

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 262**

51 Int. Cl.:
C07H 13/06 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00980380 .0**
96 Fecha de presentación: **15.11.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1232168**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.2002**

54 Título: **ANÁLOGOS DEL LÍPIDO A SINTÉTICOS Y SUS UTILIZACIONES.**

30 Prioridad:
15.11.1999 US 164928 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.12.2011

73 Titular/es:
ONCOTHYREON INC.
2601 FOURTH AVENUE, SUITE 500
SEATTLE, WA 98121, US

72 Inventor/es:
JIANG, Zi-Hua;
BACH, Mimi;
YALAMATI, Damayanthi;
KOGANTY, Rao y
LONGENECKER, Michael

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 370 262 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos del lípido A sintéticos y sus utilidades.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevas simulaciones estructurales sintéticas de lípido A bacteriano. Las composiciones de lípido A bacteriano están siendo muy utilizadas como adyuvantes para mejorar las respuestas inmunitarias a varios antígenos utilizados en las formulaciones de vacunas. Un adyuvante sintético, que es una única entidad definida químicamente, conduce a la homogeneidad requerida para las formulaciones de vacuna de origen liposómico o de mezclas normales. La presente invención incluye el diseño de análogos de lípido A, con mucha menos toxicidad pero con propiedades adyuvantes comparables a las del lípido A natural. Estas estructuras sintéticas incorporan lípidos no naturales, enlaces químicos no naturales y combinaciones de cadenas lipídicas que no se encuentran entre las estructuras naturales del lípido A.

15 **Antecedentes de la invención**

El lipopolisacárido (LPS) es un glucolípido único encontrado exclusivamente en el foliolo externo de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Estructuralmente^{1a, b}, la molécula de LPS bacteriano tiene tres regiones principales: la región O-antígeno, la región central y la región del lípido A. La región del O-antígeno es un resto de polisacárido específico de la cepa y determina la especificidad antigénica del organismo. La región central es una cadena de oligosacáridos y puede desempeñar una función en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa. La región del lípido A está conservada y funciona como un lipopolisacárido que mantiene el anclaje hidrófobo en su sitio.

El LPS es conocido por desencadenar muchos episodios patofisiológicos en mamíferos, ya sea cuando se inyecta o cuando se acumula debido a la infección^{1b} de las bacterias Gram-negativas. Antes del descubrimiento del componente del lípido A de LPS el término "endotoxinas" se utilizaba generalmente para describir los efectos del LPS. La endotoxina de las bacterias Gram-negativas es térmicamente estable, está asociada a las células, es pirógena y potencialmente letal. Además de sus actividades endotóxicas, LPS también presenta varias actividades biológicas que incluyen la actividad inmunoadyuvante, la mitogenia de los linfocitos B, la activación de los macrófagos, la producción de interferones, la regresión tumoral, etc. Aunque tanto las regiones del O-antígeno como las centrales modulan la actividad tóxica del LPS, se cree generalmente que el resto hidrófobo del lípido A es responsable de estos efectos patofisiológicos de la endotoxina^{2a, b}.

El lípido A consiste en un disacárido D-glucosamina unido por β -(1,6) fosforilado en las posiciones 1-O y 4'-O. Los ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados están unidos a los grupos hidroxilo y amino del disacárido para comunicar hidrofobia al lípido A. La figura 1 presenta dos ejemplos de estructuras naturales de lípido A, el compuesto A^{3a, b} aislado de *E. coli*, y el compuesto B^{4a, d} aislado de las cepas de *Salmonella*. Takada y Kotani han realizado un estudio a fondo de los requisitos estructurales del lípido A para la endotoxicidad y otras actividades biológicas^{5a}, gracias a la disponibilidad de los análogos sintéticos del lípido A debido a los esfuerzos de varios grupos⁶⁻¹⁰. Ribi *et al.*^{5b} demostraron que la estructura mínima requerida para la toxicidad era un núcleo de di-glucosamina unido por β -(1,6) bisfosforilado a la que se acoplan los ácidos grasos de cadena larga. Parece que en el eje central del disacárido se necesita un número óptimo de cadenas lipídicas, en forma de grupos hidroxilado o aciloxilado, para ejercer fuertes actividades endotóxicas y biológicas relacionadas del lípido A⁶. Para la actividad inmunoadyuvante, sin embargo, los requisitos estructurales del lípido A no parecen ser tan rígidos como los necesarios para la actividad endotóxica y las propiedades que producen IFN- α/β o FNT⁵. La eliminación de todos los ácidos grasos, sin embargo, deroga todas las actividades biológicas atribuidas normalmente al lípido A.

Además, la eliminación del grupo fosfato da como resultado una pérdida significativa de toxicidad sin una pérdida correspondiente de actividad adyuvante. Los bioanálisis en monofosforil lípido A demuestran que, aunque era 1.000 veces menos potente en una base molar para producir respuestas tóxicas y pirógenas, era comparable a difosforil lípido A (y a la propia endotoxina) en actividades inmunoestimulantes^{11a}. Es conocido que el difosforil lípido A procedente de las cepas de *E. coli* y *Salmonella* es muy tóxico, pero el monofosforil lípido A de *E. coli* ha reducido la toxicidad a la vez que conserva las numerosas actividades biológicas que están asociadas normalmente al LPS^{11b, c, d}.

Las potentes actividades biológicas del lípido A han dirigido numerosos esfuerzos de investigación hacia el desarrollo de aplicaciones útiles. Por ejemplo, la inhibición de la biosíntesis del lípido A es una nueva actividad objetivo para los fármacos antibacterianos^{12, 13}, y los fármacos del futuro que funcionan mediante este mecanismo inhibidor constituirán una nueva clase de antibióticos^{14, 15}. La actividad inmunoestimulante del lípido A se ha investigado para desarrollar nuevos agentes antitumorales terapéuticos^{16, 17} e inmunoadyuvantes utilizando estructuras y análogos de lípido A modificados. Por otra parte, los agentes terapéuticos de los análogos del lípido A han sido investigados para el tratamiento de la septicemia¹⁸ basándose en sus capacidades para inhibir la interacción con macrófagos, y como antagonistas para la actividad tóxica del lípido A. Recientemente, Eisai¹⁹ desarrolló un potente antagonista del lípido A

sintético para el tratamiento de la septicemia.

Resultan necesarios un tratamiento eficaz para los trastornos asociados a lípido A/LPS, y un potente adyuvante sin toxicidad asociada. La gran toxicidad del lípido A sin modificar de origen natural impide su utilización generalizada como producto farmacéutico. Un inconveniente mayor con el lípido A derivado natural consiste en acceder suficientemente a material con pureza farmacéuticamente aceptable, la actividad y estabilidad reproducible. El lípido A natural es una mezcla de varios componentes de la pared celular incluyendo los del lípido A con un número variable de cadenas lipídicas. Dicha heterogeneidad en el producto natural del lípido A se atribuye a dos fuentes: (1) variabilidad biosintética en el montaje del resto de lípido A y (2) pérdida de ácidos grasos procedente del eje central del lípido A durante el tratamiento y la purificación. Por lo tanto, es difícil controlar el proceso de elaboración en términos de reproducibilidad de la composición de la mezcla, lo que tiene apoyo significativo en la actividad biológica y la toxicidad. Por ejemplo, una reducción en la actividad adyuvante conduce a reducción en la respuesta inmunitaria a un antígeno que está formulado con lípido A como adyuvante. La pérdida de un número significativo de cadenas lipídicas durante el tratamiento de lípido A natural podría producir la pérdida de adyuvante y de otras actividades biológicas. Por lo tanto, parece que las cadenas lipídicas de las moléculas de lípido A desempeñan una función significativa en la capacidad adyuvante tal como la interiorización de antígenos en macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (CPA) lo que conduce a potentes respuestas inmunitarias.

Aunque se reconoce que los análogos del lípido A tienen estructuras complejas, la síntesis química es quizás la mejor alternativa para superar las dificultades asociadas al acceso al lípido A de origen natural. La combinación natural de lípidos se refiere a la diversidad de lípidos que existe en la naturaleza. No hay diversidad de lípidos en los lípidos sintéticos de la presente invención ya que llevan un uniforme de contingente de lípidos, que son de similar longitud de carbonos. La presente invención se refiere al diseño y síntesis de algunos nuevos análogos de lípido A monofosforilados, que llevan cada uno una combinación de lípidos artificiales, tales como (I) y (II) (figura 3) o significativamente, una combinación artificial de lípidos (figura 4). Las siguientes propiedades distinguen las estructuras sintéticas de lípido A dadas a conocer en la presente invención de las obtenidas de fuentes naturales y/o dadas a conocer en la técnica anterior en este campo.

- 1) Monofosforilada: Estructura de lípido A sin modificar químicamente, procedente de la naturaleza transporta dos grupos fosfato en las posiciones 1 y 4', mientras que los análogos sintéticos del lípido A en la presente invención transportan un grupo fosfato en la posición 4'.
- 2) Una combinación de lípidos artificiales: Moléculas, tales como los compuestos **33** y **102** (figura 3) contienen por lo menos un lípido nuevo y artificial (I o II).
- 3) Una combinación artificial de lípidos: Esta se refiere a los análogos de lípido A que transportan lípidos de longitud de cadena uniforme, una combinación que no se encuentra en la naturaleza y su síntesis no es conocida en la técnica anterior. Los compuestos **54** y **86** (figura 4) están comprendidos en esta categoría. El compuesto **70** (figura 19) es similar, pero contiene además un grupo n-propilo en la posición 3-O y es un ejemplo de análogo de lípido A que incorpora un grupo alquilo artificial corto con un enlace éter artificial.

Todas las estructuras sintéticas del lípido A dadas a conocer en la presente invención es de esperar que sean simulaciones de las estructuras de lípido A procedentes de *E.coli* natural y/o *Salmonella* (figura 1).

I.Takahashi *et al.*, Infection and immunity, vol. 65, 1987, páginas 57-68, describe un requisito de una estructura bifosfato del disacárido D-glucosamina-beta (1-6) propiamente acilada para la manifestación eficaz de todas las biotoxicidades endotóxicas y asociadas del lípido A.

El documento EP 0330715A (Daiichi Seiyaku Co.) da a conocer compuestos de disacáridos que presentan excelente actividad antitumoral y baja toxicidad y son útiles como agentes antitumorales.

Alving C.R., Immunobiology, vol. 187, nº 3/05, abril 1993, páginas 430-446, describe lipopolisacáridos, lípido A y liposomas que contienen lípido A como adyuvantes inmunológicos.

Ulrich J.T. *et al*, Subunit and adjuvant approach, vol. 6, 1995, páginas 495-526, da a conocer monofosforil lípido A como adyuvante.

Polidori A. *et al.*, Chem. Phys. Lipids, vol.77, nº 2, 25 de agosto de 1995, páginas 225-251, describe vesículas y otros sistemas supramoleculares preparados a partir de glucolípidos sintéticos de dos colas derivados de tris(hidroximetil)aminometano galactosilado.

La patente US nº 5.481.021 da a conocer derivados de fenilamidinas útiles como inhibidores de agregación de plaquetas.

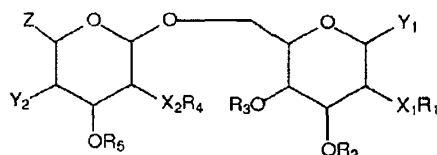
Zablocki J.A. *et al.*, *J. Med. Chem.*, vol. 36, nº 13, 25 de Junio 1993, páginas 1811-1819, describe potentes inhibidores *in vitro* e *in vivo* de agregado de plaquetas basándose en la secuencia Arg-Gly-Asp-Phe de fibrinógeno. Se expone una propuesta sobre la naturaleza de la interacción del enlace entre Arg-guanirina de las simulaciones de RGDX y del receptor GP IIb-IIIa de plaquetas.

5

Sumario de la invención

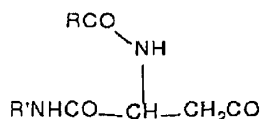
Según un primer aspecto de la invención, se proporciona:

10 un compuesto de la fórmula siguiente:



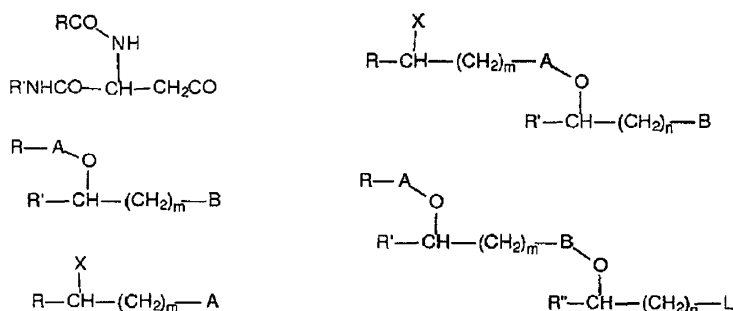
en la que por lo menos uno de entre R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ es la estructura siguiente:

15



en la que los R₁, R₂, R₃, R₄ y/o R₅ restantes, si existen, se seleccionan de entre el grupo constituido por hidrógeno, -R, -COR y las estructuras siguientes:

20



en las que cada R, R', R'' se selecciona independientemente para que sea un hidrógeno, o un hidrocarburo alifático C₁₋₂₀ sustituido o insustituido, ramificado o lineal, saturado o insaturado;

25

A, B y L se seleccionan independientemente de entre el grupo constituido por grupos -CH₂-, -C(=O)- y -C(=S)-;

cada X se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por -OH, -SH, -NH₂ y -halógeno;

30

m y n se seleccionan independientemente de entre el intervalo de números enteros entre 0 y 10 inclusive,

X₁ y X₂ son -O- o -NH-,

35

Y₁ e Y₂ se seleccionan independientemente de entre el grupo constituido por -OH, -OP(O)(OH)₂, -COOH, -OSO₃H, -CH(COOH)₂ y -OP(O)(OH)(OCH₂CH₂NH₂),

Z es H, -CH₂E o -CH₂MG, en la que E es -hidrógeno, -halógeno, -OH, -NH₂, -OSO₃H, -SO₃H, -P(O)(OH)₂ o -OP(O)(OH)₂; M es -O-, -S-, -OC(=O)-, -SC(=O)-OC(=S)- o -NHC(=O)-; G es un -hidrógeno, o un hidrocarburo alifático C₁₋₂₀ sustituido o insustituido, ramificado o lineal, saturado o insaturado,

40

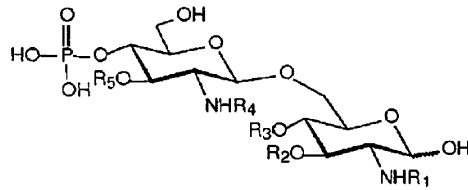
o una sal fisiológicamente aceptable de la misma.

