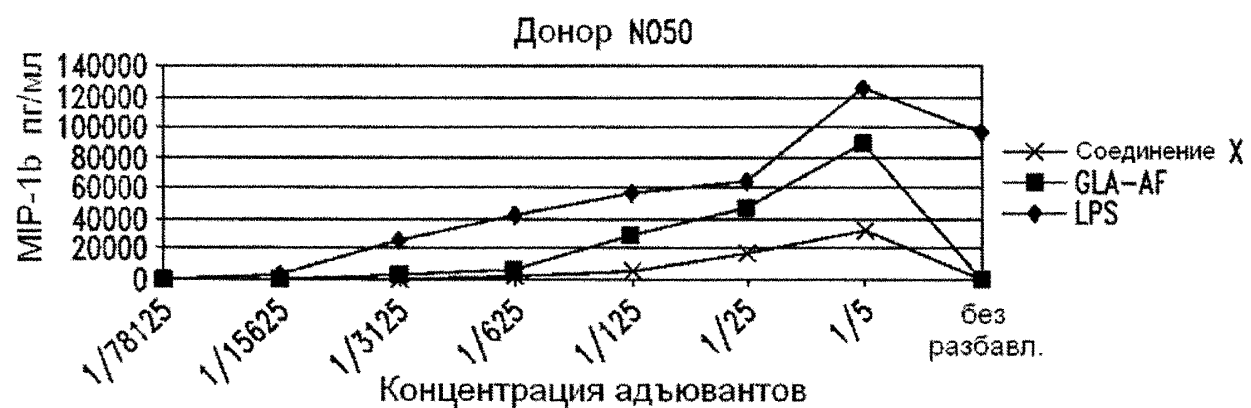
ФИГ. 2F



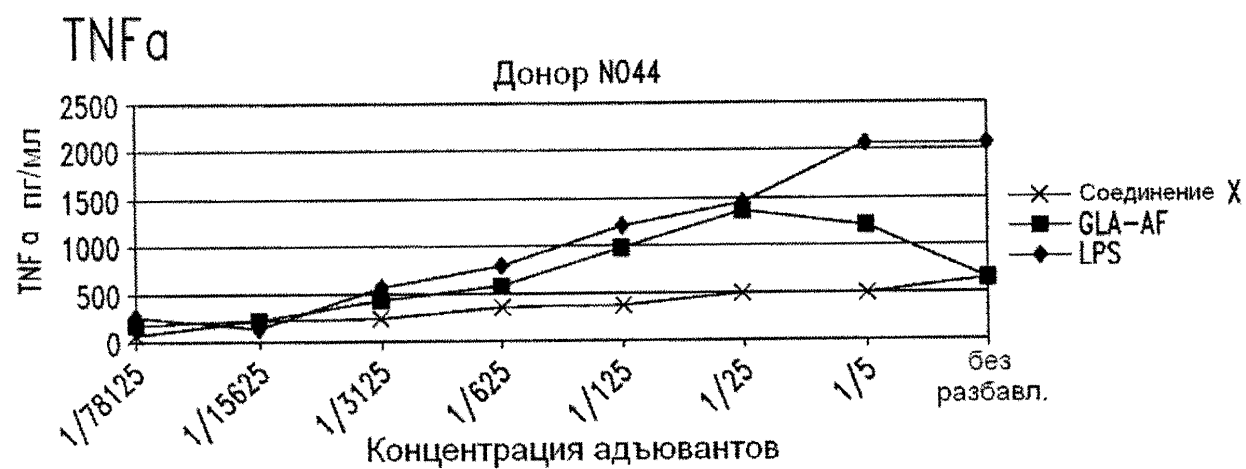
ФИГ. 3



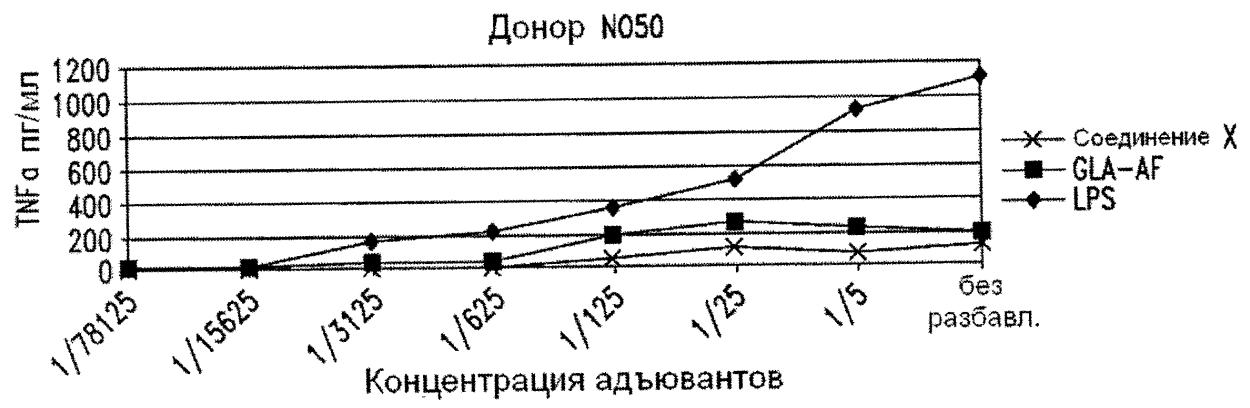
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



ФИГ. 4С



ФИГ. 4D