Preferentemente cuando X₁ y X₂ son -NH-; Y₁ es -OH o -OP(O)(OH)₂; Y₂ es -OH o -OP(O)(OH)₂; y Z es -CH₂OH.

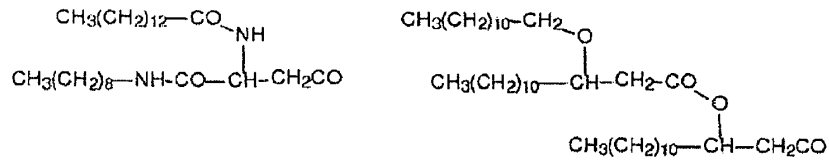
45

Preferentemente cuando los grupos de sustitución y la estereoquímica de las sustituciones en los anillos de azúcar

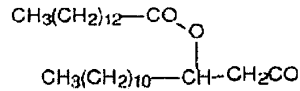
están definidas por la fórmula siguiente:



5 Preferentemente cuando por lo menos uno de entre R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ se seleccionan de entre los grupos siguientes



10 Preferentemente cuando R₁ y R₅ son un grupo con la estructura siguiente

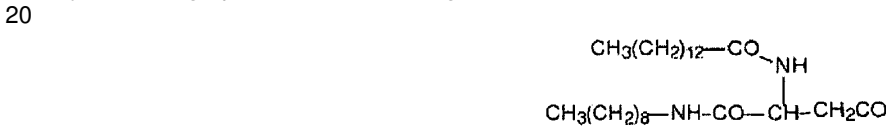


y R₂ es un átomo de hidrógeno o el grupo siguiente



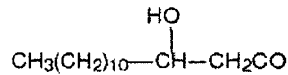
R₃ es un átomo de hidrógeno;

y R₄ es un grupo de la estructura siguiente



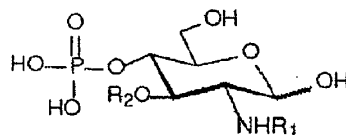
25 Preferentemente cuando R₂ es un átomo de hidrógeno, y la configuración absoluta de los carbonos quirales en el grupo R₁ y R₅ es (R), mientras que en el grupo R₄ es (S).

Preferentemente cuando R₂ es un grupo con la estructura siguiente

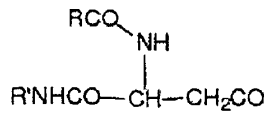


30 y la configuración absoluta de los carbonos quirales en el grupo R₁, R₂ y R₅ es (R), mientras que en el grupo R₄ es (S).

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de la fórmula siguiente:

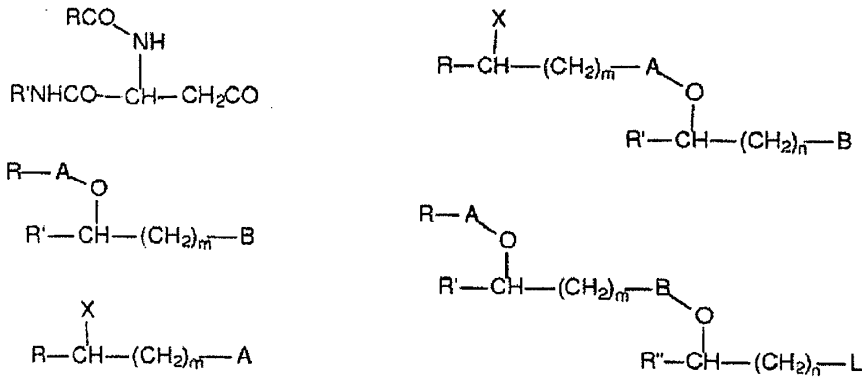


35 en la que por lo menos 1 de entre R₁ y R₂ es el grupo siguiente



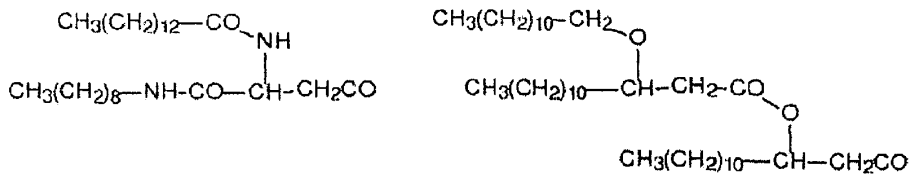
en la que cada R y R' es independientemente un hidrógeno, un hidrocarburo alifático C₁₋₂₀ sustituido o insustituido, ramificado o lineal, saturado o insaturado.

5 El R₁ o R₂ restante se selecciona de entre hidrógeno, el grupo -R, -COR o las estructuras siguientes

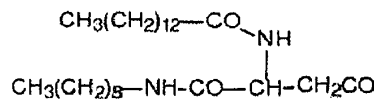


10 en las que cada R, R', R'' es independientemente un hidrógeno, un hidrocarburo alifático C₁₋₂₀ sustituido o insustituido, ramificado o lineal, saturado o insaturado; A, B y L son independientemente grupos CH₂, CO y CS; X es -OH, -SH, -NH₂ y halógeno, m y n son números enteros entre 0 y 10 inclusive.

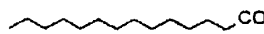
15 Preferentemente cuando por lo menos uno de entre R₁ y R₂ se seleccionan de entre las estructuras siguientes



20 Preferentemente cuando R₁ es un grupo con la estructura siguiente

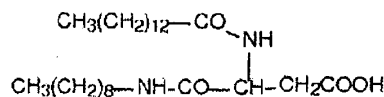


y R₂ es un grupo con la estructura siguiente

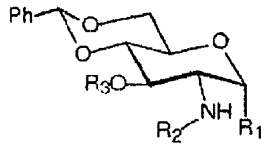


25 Preferentemente cuando la configuración absoluta del carbono quiral en el grupo R₁ es (S).

30 Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de la estructura siguiente

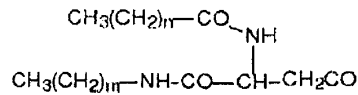


Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de la fórmula siguiente

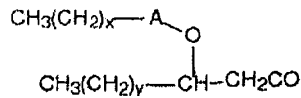


en la que R₁ es un grupo de benciloxi, aliloxi, hidroxilo o OC(NH)CCl₃;

5 R₂ se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, -COOCH₂CCl₃, o la estructura siguiente

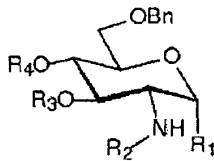


10 en la que m y n son números enteros independientemente seleccionados que tienen valores entre 0 y 20; y R₃ es CH₃(CH₂)_zCO o la estructura siguiente



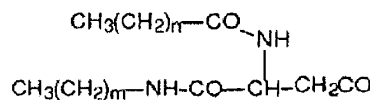
15 en la que A es -CH₂- o -C(=O)- y x, y y z son números enteros seleccionados independientemente que tienen valores entre 0 y 20.

Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula siguiente:



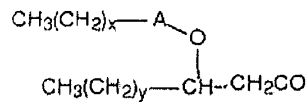
20 en la que R₁ es un grupo de benciloxi, aliloxi, hidroxilo o OC(NH)CCl₃;

25 R₂ se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, COOCH₂CCl₃ o



en la que m y n son números enteros independientes que tienen valores entre 0 y 20;

30 R₃ es CH₃(CH₂)_zCO o la estructura siguiente:

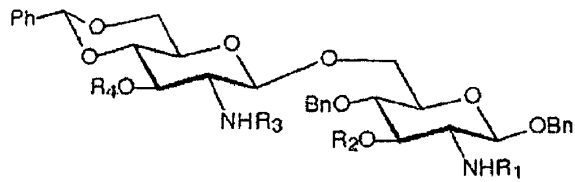


35 en la que A es -CH₂- o -C(=O)-,

x, y y z son independientemente números enteros seleccionados que tienen valores entre 0 y 20;

R₄ es hidrógeno o P(O)(OBn)₂.

40 Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula siguiente:

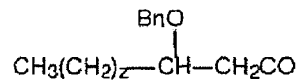


en la que R₁ es un grupo con la estructura siguiente



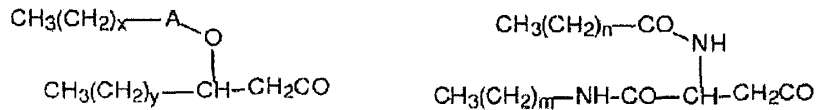
en la que A es -CH₂- o -C(=O)-; x e y son números enteros independientemente seleccionados que tienen valores entre 0 y 20;

10 R₂ es hidrógeno, alilo, bencilo o la estructura siguiente



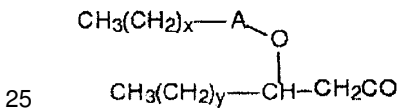
en la que z es un número entero entre 0 y 20;

15 R₃ es hidrógeno, COOCH₂CCl₃, o una de las estructuras siguientes



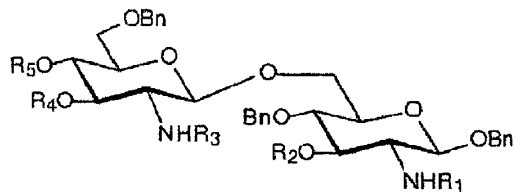
20 en la que A es -CH₂- o -C(=O)-; m, n, x e y son números enteros independientemente seleccionados que tienen valores entre 0 y 20;

R₄ es un grupo de la siguiente estructura



en la que A es -CH₂- o -C(=O)-; x e y son números enteros independientemente seleccionados que tienen valores entre 0 y 20.

30 Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula siguiente:



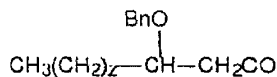
en la que R₁ es un grupo con la estructura siguiente



ES 2 370 262 T3

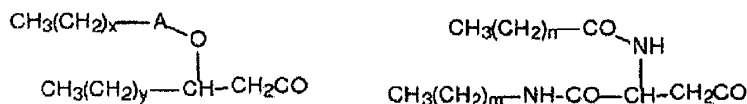
en la que A es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(=\text{O})-$; x e y son números enteros independientemente seleccionados que tienen valores entre 0 y 20;

5 R_2 es hidrógeno, alilo, bencilo o la estructura siguiente



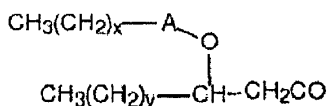
en la que z es un número entero entre 0 y 20;

10 R_3 es hidrógeno, $\text{COOCH}_2\text{CCl}_3$, o una de las estructuras siguientes



15 en la que A es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(=\text{O})-$; m, n, x e y son números enteros independientemente seleccionados que tienen valores entre 0 y 20;

R_4 es un grupo de la siguiente estructura



20 en la que A es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(=\text{O})-$; x e y son números enteros independientemente seleccionados que tienen valores entre 0 y 20;

25 R_5 es hidrógeno o $(\text{BnO})_2\text{P}(\text{O})$.

Según un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un liposoma no natural cuya membrana comprende: (a) un compuesto según cualquiera de los aspectos anteriores; y (b) por lo menos un epítipo.

30 Preferentemente en el que por lo menos un epítipo es un epítipo de linfocito B.

Preferentemente en el que por lo menos un epítipo es un epítipo de linfocito T.

Preferentemente en el que por lo menos un epítipo es un epítipo de péptido.

35 Preferentemente en el que por lo menos un epítipo es un epítipo de carbohidrato, glucopéptido o glucolípido.

Según un noveno aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un liposoma según el octavo aspecto, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz como vacuna de dicho epítipo.

40 Preferentemente en el que dicho epítipo es un epítipo asociado al tumor.

Preferentemente en el que por lo menos un epítipo es un epítipo de MUC1.

45 Preferentemente, en el que el epítipo es proporcionado por un péptido o lipopéptido que tiene la secuencia de aminoácidos siguiente:



50 Preferentemente el liposoma es para su utilización en la prevención o tratamiento de una enfermedad prevenible o tratable produciendo una respuesta inmunitaria a dicho epítipo.

Preferentemente en el que dicho análogo de lípido A ejerce un efecto adyuvante sobre la respuesta inmunitaria a dicho epítipo.

55 Preferentemente en el que dicha enfermedad es un cáncer.

Aunque existen varias publicaciones que detallan la estructura mínima requerida para las moléculas de lípido A para actividad adyuvante con baja toxicidad, no se ha realizado ningún estudio generalizado de las propiedades estructurales necesarias para mantener esta actividad.

5 Una molécula con estructura definida como adyuvante no está disponible en el mercado para su utilización con vacunas terapéuticas humanas aunque algunos adyuvantes prometedores están actualmente bajo investigación clínica. Un ejemplo de dichos adyuvantes prometedores es un producto purificado de lípido A natural a partir de cultivos bacterianos. El producto adyuvante lípido A natural contiene una mezcla de varios componentes de lípido A con un número variable de cadenas lipídicas. Los ésteres de la cadena lipídica, que están unidos al núcleo del carbohidrato, pueden escindir-se durante la hidrólisis controlada de la pared celular, conduciendo a la formación de muchos componentes. Uno de los principales problemas asociados a estas preparaciones es la inconstancia en la composición y funcionamiento como adyuvante, siendo este último muy crítico para la eficacia de las terapias basadas en vacunas. Otros factores añadidos tales como los altos costes de producción y la dificultad en determinar principios activos en la composición farmacéutica final hacen a dichos adyuvantes de origen A natural comercialmente inactivos.

Los análogos de lípido A sintéticos presentan varias ventajas sobre las preparaciones adyuvantes derivadas de las naturales. El compuesto sintético está definido químicamente con una única estructura y de este modo facilita su sedimento y control en la preparación hasta la formulación final. El producto sintético es rentable y es fácilmente adaptable para el incremento a escala comercial a la vez que mantiene la constancia tanto en calidad como en funcionamiento.

En la presente memoria se describen nuevos análogos de lípido A que se diseñan, sintetizan y por último se incorporan en las vacunas de liposomas que contienen el antígeno derivado de la mucina asociado al cáncer (MUC1), como lipopéptido, para evaluar su capacidad como adyuvante. Las características destacadas de la presente exposición se describen a continuación.

Nuevas estructuras lipídicas

30 Aunque en alguna estructura de lípido A natural dada el contingente de lípidos no son nunca de longitud o estructura uniforme, el lípido más frecuentemente encontrado en la naturaleza es el ácido (R)-3-hidroxi-tetradecanoico (ácido 3-hidroxi-mirístico) y sus derivados 3-O-acilados. La diversidad de lípidos contribuye hasta ahora a las más significativas variaciones entre las estructuras de lípido A natural. Aunque están todas unidas por enlaces de éster y de amida a los grupos hidroxilo y amino del azúcar respectivamente, las variaciones incluyen el número de lípidos unidos, la longitud de cada cadena lipídica y los grupos funcionales contenidos en las cadenas lipídicas. Se cree que estas variaciones contribuyen a varias funciones biológicas de la molécula completa de lípido A y más importante a sus propiedades adyuvantes. Químicamente hablando, los enlaces éster son lábiles ya que son vulnerables a la hidrólisis en condiciones fisiológicas. La pérdida gradual de cadenas lipídicas puede reducir lentamente la actividad del adyuvante en almacenamiento prolongado de las vacunas disminuyendo de este modo su periodo de conservación. La introducción de enlaces éter artificiales pero estables en lugar de ésteres, o combinaciones de ambos puede aumentar la estabilidad del adyuvante y puede producir el periodo de conservación más prolongado para las formulaciones de vacunas. Una ventaja mayor en la síntesis de un análogo de lípido A es que la molécula puede diseñarse para conseguir eficacia como adyuvante, seguridad y estabilidad utilizando la diversidad en las cadenas lipídicas y sus enlaces.

45 Incorporando estas propiedades, los inventores han diseñado nuevos ácidos lipídicos sintéticos de formulas generales (3) y (4) (figura 2) para construir análogos sintéticos de lípido A. Los compuestos **5** y **23** se prepararon en este descubrimiento como dos ejemplos específicos de estructuras generales (3) y (4). El compuesto **5** contiene un resto de ácido aspártico, que puede ser visto como un β -aminoácido. Su configuración absoluta corresponde al ácido (R)-3-hidroxi-tetradecanoico y de este modo el compuesto **5** se considera que es un símil del ácido (R)-3-aciloxi-tetradecanoico. El compuesto **23** es un ácido graso trilipídico que contiene un enlace éter, incorporado para aumentar la estabilidad de la molécula completa. Aunque los montajes trilipídicos a base de éster no han sido descubiertos hasta ahora entre los análogos de lípido A natural, su presencia puede no ser completamente excluida. La presente exposición se centra además en la síntesis del lípido A con un contingente de lípidos uniforme a fin de comparar las actividades adyuvantes de las que presentan diversidad de lípidos.

Análogos de lípido A con nuevos acoplamientos de ácido lipídico

Los lípidos de formulas generales (3) y (4) (figura 2) son de nuevo diseño y por lo tanto las correspondientes estructuras de lípido A que las incorporan son todas distintas. Se han diseñado dos tipos de análogos de tipo A, monosacárido (1) y disacárido (2) (figura 3), como parte de la invención.

El derivado monosacárido de estructura (1) en la que por lo menos uno de entre R_1 y R_2 se selecciona independientemente de entre las estructuras (I) y (II) (figura 3) presenta la estructura no reductora y de azúcar del lípido A natural. El compuesto 33 (figura 9) es un ejemplo de dichas estructuras.

Y el derivado de disacárido de estructura (2) en la que por lo menos uno de entre R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ se selecciona independientemente de entre las estructuras (I) y (II) (figura 3) es un análogo monofosforilado de estructura de lípido A natural. Los compuestos **58** (figura 16), **77** (figura 21), **102** (figura 29) y **104** (figura 30) son algunos ejemplos con dichas propiedades estructurales.

Análogos de lípido A con contingente de lípidos uniforme

La diversidad de lípidos de lípido A hacia la molécula demasiado compleja y poco práctica para la preparación a gran escala por síntesis química. Una de las principales características de los compuestos diseñados como parte de la presente invención es que los sustituyentes lipídicos en las posiciones 2-amino, 2'-amino y 3'-O del eje central del disacárido son idénticas y se componen de fragmentos de estructura dilípido unidos por éter o éster. Dichas propiedades se resumen en la figura 4. El compuesto tiene la fórmula general (2) en la que R₁, R₄ y R₅ son idénticamente los que tienen la estructura de dilípido (III). Los compuestos específicos se preparan en la presente invención como ejemplos representativos, tales como las estructuras **54** (figura 15), **70** (figura 19), **86** (figura 24) y **94** (figura 26).

Nuevo procedimiento para la preparación de análogos de lípido A

En la presente memoria se describen nuevos procedimientos para la síntesis de análogos (1) y (2) de lípido A. En la presente memoria se describen rutas sintéticas generales para preparar de varias maneras análogos de lípido A sustituidos del descubrimiento. Pueden obtenerse fácilmente diferentes análogos utilizando materiales de partida alternativos. Los detalles se ilustran en las figuras en dibujos y en los ejemplos.

El procedimiento para la síntesis del derivado de monosacárido **33** se ilustra en la figura 9 y el derivado de disacárido **48** en las figuras 10 a figura 13. Una característica importante de este nuevo procedimiento es la estrategia general de utilización de combinaciones de diferentes bloques de construcción de carbohidratos, de estrategias de grupos protectores y reactivos para llevar a cabo estructuras específicas. Por ejemplo, la protección con 4,6-bencilideno en los derivados de glucosamina ofrece la libertad de la apertura del anillo selectivo para liberar el 4-OH en el que puede introducirse el grupo fosfato. El grupo fosfato protegido por el éster bencílico, que se introduce mediante un procedimiento en dos etapas, ofrece también la ventaja de estar fácilmente desprotegido, junto con otros grupos bencilo en la molécula, en la etapa final de la síntesis por hidrogenación catalítica. Se describen más ejemplos en las figuras 14 a 21 para la síntesis de los compuestos 54, 68, 70 y 77.

Este procedimiento se ha modificado más para proporcionar un procedimiento más eficaz, que es particularmente útil para la preparación de compuestos con idénticos sustituyentes en ambos grupos amino del eje central de carbohidrato. Las figuras 22 a 24 ilustran la síntesis del compuesto **86** utilizando este procedimiento modificado.

En este procedimiento modificado el grupo fosfato se introduce en el derivado de monosacárido antes que se forme el enlace glucosídico, y el aceptor de glucosilación, que tiene ambos grupos 4-OH y 6-OH desprotegidos (por ejemplo el compuesto **79** en la figura 22), se prepara por una ruta simplificada. Las etapas implicadas en todo el procedimiento se reducen, especialmente en la etapa de disacárido en la que el material se vuelve más costoso y prácticamente más difícil de manejar. El procedimiento se diseña para producción a gran escala y se ha demostrado que es muy eficaz en la síntesis a gran escala de un análogo de lípido A. Los ejemplos adicionales de los compuestos **94**, **102** y **104**, preparados utilizando este procedimiento modificado, se describen en las figuras 25 a 30.

Los productos intermedios estratégicos dados a conocer en la presente memoria se utilizan en la síntesis de análogos de lípido A y no son conocidos en la bibliografía.

Formulaciones de liposomas

Los liposomas son partículas globulares formadas por el autoensamblado físico de lípidos polares, que definen la organización de la membrana en los liposomas. Los liposomas pueden estar formados por vesículas unilaminares o multilaminares de varios tamaños. Dichos liposomas, aunque constituidos por pequeñas moléculas no tienen propiedades inmunógenas propias, se comportan como partículas macromoleculares y presentan fuertes características inmunógenas.

Aprovechando las propiedades de autoensamblado de los lípidos, uno o más inmunógenos pueden acoplarse a los lípidos polares que a su vez formaran parte de la partícula de liposoma. Cada inmunógeno comprende uno o más determinantes antigénicos (epítomos). Estos epítomos pueden ser epítomos de linfocitos B (reconocidos por los anticuerpos) o epítomos de linfocitos T (reconocidos por los linfocitos T). El liposoma puede actuar para ayudar a la respuesta inmunitaria producida por los inmunógenos asociados. Es probable que sea más eficaz que un adyuvante que se mezcla simplemente con un inmunógeno, ya que tendrá una concentración eficaz local más alta.

Además, puede acoplarse un hapteno en lugar del inmunógeno mencionado anteriormente. Como un inmunógeno, un hapteno comprende un determinante antigénico, pero por definición es demasiado pequeño para producir una respuesta inmunitaria en sí mismo (por lo general, los haptenos son menores de 5.000 daltons). En este caso, el resto lipídico puede actuar, no sólo como adyuvante, sino también como vehículo inmunógeno, actuando el conjugado del hapteno y el lípido como inmunógeno sintético (es decir, una sustancia contra la cual pueden producirse respuestas inmunitarias humorales y/o celulares).

Incluso si el lípido no actúa como vehículo inmunógeno no actúa como vehículo inmunógeno, el hapteno sostenido por liposomas puede actuar todavía como antígeno sintético (es decir, una sustancia que es reconocida por un componente del sistema inmunitario humoral o celular, tal como un anticuerpo o linfocito T). El término "antígeno" incluye tanto haptenos como inmunógenos.

Por lo tanto, la invención contempla un liposoma cuya membrana comprende un análogo de lípido A tal como se da a conocer en la presente memoria, y por lo menos un epítipo de linfocito B o linfocito T.

Se han diseñado varios antígenos sintéticos en forma de lipopéptidos, glucolípidos y glucolipopéptidos que forman la membrana del liposoma. Asimismo, las moléculas sintéticas de lípido A de características estructurales bien definidas pueden anclarse en la membrana del liposoma.

A diferencia de las preparaciones bacterianas adyuvantes, un análogo sintético de lípido A contribuye a lípidos estructuralmente bien definidos a la membrana del liposoma. Dichas estructuras definidas no solamente reducen la sobrecarga de reafirmar los componentes "activos" de la membrana después de la formulación, sino que también contribuyen a la definición de membrana liposómica. Dichos liposomas pueden diseñarse como "formulaciones de vacunas totalmente sintéticas" que contienen análogo sintético de lípido A como adyuvante y un lipopéptido sintético como antígeno.

Epítipo

Los epítipos de la presente invención pueden ser epítipos de linfocitos B o de linfocitos T, y pueden ser de cualquier naturaleza química, incluyendo sin limitación péptidos, carbohidratos, lípidos, glucopéptidos y glucolípidos. El epítipo puede ser idéntico a un epítipo natural, o una forma modificada de un epítipo natural.

Los epítipos peptídicos de linfocitos B son por lo general de por lo menos cinco aminoácidos, más a menudo por lo menos de seis aminoácidos, aún con más frecuencia de por lo menos siete u ocho aminoácidos de longitud, y pueden ser continuos ("lineales") o discontinuos ("con configuración") (estando estos últimos formados por el plegamiento de una proteína para poner partes no contiguas de la secuencia de aminoácidos primaria en proximidad física). Los epítipos peptídicos de linfocitos T son lineales y normalmente 8 a 15, más frecuentemente 9 a 11 aminoácidos de longitud.

Los epítipos de interés incluyen los específicos para un patógeno o para un tumor o sino asociados a los mismos. Un epítipo puede decirse que está asociado a una enfermedad infecciosa específica si es presentado por un antígeno intracelular, superficial o segregado del organismo que causa la enfermedad, o en el caso de un virus, si está asociado a partículas víricas o es específico de una célula infectado por el virus. Puede decirse que está asociado a un tumor específico si es presentado por un antígeno intracelular, superficial o segregado de dicho tumor. No necesita ser presentado por todas las estirpes celulares de tipo tumoral en cuestión, o por todas las células de un tumor específico, o a lo largo de toda la vida del tumor. No necesita ser específico para el tumor en cuestión. Un epítipo puede decirse que está "asociado al tumor" en general si está también asociado con cualquier tumor (cáncer, neoplasma).

La expresión "epítipo asociado a la enfermedad" comprende también cualquier epítipo no natural que es suficientemente similar a un epítipo natural asociado a la enfermedad en cuestión de modo que los linfocitos fitotóxicos que reconocen al epítipo de la enfermedad natural también reconocen al epítipo similar no natural. Similares comentarios aplican al "epítipo asociado al tumor".

Puede considerarse que un epítipo es específico para una fuente concreta (tal como un organismo que produce la enfermedad o un tumor) si está asociado más frecuentemente con esta fuente que con otras fuentes. No se necesita especificidad absoluta, con tal que se obtenga todavía un efecto profiláctico, terapéutico o de diagnóstico.

En el caso de un epítipo "específico para el tumor", está más frecuentemente asociado a este tumor que a otros tumores, o a células normales. Preferentemente, debería existir una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,05$) entre su frecuencia de aparición asociada al tumor en cuestión, y su frecuencia de aparición asociada a (a) células normales del tipo del que procede el tumor, y (b) por lo menos otro tipo de tumor. Un epítipo puede decirse que es "específico para el tumor" en general si está asociado más frecuentemente a tumores (de alguno o todos los tipos) que a células normales. No necesita estar asociado a todos los tumores.

La expresión "epítopo específico para el tumor" también comprende cualquier epítopo no natural que sea suficientemente similar a un epítopo natural específico para el tumor en cuestión (o apropiado, específico a tumores en general) de modo que los linfocitos citotóxicos estimulados por el epítopo similar serán esencialmente específicos como LTC estimulados por el epítopo natural.

En general, la especificidad normal frente al tumor es más importante que la especificidad del tumor frente al tumor (dependiendo de la vía de administración y del tejido normal específico afectado), la especificidad mayor conduce generalmente a menores efectos desfavorables. La especificidad del tumor frente al tumor es más importante en el diagnóstico en contra de las utilidades terapéuticas.

La referencia a un epítopo de LTC como que está "restringida" por un alelo específico de MHC, tal como HLA-A1 indica que dicho epítopo está unido y presentado por la forma alélica en cuestión. Esto no significa que dicho epítopo no pueda también estar unido y ser presentado por una forma alélica diferente de MHC, tal como HLA-A2, HLA-A3, HLA-B7 o HLA-B44.

El término "específico" no pretende implicar la especificidad absoluta, únicamente una diferencia clínicamente útil en la probabilidad de que suceda asociada a un patógeno o tumor en lugar de en un paciente normal coincidente.

Los patógenos pueden ser submicrobianos (por ejemplo, virus), microbianos (por ejemplo, hongos, protozoos) o multicelulares (por ejemplo, gusanos, artrópodos, etc.). Los tumores pueden ser de origen mesenquimático o epitelial. Los cánceres incluyen cánceres de colon, recto, cuello del útero, mama, pulmón, estómago, útero, piel, boca, lengua, labios, laringe, riñón, vejiga, próstata, cerebro y células sanguíneas. Los epítomos naturales pueden ser identificados mediante un proceso de dividir y ensayar. Se empieza con una proteína conocida por ser antigénica o inmunógena. Se prueba a continuación la actividad inmunológica de la proteína. Estos fragmentos pueden obtenerse por tratamiento de la proteína con un agente proteolítico, o, si la secuencia peptídica es conocida, se pueden preparar sintéticamente péptidos más pequeños correspondientes a las subsecuencias de la proteína. Los fragmentos probados pueden comprender la secuencia completa de la proteína o solo una parte de la misma, y pueden estar contiguos, solapantes o separados. Si alguno de los fragmentos son inmunológicamente activos, los fragmentos activos pueden someterse a un análisis de división y prueba, y el procedimiento puede continuarse hasta que se identifican las secuencias de longitud mínima inmunológicamente activas. Este método puede utilizarse para identificar epítomos de linfocitos B o de linfocitos T, aunque los ensayos desde luego serán diferentes. Geysen da a conocer la identificación sistemática de todos los posibles fragmentos de oligopéptidos (preferentemente de 6 a 10 a.a.) adyacentes o solapantes de una proteína específica para la actividad inmunológica a fin de identificar epítomos lineales. Véase el documento WO 84/03564.

Si una secuencia de aminoácidos está disponible es posible predecir la posición de los epítomos de péptidos de linfocitos B o de linfocitos T. Los epítomos de linfocitos B tienden a estar en zonas de alta hidrofilia media local. Véase Hopp y Word, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA.)* 78: 3824 (1981); Jameson y Wolf, *CABIOS*, 4: 181 (1988). Los epítomos de linfocitos T pueden predecirse basándose en secuencias de consenso conocidas para los péptidos unidos a moléculas MHC de clase I de células de un haplotipo específico. Véase por ejemplo, Slingluff, documento WO 98/33810, especialmente las págs. 15-16; Parker, *et al.*, "Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side chains", *J. Immunol.* 152: 163 (1994).

Los epítomos de linfocitos T naturales pueden recuperarse disociándoles de sus complejos con moléculas MHC de clase I y a continuación secuenciándoles, por ejemplo, por técnicas espectroscópicas de masas.

Generalmente hablando, además de los epítomos que son idénticos para la enfermedad natural, o epítomos específicos para el tumor, la presente invención comprende epítomos que son diferentes pero sustancialmente idénticos de dichos epítomos, y por lo tanto la enfermedad, o tumor, específica en sus justos términos. Incluye además epítomos que no son sustancialmente idénticos a un epítopo natural, pero que son a pesar de todo de reacción cruzada con este último como resultado de una similitud en la configuración tridimensional.

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

Si existe un epítopo de LTC, pueden incorporarse más sustituciones no conservadoras que son sugeridas por un motivo de unión conocido de la molécula MHC pertinente. Kast, *et al.*, *J. Immunol.*, 152:3904-12 (1994) expone motivos de unión del péptido específico HLA-A para las moléculas A1, A2.1, A3, A11 y A24 de HLA. Engelhard, *et al.*, en Sette, ed., *Naturally Processed Peptides*, 57:39-62 (1993) exploraron las características que determinan la unión a HLA-A2.1 y HLA-B7. Véase también Hobohm *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 23:1271-6 (1993); Kawakami, *et al.*, *J. Immunol.*, 154:3961-8 (1995) basándose en estas y otras fuentes, los AA tolerados preferidos para varias moléculas HLA incluyen (de manera no limitativa) las siguientes:

Tabla A

Molécula	Posición	AA preferido	AA tolerado
A1	2	T, S, M	
	3	D, E	A, S
	9	Y	
A2.1	2	L, M	I, V, A, T
	9	L, V, I	A, M, T
A3	2	L, M, I, V, S A, T, F	C, G, D
	9	K, R, Y, H, F	A
All	2	M, L, I, V, S A, T, G, N	C, D, F
	9	K	R, H, Y
A24	2	Y, F, W	M
	9	F, L, I, W	
B7	1	A	M, S, R, L
	2	P	V
	3	R	A, K, S, M
	9	L	I, A, V
B8	3	L	desconocido
	5	K	desconocido
	9	L	desconocido
B27	2	R	desconocido
	9	R, K, H	desconocido
B35	2	P	desconocido
	9	Y	desconocido
B53	2	P	desconocido

5 Si una posición no está incluida, los estudios pusieron de manifiesto una mayor variabilidad de los AA que para las posiciones incluidas. Para las posiciones incluidas, los AA no incluidos pueden ser tolerados, especialmente si son sustituciones conservadoras o semiconservadoras para los AA “preferidos” o “tolerados”.

10 Las sustituciones conservadoras se definen en la presente memoria como intercambios con uno de los cinco grupos siguientes:

I. Restos alifáticos pequeños, apolares o ligeramente polares:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly

15 II. Restos polares, con carga negativa: y sus amidas

Asp, Asn, Glu, Gln

20 III. Restos polares con carga positiva:

His, Arg, Lys

IV. Restos alifáticos, apolares grandes:

25 Met, Leu, Ile, Val, Cys

V. Restos aromáticos grandes:

Phe, Tyr, Trp

30 Dentro de los grupos anteriores, las sustituciones siguientes se consideran “muy conservadoras”:

35 Asp/Glu
His/Arg/Lys
Phe/Tyr/Trp
Met/Leu/Ile/Val

40 Las sustituciones semiconservadoras están definidas por ser intercambios entre dos de los grupos (I)-(V) anteriores que están limitadas al supergrupo (A), que comprende (I), (II) y (III) anteriores, o al subgrupo (B) que comprende (IV) y (V) anteriores. Además, Ala se considera una sustitución semiconservadora para todos los aminoácidos que no son del

grupo I.

5 Se valorará que las sustituciones muy conservadoras sean menos probables que afecten a la actividad de otras sustituciones conservadoras, las sustituciones conservadoras es menos probable que afecten a la actividad que meramente las sustituciones semiconservadoras, y las sustituciones semiconservadoras menos que otras sustituciones no conservadoras. Además, las sustituciones individuales es menos probable que afecten a la actividad que las mutaciones múltiples.

10 Aunque una sustitución mutante, ya sea individual o múltiple, de los péptidos de interés puede no tener completamente la potencia del péptido original, dicho mutante bien puede ser útil.

15 Las sustituciones no se limitan a los aminoácidos codificados genéticamente o incluso a los naturales. Cuando el epítipo se prepara por síntesis peptídica, el aminoácido deseado puede utilizarse directamente. Alternativamente, un aminoácido codificado genéticamente puede modificarse haciéndole reaccionar con un agente modificador orgánico que es capaz de hacer reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los restos terminales.

20 Un aminoácido no genéticamente codificado se considera una sustitución conservadora para un aminoácido genéticamente codificado si es más similar en tamaño (volumen) e hidofilicidad al aminoácido original, y a otros aminoácidos en el mismo grupo de intercambio, que para los aminoácidos genéticamente codificados pertenecientes a otros grupos de intercambio.

25 Los epítipos de péptidos sustancialmente idénticos pueden identificarse por varias técnicas, algunas de las cuales no depende del conocimiento preexistente del motivo de unión. Por lo tanto, es sabido en la técnica que se pueden sintetizar todos los mutantes posibles de una sola sustitución de un epítipo de péptido conocido. Para un no péptido, existen $(20 \times 9 - 1 = 179)$ de dichos mutantes. Geysen, *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci. (USA.)*, 81:3998-4002(1984). Aunque los efectos de diferentes sustituciones no son siempre aditivos, es razonable esperar que dos sustituciones individuales favorables o neutras en diferentes posiciones del residuo en el epítipo pueden estar combinadas de manera segura en la mayoría de los casos.

30 Tanto los epítipos peptídicos naturales como los no naturales pueden ser identificados, si está disponible un anticuerpo adecuado, u otro receptor, identificando un banco combinatorio de péptidos para los péptidos unidos por la diana. Los epítipos peptídicos humorales pueden identificarse cribando un banco de fagos de péptido combinatorio para la unión específica a un anticuerpo monoclonal diana conocido por reconocer el antígeno de interés. Preferentemente, el banco se criba previamente para eliminar los péptidos que unen otro anticuerpo aparte del punto de unión del epítipo del anticuerpo; esto puede hacerse eliminando el fago que se une a un segundo, anticuerpo de referencia del mismo isotipo.

40 Asimismo, para identificar los epítipos del péptido LTC, se puede sintetizar una familia de mutantes relacionados de una sola o múltiple sustitución, presentan la mezcla a la estirpe celular T2 linfoblastoide positiva HLA-A2.1 (o a otra estirpe celular capaz de presentar epítipos de LTC específicos) y exponen los linfocitos T2 a los LTC de la especificidad deseada. Si los linfocitos T2 se lisan, los epítipos eficaces pueden ser idénticos por recuperación directa de los linfocitos T2 o por un procedimiento progresivo de experimentación de subconjuntos de las mezclas de péptidos eficaces. Los procedimientos para la preparación de péptidos degenerados se describen en Rutter, USP 5.010.175, Haughten, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci (USA.)*, 82:5131-35 (1985), Geysen *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA.)*, 81:3998-4002 (1984); documento WO 86/06487; documento WO 86/00991.

50 Puede utilizarse la mutagenia múltiple para identificar unas pocas posiciones del residuo intensamente o un número mayor de posiciones de forma más difusa. Un método consiste en explorar por lo menos un miembro representativo de cada tipo de a.a. en cada posición, por ejemplo, uno representativo de cada uno de los grupos I-V de intercambio tal como se define después en la presente memoria. Preferentemente, se identifican Gly y Pro además de otro resto del grupo I. Preferentemente, por lo menos un resto identificado es un resto de unión a H. Si un mutante positivo presenta un representante específico, como aminoácidos puede explorarse en un banco posteriormente. Si, por ejemplo, una sustitución de Phe mejora la unión, Tyr y Trp puede examinarse en la próxima ronda.

55 Cualquier experto en la materia, en la determinación de qué restos varían, puede asimismo comparar las secuencias de los péptidos asociados a MHC procesados naturalmente, y pueden obtener estructuras tridimensionales del MHC:péptido:complejos TCR, a fin de identificar restos implicados en la unión de MHC o TCR. Dichos restos pueden dejarse solos o juiciosamente mutados en un intento de mejorar la unión de MHC o de TCR.

60 Una exposición extensa de haptenos de carbohidratos aparece en Wong, patente US nº 6.013.779.

Capacidad adyuvante de los análogos de lípido A

Se entiende generalmente que un antígeno sintético de bajo peso molecular es inmunógeno débil, lo que constituye el

mayor obstáculo para el éxito de una vacuna completamente sintética. Una manera de mejorar la inmunogenicidad de dicho antígeno sintético consiste en administrarlo en el medio de un adyuvante. La diana primaria de estos nuevos análogos sintéticos de lípido A en la presente invención son sus propiedades adyuvantes. Un adyuvante ideal se cree que estimula inespecíficamente el sistema inmunitario del hospedador, que en el encuentro posterior de cualquier antígeno extraño puede producir respuesta inmunitaria fuerte y específica a este antígeno extraño. Dicha respuesta inmunitaria fuerte y específica, que se caracteriza también por su memoria, puede producirse solamente cuando se activan los linfocitos T del sistema inmunitario del hospedador. En la presente invención se seleccionan la blastogénesis de linfocitos T y la producción de IFN- γ como dos parámetros importantes para medir la respuesta inmunitaria.

Experimentalmente la blastogénesis de linfocitos T mide la síntesis de ADN que se relaciona directamente con la proliferación de linfocitos T, lo que a su vez es el resultado directo de la activación de linfocitos T. Por otra parte, IFN- γ es la principal citocina segregada por los linfocitos T cuando se activan. Por lo tanto, tanto la blastogénesis de linfocitos T como la producción de IFN- γ indican la activación de linfocitos T, lo que sugiere la capacidad de un adyuvante para ayudar al sistema inmunitario del hospedador a provocar una respuesta inmunitaria fuerte y específica a cualquier antígeno a base de proteínas. Utilizando un antígeno lipopeptídico sintético, H₂N-STAPPAHGVTAPDTRPAPGSTAPPK(Pal)G-OH (figura 34, los códigos de aminoácidos de una sola letra están definidos en la tabla 8), una secuencia de 25 aminoácidos modificada que procede de la mucina MUC1 asociada al tumor, los autores fueron capaces de evaluar las propiedades adyuvantes de los análogos de lípido A sintéticos dados a conocer en la presente memoria. Basándose en los datos de blastogénesis de linfocitos T y en el nivel de IFN- γ (figura 31-33) obtenidos por estudios preliminares *in vivo* / *in vitro*, está ampliamente demostrado que las estructuras sintéticas **48, 54, 70, 86, 102 y 104** de lípido A son tan eficaces, como adyuvantes, como las preparaciones de lípido A de origen bacteriano.

El compuesto se considera un adyuvante si aumenta significativamente ($p=0,05$) el nivel de blastogénesis de linfocitos T o de la producción de interferón gamma en respuesta por lo menos a una combinación liposoma/inmunógeno relativa al nivel producido por el inmunógeno solo. Preferentemente, aumentan ambos. Preferentemente, el aumento es por lo menos del 10%, más preferentemente de por lo menos 50%, aún más preferentemente, por lo menos 100%.

La evaluación de la toxicidad preliminar *in vivo* del análogo **86** del lípido A sintético ha demostrado que su toxicidad es mucho más baja que la del producto de lípido A natural obtenido a partir de la bacteria *Salmonella* (tabla 4, ejemplo 99). Por lo tanto, existen muchas ventajas asociadas a estructuras de lípido A totalmente sintéticas y nuevas dadas a conocer en la presente memoria, desde el punto de vista de eficacia, seguridad, estabilidad y aceptación de dichas formulaciones de vacuna con directrices reguladoras.

Preferentemente, la toxicidad de los compuestos lipídicos de la presente invención no es más del 50% de la de dicho producto de lípido A natural; más preferentemente es menor del 10% de la de esta última.

Los estudios *in vivo* de los compuestos sintéticos dados a conocer en la presente memoria se han limitado a la evaluación de sus eficacias como adyuvantes. Pero pueden tener aplicaciones más amplias en otras áreas tales como agentes antitumorales, antagonistas de LPS/lípido A, inhibidores de la biosíntesis de lípido A y por lo tanto útiles como nuevos antibióticos. Los resultados de varias actividades biológicas se darán a conocer a su debido tiempo.

Procedimientos y preparaciones farmacéuticas

En la presente memoria está descrita la exposición en las págs. 32 a 46 del documento WO 98/33810.

El sujeto animal preferido de la presente exposición es un mamífero primate. El término "mamífero" hace referencia un individuo que pertenece a la clase Mammalia, que, desde luego, incluye la especie humana. La invención es particularmente útil en el tratamiento de pacientes humanos, aunque está concebida también para utilizaciones en veterinaria. La expresión "primate no humano" está concebida para cualquier miembro del suborden Anthropeoidea excepto para la familia Hominidae. Dichos primates no humanos incluyen la superfamilia Ceboidea, familia Cebidae (monos del nuevo mundo incluyendo los capuchinos, aulladores, monos araña y monos ardilla) y la familia Callithricidae (incluyendo los monos tití); la superfamilia Cercopithecoidea, familia Cercopithecidae (incluyendo los macacos, mandriles, babuinos, monos proboscidos, monos mona y los monos hanuman sagrados de la India); y la superfamilia Hominoidea, familia Pongidae (incluyendo los jibones, orangutanes, gorilas y chimpancés). El mono rhesus es un miembro de los macacos.

El término "protección", tal como se utiliza la presente memoria, se pretende que incluya "prevención", "supresión" y "tratamiento". "Prevención" implica la administración de la proteína antes de la provocación de la enfermedad. "Supresión" implica la administración de la composición antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de la aparición de la enfermedad.

Debe sobreentenderse que en medicina humana y veterinaria, no siempre es posible distinguir entre "prevenir" y "suprimir" ya que el episodio o episodios productores últimos pueden ser desconocidos, estar latentes, o el paciente no

está decidido hasta mucho después de la aparición del episodio o episodios. Por lo tanto, es frecuente la utilización del término “profilaxis” como distinto de “tratamiento” para abarcar tanto “prevenir” como “suprimir” como se define en la presente memoria. El término “protección”, tal como se utiliza en la presente memoria, significa que incluye “profilaxis”.
 5 Debe entenderse también que para ser útil, la protección proporcionada necesita ser absoluta, con tal que sea suficiente para llevar valor clínico. Un agente que proporciona protección en un grado inferior al de los agentes competitivos puede todavía ser de valor si los demás agentes son ineficaces para un individuo concreto, si puede utilizarse combinado con otros agentes para aumentar el nivel de protección, o si es más seguro que los agentes competitivos.

10 La composición puede administrarse por vía parenteral u oral, y, si es por vía parenteral, en general o por vía tópica. Las vías parenteral incluyen las vías subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica o bucal. Una o más de dichas vías puede utilizarse. La administración parenteral puede ser, por ejemplo, por inyección a emboladas o por perfusión gradual a lo largo del tiempo. Alternativamente, o simultáneamente, la administración puede ser por vía oral. La inmunización se lleva a cabo preferentemente inicialmente por inyección intramuscular seguido de inyección intradérmica, aunque puede utilizarse cualquier combinación de inyecciones
 15 intradérmica e intramuscular.

Debe apreciarse que la dosis adecuada de un inmunógeno de la presente exposición dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, del tipo de tratamiento simultáneo, si existe, de la frecuencia de tratamiento, y de la naturaleza del efecto deseado. Sin embargo, la dosis más preferida puede ajustarse para cada paciente, como es entendido puede ser
 20 determina por un experto en la materia, sin excesiva experimentación. Esto por lo general implicará el ajuste de una dosis patrón, por ejemplo, reducción de la dosis si el paciente tiene un peso corporal bajo.

Antes de su utilización en seres humanos, se evaluará la eficacia de un fármaco en animales de laboratorio. En estudios clínicos humanos, se debería comenzar con una dosis esperada que sea segura en personas, basándose en los datos preclínicos del fármaco en cuestión, y en las dosis habituales para fármacos análogos (si existen). Si esta dosis es eficaz, la dosis puede disminuirse, para terminar la dosis eficaz mínima si se desea. Si esta dosis es ineficaz, se aumentará con cautela, con los pacientes controlados para señales de efectos secundarios. Véase, por ejemplo, Berkow, *et al.*, eds., The Merck Manual, 15^a edición, Merck y Co., Rahway, N.J., 1987; Goodman, *et al.*, eds., The Pharmacological Basis of Therapeutics de Goodman y Gilman, 8^a edición, Pergamon Press, inc., Elmsford, N.Y., (1990);
 25 Avery's Drug Treatment: Principles y Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3^a edición, ADIS Press, LTD., Williams y Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, Pharmacology, Little, Brown y Co., Boston, (1985).

La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse en varias dosis (que pueden ser iguales o diferentes) o en una sola dosis, según un programa de inmunización, que puede ser predeterminado para este fin. El programa se selecciona para que sea inmunológicamente eficaz, es decir, para que sea suficiente para provocar una respuesta
 35 inmunitaria eficaz a un antígeno y de este modo, posiblemente junto con otros agentes, para proporcionar protección. Las dosis adecuadas para realizar esto se definen como “dosis terapéuticamente eficaces”. (Obsérvese que un programa puede ser inmunológicamente eficaz aun cuando una dosis individual, si se administra por si misma, no fuese eficaz, y el significado de “dosis terapéuticamente eficaz” se interpreta mejor en el contexto del programa de inmunización). Las cantidades eficaces para esta utilización dependerán, por ejemplo, de la composición del péptido, la manera de administración, la etapa y gravedad de la enfermedad que se está tratando, el peso y el estado general de salud del paciente y el criterio del médico que receta.

Típicamente, la dosis diaria de un principio activo de un producto farmacéutico, para un adulto humano de 70 Kg., está comprendido en el intervalo entre 10 nanogramos y 10 gramos. Para inmunógenos, una dosis diaria más típica para dicho paciente está comprendida en el intervalo de 10 nanogramos a 10 miligramos, más probablemente 1 microgramo a 10 miligramos. Sin embargo, el descubrimiento no se limita a estos intervalos de dosis.

Debe tenerse presente que las composiciones de la presente invención pueden utilizarse generalmente en varias enfermedades, es decir, situaciones que ponen en riesgo la vida o que potencialmente ponen en riesgo la vida. En dichos casos, a la vista de la minimización de las sustancias extrañas y de la naturaleza no tóxica relativa, es posible y puede sentirse deseable por el médico del tratamiento administrar excesos sustanciales de estas composiciones peptídicas.

Las dosis pueden administrarse a intervalos que sean eficaces. Si el intervalo es demasiado corto, puede ocurrir inmunoparálisis u otros efectos secundarios. Si el intervalo es demasiado grande, puede sufrir la inmunidad. El intervalo óptimo puede ser mayor si las dosis individuales son mayores. Los intervalos típicos son de 1 semana, 2 semanas, 4 semanas (o un mes), 6 semanas, 8 semanas (o dos meses) y un año. La falta de idoneidad de administrar dosis adicionales, y de aumentar o disminuir el intervalo, puede reevaluarse en una base continuada, a la vista de la
 60 inmunocompetencia del paciente (por ejemplo, el nivel de anticuerpos para antígenos relevantes).

Están disponibles varios procedimientos para preparar liposomas, tal como se describe en, por ejemplo, Szoka, *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), patentes US n° 4.235.871, n° 4.501.728, n° 4.837.028, y n° 5.019.369.

La forma farmacéutica apropiada dependerá de la enfermedad, del inmunógeno y del modo de administración; las posibilidades incluyen comprimidos, cápsulas, pastillas, pastas dentales, supositorios, inhaladores, soluciones, pomadas y depósitos parenterales. Véase, por ejemplo, Berker, anteriormente, Goodman, anteriormente, Avery, anteriormente y Ebadi, anteriormente.

5

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1 Ejemplos de estructuras naturales de lípido A, cepas A de *E. coli* y B de *Salmonella*
- 10 Figura 2 Nuevos ácidos lipídicos de fórmulas generales (3) y (4) y dos ejemplos de los mismos
- Figura 3 Análogos de lípido A monosacáridos y disacáridos que contienen nuevas estructuras lipídicas y dos ejemplos de los mismos
- 15 Figura 4 Análogos de lípido A de disacárido que contienen cadenas dilipídicas uniformes y dos ejemplos de los mismos
- Figura 5 Síntesis de lípido **5**
- 20 Figura 6 Síntesis de lípidos
- Figura 7 Síntesis de tri-lípido **23**
- Figura 8 Síntesis de derivados de glucosamina
- 25 Figura 9 Síntesis del compuesto **33**
- Figura 10 Síntesis de aceptores de glucosilación
- 30 Figura 11 Síntesis del donante de glucosilación **43**
- Figura 12 Síntesis de disacáridos **45**
- Figura 13 Síntesis del compuesto **48**
- 35 Figura 14 Síntesis de disacárido **51**
- Figura 15 Síntesis del compuesto **54**
- 40 Figura 16 Síntesis del compuesto **58**
- Figura 17 Síntesis del aceptor de glucosilación **64**
- Figura 18 Síntesis de disacárido **67**
- 45 Figura 19 Síntesis del compuesto **70**
- Figura 20 Síntesis de la amina **73**
- 50 Figura 21 Síntesis del compuesto **77**
- Figura 22 Síntesis del aceptor de glucosilación **79**
- Figura 23 Síntesis del donante de glucosilación **83**
- 55 Figura 24 Síntesis del compuesto **86**
- Figura 25 Síntesis del donante de glucosilación **91**
- 60 Figura 26 Síntesis del compuesto **94**
- Figura 27 Síntesis del aceptor de glucosilación **98**
- Figura 28 Síntesis de la amina **100**

Figura 29 Síntesis del compuesto **102**

Figura 30 Síntesis del compuesto **104**

- 5
- Figura 31 Proliferación de linfocitos T (CPM, recuentos por minuto) y producción de interferón- γ (YFN- γ , pg/ml) en ratones inmunizados con vacuna liposómica a base de MUC1 ayudada con análogos de lípido A **33, 48, 58** o **lípido A natural**.
- 10
- Figura 32 Proliferación de linfocitos T (CPM, recuentos por minuto) y producción de interferón- γ (YFN- γ , pg/ml) en ratones inmunizados con vacuna liposómica a base de MUC1 ayudada con análogos de lípido A **48, 54, 70, 77, 86** o **lípido A natural**.
- 15
- Figura 33 Proliferación de linfocitos T (CPM, recuentos por minuto) y producción de interferón- γ (YFN- γ , pg/ml) en ratones inmunizados con vacuna liposómica a base de MUC1 ayudada con análogos de lípido A **86, 94, 102, 104** o **lípido A natural**.
- Figura 34 Estructura del lipopéptido BP1-148, secuencia de 25 aminoácidos modificada procedente de la mucina MUC1 asociada al tumor (códigos de aminoácidos una sola letra)
- 20
- Figura 35 Ejemplos de péptidos y glucopéptidos derivados de antígenos víricos y tumorales que pueden incorporarse en formulaciones de liposomas.

Descripción detallada de las figuras

- 25
- Síntesis química de análogos de lípido A (figura 14 a figura 30)

Una característica estructural invariante de la molécula de lípido A es su eje central del disacárido D-glucosamina unido por β -(1,6). Aunque esta estructura es de origen bacteriano, este disacárido en su forma pura probablemente no tiene ninguna relevancia para la gama de actividades biológicas desplegadas por la estructura del lípido. Las cadenas lipídicas proporcionan quizás el mecanismo básico mediante el cual el disacárido presenta una amplia gama de propiedades. Por lo tanto, solamente las cadenas de lípido desempeñan una función cuantitativa mediante el fomento de las propiedades del lípido A. Una amplia gama de lípidos puede cumplir esta necesidad, aunque solamente en sus números los lípidos parecen influir cuantitativamente en las propiedades de la molécula. Los autores han sintetizado y examinado la influencia de un intervalo de lípidos tanto naturales (compuesto **13-15** y **17** en la figura 6) como artificiales (**5** en la figura 5, **20** y **23** en la figura 7) y una gama de enlaces mediante los cuales los lípidos se unen y al núcleo de carbohidrato.

El lípido encontrado más frecuentemente en las estructuras de lípido A de la naturaleza es el ácido (R)-3-hidroxi-mirístico. El grupo 3-hidroxi está más acilado con lípidos de longitudes diferentes. El compuesto **5** (figura 5) se diseñó utilizando la estereoquímica natural del ácido aspártico. Como la orientación tridimensional del grupo amino en **5** es idéntica a la del grupo hidroxilo en el ácido (R)-3-hidroxi-mirístico, el compuesto **5** es de esperar que sea un símil estructural del ácido (R)-3-aciloxi-mirístico.

La preparación del compuesto **5** se describe en la figura 5. El derivado **1** del ácido aspártico disponible en el mercado se acopló con nonilamina utilizando cloroformato de isobutilo como reactivo activador para obtener el compuesto **2** con el 79% de rendimiento. La eliminación del grupo Fmoc del compuesto **2** seguida de acoplamiento con el ácido tetradecanoico proporcionó el compuesto **4**. El grupo protector terc-butilo se eliminó por tratamiento con TFA para obtener el compuesto **5** con el 97% de rendimiento.

La figura 6 describe la síntesis del derivado del ácido (R)-3-hidroxi-mirístico. La reacción de Reformatsky²⁰ de dodecanal con bromoacetato de etilo proporcionó **6**, que se hidrolizó a ácido 3-hidroxi-mirístico **7** racémico. La resolución óptica de **7** se consiguió según el procedimiento conocido^{21a, b}. Los diastereómeros de su sal de deshidroabietilamina se separaron por cristalización fraccionada y se hizo el seguimiento de la pureza diastereomérica de la sal por el punto de fusión o espectroscopía de RMN. El tratamiento con base y ácido de la sal proporcionó el isómero R **8** con >95% de exceso enantiomérico (e.e), que se convirtió en éster de fenacilo **9** con 92% de rendimiento. La acilación del grupo 3-hidroxi con varios cloruros de acilo en piridina en presencia de DMAP proporcionó **10-12** que en el tratamiento con polvo de cinc proporcionó ácidos lipídicos libres **13-15**^{22, 23}. Por otra parte el compuesto **9** se trató con tricloroacetimidato de bencilo en presencia de ácido trifluorometilsulfónico para proporcionar el derivado de 3-benciloxi **16** que se convirtió posteriormente en su ácido libre **17**²⁴.

La figura 7 ilustra la síntesis de nuevos dilípido **20** y trilípido **23** que contienen un enlace éter artificial. La reacción de **9** con triflato **18** en presencia de carbonato de potasio proporcionó **19** que se desprotegió para proporcionar el ácido dilípido **20**. La síntesis asimétrica de **21**^{25a, b, c} procedente de dodecanal y bromuro de alilo en presencia de reactivo

5 quiral (-)-DIPCI a -78°C proporcionó el producto con ~85% e.e. con aproximadamente 70% de rendimiento. Se determinó el exceso enantiomérico a partir de sus datos de rotación óptica y de los datos de la RMN de su éster del ácido fenilacético metil trifluorometilo [(R)-(+)-MTPA]^{26, 27}. **21** y **20** se acoplaron en presencia de DCC y DMAP en diclorometano para formar **22** con 81% de rendimiento. La escisión oxidativa del doble enlace en **22** proporcionó el ácido trílípido libre **23** con 61% de rendimiento. Entre las estructuras de lípido A indicadas de la naturaleza, no se conoce todavía la presencia de un resto de trílípido.

10 La figura 8 presenta el procedimiento general utilizado para preparar los derivados de glucosamina. Estos derivados son bien conocidos y se preparan esencialmente según los procedimientos descritos en la bibliografía^{28, 29}.

15 En la figura 9 se describe la síntesis de un análogo **33** de monosacárido del extremo no reductor de la estructura del lípido A. El compuesto **26** se acopló con ácido tetradecanoico en presencia de DCC y DMAP para proporcionar **29** con un 91% de rendimiento. La eliminación reductora del grupo Troc en **29** con polvo de cinc en ácido acético, seguida de acoplamiento con el ácido de lípido **5**, proporcionó el compuesto **30** con 60% de rendimiento. La apertura del anillo de bencilideno regioselectiva con cianoborohidruro de sodio y solución de HCl en éter proporcionó el compuesto 4-OH **31** con 86%. Una introducción del grupo fosfato en dos etapas³⁰ se efectuó haciendo reaccionar **31** con dibencil-disopropilfosforamidita para formar fosfito, seguido de oxidación con ácido m-cloroperbenzoico (m-CPBA) para proporcionar **32** con 66% de rendimiento. La hidrogenación catalítica para eliminar los grupos protectores bencilo de **32** proporcionó el análogo del monosacárido lípido A **33** con 79% de rendimiento.

20 La figura 10 describe la preparación de dos aceptores de glucosilación que deben utilizarse en la síntesis de análogos del disacárido lípido A monofosforilados. El derivado glucosamina **34**³¹ estaba disponible fácilmente en cloruro de hidrógeno glucosamina. La introducción regioselectiva del grupo tritilo en la posición 6-O de **34** en presencia de DMAP y piridina a 40°C proporcionó **35** con 90% de rendimiento. La bencilación de bromuro de bencilo e hidruro de sodio, seguida de tratamiento con ácido acético al 80% a 110°C proporcionó **37**. Se eliminó el grupo ftalimido por tratamiento con hidrazina en etanol a reflujo para proporcionar la amina libre **38**, que se acopló en presencia de DCC con los ácidos lípidicos **15** y **14** para proporcionar **39** y **40**, respectivamente.

25 La preparación del donante de glucosilación **43** se muestra en la figura 11. El compuesto **28** se acopló con **14** en presencia de DCC y DMAP para obtener **41** con muy buen rendimiento. Se eliminó a continuación el grupo alilo en dos etapas, en primer lugar la isomerización del doble enlace del alilo mediante tratamiento con complejo de Ir (I) y a continuación hidrólisis en presencia de NBS. El tratamiento con **42** con tricloroacetnitrilo y DBU proporcionó **43** con 81% de rendimiento.

30 La síntesis completa para el análogo **48** de disacárido lípido A se ilustra en la figura 12 y figura 13. La reacción de glucosilación de **39** y **43** con eterato de dietil-trifluoroboro como catalizador proporcionó el disacárido **44** deseado con 65% de rendimiento (figura 12). El grupo de protección de Troc en **43**, que sirvió como grupo participante adyacente, controló el resultado de la estereoquímica de esta reacción de glucosilación para proporcionar exclusivamente β-glucósido. La eliminación del grupo Troc en **44**, seguida de acoplamiento con el ácido lípidico **13** en presencia de DCC, proporcionó el compuesto **45**. La apertura selectiva del anillo de bencilideno con cianoborohidruro de sodio/HCl proporciona el compuesto de 4'-OH **46** (figura 13). Se introdujo el grupo fosfato mediante la formación de fosfito y posterior oxidación dando **47** con 85% de rendimiento. La desbencilación final con paladio sobre carbón activo e hidrógeno en ácido THF-acético proporcionó el análogo **48** de lípido-A monofosforilado.

35 Toda la estrategia descrita anteriormente es muy eficaz para construir análogos de disacárido lípido A, y es también muy flexible para adaptar variaciones en el contingente de lípido utilizando unos pocos bloques de construcción corrientes. La misma estrategia se utilizó para preparar dos análogos más **54** y **58**, que se describen en las figura 14 a figura 16.

40 En comparación con la estructura propuesta de lípido A tipo *Salmonella* (figura 1), el compuesto **48** (figura 13) no tiene ningún lípido acoplado en la posición 3-O mientras que el resto del modelo de sustitución del lípido continúa siendo el mismo. El compuesto **54** (figura 15) tiene el mismo modelo de sustitución que **48** excepto que en **54** todos los lípidos son de idéntica longitud (C₁₄). La repetición de lípidos puede presentar ventajas para la preparación a gran escala del compuesto. El compuesto **58** (figura 16) lleva un lípido a base de ácido aspártico artificial, pero puede considerarse como un símil próximo de **54**.

45 Para introducir otro ácido lípidico en la posición 3-O del eje central del disacárido, se ha utilizado una estrategia de protección diferente en el azúcar con extremo reductor. La figura 17 presenta la preparación de un nuevo aceptor de glucosilación **64**. A partir de **59**, la alilación en 3-O, la eliminación del grupo bencilideno y la introducción regioselectiva del grupo tritilo proporcionó **60**. La bencilación del grupo 4-OH en **60** con bromuro de bencilo e hidruro sódico, seguida de la eliminación del grupo tritilo proporcionó **62**. El grupo ftalimido en **62** se escindió por tratamiento con hidrazina en etanol a reflujo dando el compuesto de amina libre **63** que se aciló con **14** en presencia de DCC para producir **64**. El grupo alilo en la posición 3-O proporciona la libertad de introducir un lípido en la posición 3-O en cualquier etapa durante la síntesis y si no se elimina, el grupo alilo experimentará hidrogenación catalítica a grupo n-propilo y continúa como un

apéndice permanente a la molécula.

Utilizando el mismo procedimiento descrito para la síntesis del compuesto **48**, el acoplamiento de **43** y **64** proporcionó el disacárido **65** deseado con 88% de rendimiento (figura 18). Mediante escisión reductora del grupo Troc, la acilación de la amina libre, **65** se convirtió en **67** que por último condujo al análogo **70** de lípido A después de una serie de transformaciones que incluyen la apertura reductora del anillo de bencilideno, la introducción del grupo fosfato y la hidrogenación (figura 19). El análogo **70** tienen un grupo n-propilo en la posición 3-O conectado mediante un enlace éter. Los compuestos con dicha cadena corta de alilo única conectada mediante un enlace éter no han sido descritos anteriormente para los análogos de lípido A procedentes de fuentes naturales o por síntesis química.

La figura 20 ilustra la estrategia de la introducción de un ácido lipídico en la posición 3-O del eje central del disacárido. El grupo alilo de **65** se eliminó por tratamiento con el complejo de Ir (I), seguido de NBS para proporcionar **71**. El acoplamiento de **71** con **17** en presencia de DCC y DMAP proporcionó **72** con 71% de rendimiento, que después del tratamiento con cinc en ácido acético formó la amina libre **73**. Realizando la misma serie de reacciones como se describió anteriormente, el compuesto **73** se convirtió en la estructura final **77** (figura 21).

En el procedimiento de preparación de varios otros análogos de lípido A se ha adoptado una nueva estrategia simplificada para la síntesis de **86** como se muestra en la figura 22 a figura 24. En la figura 22 el aceptor de glucosilo **79** se preparó en dos etapas a partir de **27** por acilación en la posición 3-O y eliminación del grupo 4,6-isopropilideno.

La figura 23 describe la preparación del nuevo donante **83** de glucosilo que se completa con el grupo fosfato protegido con bencilo en la posición 4-O. La apertura selectiva del anillo de bencilideno en **41** utilizando cianoborohidruro sódico y HCl anhidro proporcionó el compuesto **80** con buen rendimiento. El grupo fosfato protegido con bencilo se introdujo a continuación en la posición 4-O para formar **81** con 85% de rendimiento. La desalilación seguida de la reacción con tricloroacetnitrilo y DBU formó el nuevo donante de glucosilación **83**.

La reacción de acoplamiento entre **79** y **83** (figura 24) se realizó en presencia de trifluoroboro eterato como catalizador para formar un disacárido deseado **84** con 66% de rendimiento. La eliminación reductora de los grupos Troc, seguido de acoplamiento con el ácido lipídico **14**, proporcionó el compuesto **85** que, después de la desbencilación, proporcionó el análogo **86** del lípido A.

En la estrategia modificada, el grupo fosfato se introdujo antes de la formación del enlace glucosílico. La glucosilación del aceptor con dos grupos hidroxilo libres procedió tanto con regioselectividad con estereoselectividad formando solamente β -glucósido conectado en (1 \rightarrow 6). Realizando así las etapas de síntesis se redujeron en la etapa de disacárido. Este procedimiento se vuelve muy eficiente para los análogos de lípido A con idénticos sustituyentes en las aminas en 2 y 2', que pueden introducirse simultáneamente.

Utilizando el mismo procedimiento se preparó otro análogo **94** de lípido A (figura 25, figura 26). La diferencia entre los compuestos **86** y **94** es que en el último los restos de dilípido contienen enlaces éter. Aunque el enlace éter no es conocido en las estructuras de lípido A derivadas de las naturales, proporciona mejor estabilidad a las estructuras de lípido A que el enlace éster natural. Además, el enlace éter no es sensible a las condiciones hidrolíticas y es más hidrófobo. Por lo tanto, el resto de lípido con enlace éter alcanza mejor estabilidad y puede desplegar mejor características adyuvantes que su contrapartida natural. En la figura 25 se describe la preparación del donante de glucosilación **91**. Partiendo del acoplamiento de **28** con el ácido lipídico **20** (\rightarrow **87**), mediante apertura del anillo de bencilideno (\rightarrow **88**) la introducción del grupo fosfato (\rightarrow **89**), de la alilación (\rightarrow **90**) y de la formación de imidato, se obtuvo el compuesto **91**. Como se describió anteriormente la reacción de glucosilación de **79** y **91** proporcionó el disacárido **92** (figura 26), que mediante la eliminación grupo Troc, la acilación con el ácido lipídico **20**, y la desbencilación final, proporcionó el análogo **94** de lípido A.

Utilizando la estrategia modificada, se describen dos ejemplos de síntesis más de análogos de lípido A en la figura 27 a la figura 30. En la figura 27 se describe la preparación de un nuevo aceptor de glucosilación **98**. Se introdujo un grupo bencilo en la posición 3-O de **27** utilizando tricloroacetimidato de bencilo y ácido trifluorometil-sulfónico para proporcionar **95**. Tanto isopropilideno como el grupo Troc se eliminaron para formar la amina libre **97** que en el acoplamiento con el ácido trilípido **23** proporcionó el aceptor **98** de glucosilo.

La reacción de glucosilación entre **91** y **98** en presencia de trifluoroboro eterato proporcionó el disacárido **99** deseado con 56% de rendimiento (figura 28), que en el tratamiento con cinc activado en ácido acético proporcionó el compuesto amino **100**. La acilación del grupo amino con **20** (figura 29) y **17** (figura 30) proporcionó **101** y **103**, respectivamente. La desprotección completa de **101** y **103** proporcionó dos análogos de lípido A **102** y **104**, respectivamente.

Ambos compuestos **102** y **104** son portadores de restos de trilípido en el grupo amino del azúcar con extremo reductor. No ha habido ningún informe de estructuras de lípido A naturales con componentes trilípidicos ni se ha publicado ninguna estructura sintetizada químicamente. Se cree que el número de cadenas de lípido acopladas al núcleo de carbohidrato modula cuantitativamente las actividades biológicas de los análogos de lípido A. Todavía se continuará

investigando si la presencia de un resto de trilípido en la estructura del lípido A tiene un efecto cuantitativo neto sobre las actividades biológicas. En el contexto de la presente invención se cree que el fragmento estructural trilípido no altera significativamente las propiedades biológicas de las estructuras del lípido A. Los resultados preliminares de la prueba *in vivo* de la presente invención demuestran que tanto los compuestos **102** como **104** han presentado características adyuvantes similares a los de la preparación del lípido A de origen bacteriano así como a los del análogo sintético **86**.

Resultados de la prueba biológica (figuras 31 a 33)

Se han utilizado formulaciones de liposomas para evaluar las propiedades adyuvantes de varias estructuras de lípido A sintéticas y las respuestas inmunitarias a un antígeno BP-148 de lipopéptido sintético, H₂N-STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK(Pal)G-OH (figura 34), secuencia de 25 aminoácidos modificada procedente de la mucina MUC1 asociada al tumor. Se utilizó para comparación el producto de lípido A disponible en el mercado, que está actualmente en evaluación clínica como adyuvante para programas de vacunas. El producto de lípido A natural, adquirido en AVANTI, contenía una mezcla de análogos de lípido A extraídos de la pared celular bacteriana de *Salmonella* y se denominó lípido A natural en su descubrimiento.

Por lo tanto, las formulaciones liposómicas que contienen el antígeno de lipopéptido sintético, BPI-148 y los análogos de lípido A **33**, **48**, **54**, **58**, **70**, **77**, **86**, **94**, **102**, **104** o **lípido A natural**, se utilizaron para inmunizar ratones para medir su respuesta inmunitaria en cuanto a la blastogénesis de linfocitos T y la producción de interferón-gamma (IFN- γ). Los compuestos se probaron en tres grupos en diferentes tiempos y sus resultados preliminares se muestran por separado en las figuras 31 a 33. Como las variaciones se atribuyen a diferentes factores tales como grupos de animales y factores de experimentación, los datos de diferentes grupos no se compararán.

La blastogénesis de linfocitos T y las grandes concentraciones de producción de IFN- γ en ratones después de la introducción de dichas formulaciones de liposomas demostraron ampliamente que las estructuras **48**, **54**, **70**, **86**, **102** y **104** de lípido A sintéticas tienen actividad adyuvante similar en comparación con **lípido A natural**. Como se muestra en la figura 31 a la figura 33, las formulaciones de vacuna liposómicas que contienen estos análogos sintéticos, **48**, **54**, **70**, **86**, **102** y **104** de lípido A provocan blastogénesis de linfocitos T significativa y grandes cantidades de interferón-gamma. Los valores de CPM (recuentos por minuto) y de IFN- γ (pg/ml) son comparables a los observados para las formulaciones que contienen **lípido A natural**. Las formulaciones que contienen el análogo de lípido A sintético **94** (figura 33) producen también blastogénesis de linfocitos T significativa, aunque la producción de la cantidad de interferón-gamma es baja. Más experimentación del compuesto **94** es necesaria para proporcionar un resultado sin ambigüedades de sus propiedades adyuvantes. Los compuestos **33**, **77** y **58** son inactivos tanto en la blastogénesis de linfocitos T como en la producción de interferón-gamma.

El compuesto **86** parece ser ligeramente más activo que todos los demás análogos sintéticos de lípido A probados en el segundo grupo mostrados en (figura 32). En una comparación directa con el lípido A natural, el análogo **86** sintético presentaba similares valores tanto en la blastogénesis de linfocitos T como en la producción de IFN- γ . Estructuralmente, el compuesto **86** tiene un total de siete cadenas de lípidos, incluyendo un resto de ácido 3-hidroxi-mirístico en la posición 3-O en el eje central del disacárido. El compuesto **54** y el compuesto **70** están estructuralmente muy próximos al compuesto **86**, excepto que el compuesto **54** no tiene ninguna cadena de lípido en la posición 3-O y el compuesto **70** tiene un solo grupo n-propilo en la posición 3-O. Resultados comparables tanto en la blastogénesis de linfocitos T como en la producción de interferón-gamma (IFN- γ) se obtienen para los compuestos **54**, **70** y **86** (figura 32). Esta observación indica que la naturaleza del grupo sustituto en la posición 3-O del eje central del disacárido lípido-A probablemente tiene poco efecto sobre la capacidad adyuvante de los análogos de lípido A. Además, los compuestos **48** y **70** (figura 32) que tienen ambos el mismo modelo de sustitución pero que se diferencian solamente en la longitud de la cadena lipídica, son casi de rendimiento idéntico. Este resultado confirma la creencia de los inventores de que ligeras variaciones en la longitud de la cadena de lípido no afectan mucho las propiedades adyuvantes de los análogos de lípido A.

Como se muestra en la figura 33, los compuestos **102** y **104** también demostraron similares resultados en comparación tanto con el compuesto **86** como con el **lípido A natural**. Curiosamente, ambos compuestos **102** y **104** contienen un resto de ácido graso trilípido artificial en la posición 2-N del eje central del disacárido. Además, el enlace éter artificial del enlace éster natural está incorporado también para el enlace lípido-lípido en los restos de ácido graso multi-lípido. El descubrimiento que el compuesto **102** y **104** presentan similar capacidad adyuvante que el producto **lípido A natural** prueba además la idea de los inventores de que ligeras variaciones en la fracción de lípido de las estructuras de lípido A no afectan la propiedad adyuvante de estas moléculas. Estos resultados son sumamente útiles en el diseño de nuevos similares de lípido A que pueden proporcionar moléculas estructuralmente más sencillas, más estables y biológicamente más activas.

Los análogos sintéticos **33**, **58** y **77** contienen lípidos a base de ácido aspártico. Las débiles respuestas observadas a estas formulaciones liposómicas se atribuyen principalmente a su escasa incorporación en los liposomas como resultado de su escasa solubilidad. Pueden ser necesarias diferentes técnicas de formulación para asegurar su eficaz incorporación en los liposomas y para reevaluar sus propiedades adyuvantes.

Ejemplos

5 *General:* No se corrigieron los puntos de fusión. Todas las reacciones sensibles al aire y a la humedad se realizaron en atmósfera de nitrógeno. THF, DMF y diclorometano anhidros se adquirieron en Aldrich y otros disolventes anhidros se prepararon de la manera habitual. Se adquirieron disolventes calidad ACS en Fisher y se utilizaron para cromatografía sin destilación. Las placas de TLC (gel de sílice 60 F₂₅₄, espesor 0,25 mm, Merck) y gel de sílice ultrarrápido 60 (35-75 μm) para cromatografía en columna se adquirieron en Rose Scientific, Canadá. Se registraron espectros de ¹H y ³¹P en espectrómetros Bruker AM 300 MHz o Varian Unity 500 MHz o Bruker DRX 600 MHz con TMS como patrón interno para desplazamientos químicos de protones. Se midieron las rotaciones ópticas en un polarímetro 241 Perkin-Elmer a temperatura ambiente (20-22°C). Se obtuvieron datos de análisis elemental en el laboratorio de Microanálisis en la Universidad de Alberta. Los análisis espectrométricos de masas con atomización de electrones se realizaron en espectrómetros de masas MS50B o MSD1 SPC.

15 Ejemplo 1 Preparación del compuesto 2

Se enfrió a -20°C una solución de **1** (3,16 g, 7,69 mmoles) en THF anhidro (35 ml). Se añadieron N-metil-morfolina (0,76 ml, 0,70 g, 6,92 mmoles) y cloroformato de isobutilo (0,94 g, 0,90 ml, 6,92 mmoles). Se agitó la mezcla durante 5 min. y nonilamina (1,27 ml, 0,99 g, 6,92 mmoles) en THF anhidra (2 ml) se añadieron a la solución anterior. Se agitó la mezcla a -20°C durante 1 h. Se añadió metanol (3ml) y la mezcla de reacción se concentró al vacío. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (hexano:acetato de etilo, 2:1) para proporcionar **2** (3,27 g, 79%). TLC: R_f=0,44 (hexano:acetato de etilo, 3: 1), [α]_D²²= +16,9 (c 0,64, cloroformo).

25 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 3 H, CH₃), 1,42 (br s, 12 H, 6 CH₂), 1,50 (br s, 11 H, 3 CH₃, CH₂), 2,59 (dd, J=16,0, 6,5 Hz, 1H, Asp-β-H), 2,93 (dd, J=16,0, 3,5 Hz, 1H, Asp-β'-H), 3,24 (m, 2 H, NCH₂), 4,22 (t, J=7,0 Hz, 1H, Fmoc-CH), 4,45 (m, 3 H, OCH₂, Asp-α-H), 5,96 (d J=7,0 Hz, 1 H, NH), 6,45 (m, 1H, NH), 7,29 - 7,79 (m, 8 H, Ar-H). Anal. calc. para C₃₂H₄₄N₂O₅ (536,71): C, 71,61; H, 8,26; N, 5,22. Encontrado: C, 71,68; H, 8,51; N, 5,27.

30 Ejemplo 2 Preparación del compuesto 3

El compuesto **2** (9,50 g, 19,47 mmoles) se disolvió en THF anhidro (40 ml). Se añadió piperidina (10 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. Se eliminó el disolvente y se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (hexano:acetato de etilo, 1:1 metanol al 5% en diclorometano) para proporcionar **3** (5,64 g, 92%). TLC: R_f=0,38 (5% de metanol en diclorometano), [α]_D²²= -41,0 (c 0,59, cloroformo).

35 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, J=6,5 Hz, CH₃), 1,22 (br s, 12 H, 6 CH₂), 1,45 (s, 9 H, 3 CH₃), 1,55 (m, 2 H, CH₂), 1,68 (s, 2 H, NH₂), 2,46 (dd, J=16,0, 8,0 Hz, 1 H, Asp-β-H), 2,83 (dd, J=16,0, 4,0 Hz, 1 H, Asp-β'-H), 3,20 (m, 2 H, NCH₂), 3,80 (dd, J=8,0, 4,0 Hz, 1 H, Asp-α-H), 7,36 (br s, 1 H, NH). Anal. calc. para C₁₇H₃₄N₂O₃ (314,47): C, 64,93; H, 10,90; N, 8,90. Encontrado: C, 65,01; H, 11,20; N, 8,96.

40 Ejemplo 3 Preparación del compuesto 4

Se disolvió ácido tetradecanoico (4,51 g, 19,78 mmoles) en THF anhidro (50 ml). Se añadió n-metil morfolina (3,78 ml, 3,47 g, 34,40 mmoles) y se enfrió la solución a -25°C. Se añadió gota a gota cloroformato de isobutilo (2,37 ml, 2,47 g, 18,06 mmoles) y la mezcla se agitó durante cinco min. Se añadió gota a gota a la solución anterior una solución de **3** (5,40 g, 17,20 mmoles) en THF anhidro (50 ml). La mezcla, después de agitar a -25°C durante 30 min., se dejó calentar a temperatura ambiente en 1 h. Se añadió a continuación metanol (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante cinco min. más. Se concentró al vacío y se purificó el residuo por cromatografía (diclorometano:acetona, 30:1 y 25:1) para proporcionar **4** (7,21 g, 80%). TLC:R_f= 0,37 (hexano:acetato de etilo, 3:1). [α]_D²²= -14,4 (c 0,61, cloroformo).

50 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,87 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,25 (br s, 32 H, 16 CH₂), 1,46 (br s, 11 H, 3 CH₃, CH₂), 1,54 (m, 2 H, CH₂), 2,21 (t, J=7,5 Hz, 2 H, CH₂), 2,52 (dd, J=16,5, 7,0 Hz, 1 H, Asp-β-H), 2,84 (dd, J=16,5, 4,0 Hz, 1 H, Asp-β'-H), 3,21 (m, 2 H, NCH₂), 4,71 (m, 1 H, Asp-α-H), 6,63 (t, J=5,0 Hz, 1 H, NH), 6,84 (d, J=7,0 Hz, 1 H, NH). Anal. calc. para C₃₁H₆₀N₂O₅ (524,83): C, 70,94; H, 11,52; N, 5,34; Encontrado: C, 70,84; H, 11,87; N, 5,28.

55 Ejemplo 4 Preparación del compuesto 5

El compuesto **4** (7,74 g, 14,77 mmoles) se disolvió en ácido trifluoroacético-agua (95:5, v/v, 180 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Se eliminó a continuación el disolvente y se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (2 a 4% en metanol en diclorometano) para proporcionar **5** (6,71 g, 97%). TLC: R_f= 0,33 (5% de metanol en cloroformo). [α]_D²²= -27,5 (c 0,24, cloroformo).

60 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,26 (br s, 32 H, 16 CH₂), 1,48 (m, 2 H, CH₂), 1,62 (m, 2 H, CH₂), 1,24 (t, J=7,5 Hz, 2 H, CH₂), 2,69 (dd, J=16,5, 7,0 Hz, 1 H, Asp-β-H), 2,89 (dd, J=16,5, 4,0 Hz, 1 H, Asp-β'-H), 3,21

(m, 2 H, NCH₂), 4,79 (m, 1 H, Asp- α -H), 6,95 (t, J=5,5 Hz, 1 H, NH), 7,05 (d, J=7,5 Hz, 1 H, NH). Anal. calc. C₂₇H₅₂N₂O₄ (468,72): C, 69,19; H, 11,18; N, 5,98. Encontrado: C, 69,14; H, 11,28; N, 5,95,

Ejemplo 5 Preparación del compuesto 8

5 (1) Compuesto **6**: se añadió cinc en polvo (19,6 g, 299 mmoles) a una mezcla de dodecanal (25,0 g, 136 mmoles), bromoacetato de etilo (25,0 g, 150 mmoles) y 150 ml de THF en presencia de atmósfera de nitrógeno. El matraz de reacción se sujetó a un baño de ultrasonidos y se comenzó el tratamiento con ultrasonidos. Se añadió lentamente yodo (3,5 g, 27,2 mmoles) al matraz de reacción. Después de 2 a 3 minutos de tratamiento con ultrasonidos se inició la
10 reacción intensamente. A continuación se interrumpió el tratamiento con ultrasonidos y el matraz de reacción se retiró del baño de ultrasonidos. Se filtró el cinc y se lavó con THF (10 ml) durante 6 a 7 veces. Los filtrados combinados se concentraron al vacío. Resultó un líquido viscoso amarillo pálido al que se añadió hexano (200 ml) y se agitó bien durante 5 min. Precipitó un sólido blanco, que se filtró y se lavó con hexano (3x15 ml). El filtrado combinado y los lavados se concentraron a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna (10% de acetato de etilo en hexano) para proporcionar el compuesto **6** puro (22,2 g, 60%). TLC: R_f= 0,25 (10% de acetato de etilo en hexano).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ =0,88 (t, J=6,5 Hz, CH₃), 1,26 (m, 16 H), 1,28 (t, J=6,5 Hz, 3 H, CH₃), 1,40 - 1,50 (m, 4 H), 2,40 (dd, J=16,0, 7,0 Hz, 1 H), 2,50 (dd, J=16,0, 3,0 Hz, 1 H), 3,05 (s, 1 H, OH), 4,00 (m, 1 H, H-3), 4,17 (q, J=6,5 Hz, 2 H),

20 (2) Compuesto **7**: Se disolvió éster 3-hidroxi-mirístico **6** (122,0 g, 0,5 mmoles) en etanol (800 ml) y se añadió KOH (33,6 g). Se calentó a reflujo la mezcla de reacción durante 1 h. y a continuación se añadió HCl 10% (1000 ml) después de enfriar en un baño con hielo. Precipitó un sólido blanco que se filtró y se secó brevemente (192,0 g). Se recrystalizó el sólido con hexano (800 ml) a ebullición para proporcionar un compuesto **7** (98,2 g, 90%) cristalino blanco. TLC: R_f=0,35 (5% de metanol en diclorometano).

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ =0,88 (t, J=6,5 Hz, CH₃), 1,25 (m, 20 H), 2,20 (dd, J=15,0, 7,5 Hz, 1 H), 2,28 (dd, J=15,0, 5,5 Hz, 1 H), 3,80 (br s, 1 H), 4,55 (br s, 1 H).

30 (3) Sal de ácido 3-hidroxi-mirístico-deshidroabietil-amina: Se disolvió deshidroabietil-amina pura (purificada según la bibliografía^{21b}, 131,0 g, 459,6 mmoles) en una mezcla de hexano (3,0 l) y éter dietílico (1,5 l). Se disolvió el compuesto **7** (110,0 g, 450,8 mmoles) en éter dietílico (3,0 l) y se añadió a la solución de amina anterior con agitación. La cristalización comenzó inmediatamente después de la adición. Se interrumpió la agitación y la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido blanco se filtró y se lavó con una mezcla de hexano:éter dietílico (1:1). El precipitado se disolvió en metanol (500 ml) (calentado para disolver) y a continuación se añadió la mezcla hexano:éter dietílico (1:1, 700 ml). La mezcla se mantuvo en un frigorífico (-99°C) durante la noche. Precipitó un sólido blanco que se recogió por filtración. Se repitió la recrystalización del sólido hasta que no subía más el punto de fusión. El rendimiento final de la sal (R) pura fue de 38 g, 40%. p.f. 131,5-132°C.

40 ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ : 0,85 (t, J=6,5 Hz, 3 H, CH₃), 1,00 (s, 3 H, CH₃), 1,19 (d, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,25 (s, 3 H, CH₃), 1,25 - 1,70 (m), 2,10 (dd, J=15,0, 10,0 Hz, 1 H), 2,27 (m, 2 H), 2,63 (d, J=12,5 Hz, 1 H), 2,79 (m, 2 H), 2,87 (m, 2 H), 3,81 (m, 1 H), 6,40 (br s, 3 H), 6,85 (d, J=1,5 Hz, 1 H), 6,95 (dd, J=8,0, 1,5 Hz, 1 H), 7,12 (d, J=8,0 Hz, 1 H).

45 Una sola serie de picos de doble doblete a 2,10 ppm es característico de sólo un isómero presente. Para la sal formada a partir del ácido 3-hidroxi-mirístico racémico, dos series de picos de doble doblete aparecerán en esta posición. La RMN pueden utilizarse en la presente memoria para detectar la eficacia de la separación.

50 (4) Compuesto **8**: la sal de la deshidroabietil-amina y ácido mirístico (38,0 g) se tomaron en un matraz de fondo redondo de 2 l y se añadieron carbonato sódico acuoso saturado (1000 ml) y éter dietílico (800 ml). Se agitó intensamente la mezcla durante 30 min. Se separaron la capa acuosa y la capa de éter y se recogió el sólido. Se lavó el sólido con agua (300 ml), éter (3x100 ml) y se secó brevemente. Se trató el sólido con 1 l de HCl al 2% (acuoso) y acetato de etilo (1,5 l), hasta que se disolvió el sólido completamente. Se separó la capa acuosa y se extrajo con acetato de etilo (2x150 ml). Se secó la capa orgánica con sulfato sódico anhidro y se concentró para proporcionar ácido rico en R que se recrystalizó en acetato de etilo y hexano para proporcionar **8** (16,5 g) en ~95% e.e. [α]_D²⁰ = -15,5 (c 1,0, CHCl₃).

Ejemplo 6 Preparación del compuesto 9

60 Se disolvió el compuesto **8** (16,0 g, 65,6 mmoles) en acetato de etilo anhidro y bromoacetofenona (15,66 g, 78,7 mmoles) y trietilamina (7,95 g, 78,7 mmoles) se añadieron bajo atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se dejó agitar durante la noche. Se precipitó un sólido blanco que se filtró y se lavó con acetato de etilo (3x10 ml). Los lavados combinados y el filtrado se evaporaron hasta obtener un sólido amarillo pálido que se purificó para proporcionar **9** (22,0 g, 92%) como sólido cristalino blanco por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:hexano, 1:8). TLC:R_f= 0,42 (acetato de etilo:hexano, 1:3). [α]_D²⁰ = -5,7 (c 1,0, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 3 H, CH_3), 1,30 (br s, 16 H), 1,40 - 1,60 (m, 4 H), 2,57 (dd, $J=15,0$, 9,0 Hz, 1 H), 2,70 (dd, $J=15,0$, 3,0 Hz, 1 H), 3,45 (d, $J=3,5$ Hz, 1 H), 4,18 (m, 1 H, H-3), 5,37 (d, $J=16,0$ Hz, 1 H), 5,49 (d, $J=16,0$ Hz, 1 H), 7,50 (m, 2 H), 7,64 (m, 1 H), 7,92 (m, 2 H).

5 **Ejemplo 7** Preparación del compuesto **10**

El compuesto **9** (500 mg, 1,381 mmoles) se disolvió en piridina (5 ml) y a esta solución se añadió 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 8,46 mg, 0,068 mmoles). La mezcla resultante se enfrió a continuación en un baño con hielo durante 5 minutos antes de añadir gota a gota cloruro de lauroilo (383 μl , 1,657 mmoles). Cuando acabó la adición de cloruro de lauroilo, toda la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. La TLC de la mezcla de reacción a la mañana siguiente mostraba la presencia del lípido de partida **9**. La reacción se enfrió a continuación hasta 0°C y a esta temperatura se trató con algo más de cloruro de lauroilo (160 μl). Posteriormente, se retiró la mezcla de reacción del baño y se dejó reaccionar durante 3 horas más a temperatura ambiente. Para interrumpir la reacción, se añadió metanol (1 ml) y 10 minutos después la mezcla de reacción se concentró a sequedad en el evaporador. El residuo se aplicó a continuación sobre gel de sílice para purificación cromatográfica (acetato de etilo:hexano, 1:9) para proporcionar el compuesto **10** (524 mg, 70%). El rendimiento de la reacción podría ser mayor si la fracción impura (320 mg) se purificase de nuevo. TLC: R_f = 0,34 (acetato de etilo:hexano, 1:9). $[\alpha]_D^{20}$ = +1,0 (c 1,0, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,30 (m, 34 H), 1,65 (m, 4 H), 2,30 (t, $J=6,5$ Hz, 2 H), 2,72 (dd, $J=15,5$, 5,5 Hz, 1 H), 2,78 (dd, $J=15,5$, 7,5 Hz, 1 H), 5,30 (m, 1 H, H-3), 5,35 (s, 2 H), 7,47 (m, 2 H), 7,63 (m, 1 H), 7,90 (m, 2 H).

Ejemplo 8 Preparación del compuesto **11**

Se disolvió el compuesto **9** (16,0 g, 44,2 mmoles) en piridina (150 ml) y se añadió DMAP (270 mg, 2,2 mmoles). Se añadió gota a gota cloruro de tetradecanoilo (13,1 g, 53,0 mmoles) manteniendo la mezcla de reacción en un baño de agua fría. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Cuando la TLC indicaba la terminación de la reacción, se añadió metanol (20 ml) para enfriar la reacción y se dejó agitar durante 30 min. Se eliminaron los disolventes a sequedad y el residuo se disolvió en 800 ml de acetato de etilo y se lavó con agua con hielo (2x100 ml). La capa acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (3x100 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró al vacío. El residuo incoloro obtenido se purificó sobre una cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:hexano, 1:10) para proporcionar el compuesto **11** puro (23,0 g, 92%). TLC: R_f = 0,54 (acetato de etilo:hexano, 5:1). $[\alpha]_D^{20}$ = +0,95 (c 2,0, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,26 (br s, 38 H), 1,65 (m, 4 H), 2,31 (t, $J=6,5$ Hz, 2 H), 2,72 (dd, $J=16,0$, 5,5 Hz, 1 H), 2,79 (dd, $J=16,0$, 7,5 Hz, 1 H), 5,32 (m, 1 H, H-3), 5,34 (s, 2 H), 7,35 (m, 2 H), 7,61 (m, 1 H), 7,90 (m, 2 H).

Ejemplo 9 Preparación del compuesto **12**

El compuesto **12** se sintetizó siguiendo exactamente el mismo procedimiento descrito para la preparación del compuesto **10** excepto que el cloruro de lauroilo se sustituyó por cloruro de palmitoilo. Cuando terminó la reacción entre el compuesto **9** (500 mg, 1,381 mmoles) y el cloruro de palmitoilo (628,5 μl), el residuo de la eliminación del disolvente se redisolvió en acetato de etilo y se lavó con agua. Se secó la capa orgánica sobre Na_2SO_4 y se concentró. El producto deseado, compuesto **12**, se obtuvo como sólido incoloro (463,4 mg, 56%) procedente de la purificación en columna de gel de sílice utilizando acetato de etilo-hexano (1:9) para elución. El producto adicional deseado (563,6 mg) se obtuvo en forma ligeramente impura. TLC: R_f $[\alpha]_D^{20}$ = +2,0 (c 1,0, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,30 (br s, 42 H), 1,65 (m, 4 H), 2,31 (t, $J=6,5$ Hz, 2 H), 2,72 (dd, $J=15,0$, 5,5 Hz, 1 H), 2,78 (dd, $J=15,0$, 7,5 Hz, 1 H), 5,30 (m, 1 H, H-3), 5,35 (s, 2 H), 7,48 (m, 2 H), 7,61 (m, 1 H), 7,90 (m, 2 H).

Ejemplo 10 Preparación del compuesto **13**

El compuesto **10** (510 mg) se disolvió en ácido acético al 80% en acetato de etilo (18 ml) y se añadió Zn en polvo (1,0 g). Toda la mezcla se dejó en buena agitación durante la noche. A la mañana siguiente se trató la reacción con más polvo de Zn (400 mg) y se agitó durante 5 horas más. Se filtró a continuación el sólido y se lavó con abundante cantidad de acetato de etilo. Se concentró a sequedad el filtrado. El resto se purificó en columna de sílice ultrarrápida (acetato de etilo:hexano:ácido acético, 1:10:1%) para proporcionar el compuesto **13** (327 mg, 82%) en enfriamiento a 0°C . TLC: R_f = 0,22 (acetato de etilo:hexano, 1:9). $[\alpha]_D^{20}$ = -1,2 (c 1,0, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 - CD_3OD): δ = 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,30 (br s, 34 H), 1,62 (m, 4 H), 2,30 (t, $J=6,5$ Hz, 2 H), 2,52 (dd, $J=15,5$, 5,5 Hz, 1 H), 2,60 (dd, $J=15,5$, 7,5 Hz, 1 H), 5,22 (m, 1 H, H-3).

Ejemplo 11 Preparación del compuesto 14

La mezcla del compuesto **11** (23,0 g), polvo de cinc (50 g) y ácido acético glacial (350 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se filtró polvo de cinc y se lavó con acetato de etilo (100 ml). Los filtrados combinados se concentraron a presión reducida y se evaporaron junto con tolueno dos veces. El residuo como líquido viscoso incoloro se purificó por cromatografía en gel de sílice (2% de metanol en diclorometano). El compuesto **14** puro (16,5 g, 90%) se obtuvo como un sólido blanco tras la evaporación del disolvente. TLC: $R_f=0,40$ (acetato de etilo: hexano, 1: 3). $[\alpha]_D^{20} = -1,25$ (c 2,0, CHCl_3).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,88$ (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,30 (br s, 38 H), 1,40 - 1,55 (m, 4 H), 2,47 (dd, $J=16,5$, 9,0 Hz, 1 H), 2,58 (dd, $J=16,5$, 3,0 Hz, 1 H), 4,05 (m, 1 H, H-3).

Ejemplo 12 Preparación del compuesto 15

El compuesto **12** (429,9 mg, 0,716 mmoles) se disolvió en acetato de etilo (4,4 ml) y se añadió ácido acético (17,6 ml). Después se hizo una adición de Zn en polvo (2,1 g), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, a continuación se eliminó el Zn por filtración y se lavó con abundante cantidad de acetato de etilo. El filtrado se concentró y purificó en columna de gel de sílice ultrarrápida (acetato de etilo: hexano: ácido acético, 1: 10: 1%) para proporcionar el compuesto **15** (245 mg, 72%). TLC: $R_f=0,25$ (acetato de etilo: hexano, 1: 10). $[\alpha]_D^{20} = -1,3$ (c 1,0, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,88$ (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,23 (br s, 42 H), 1,62 (m, 4 H), 2,28 (t, $J=6,5$ Hz, 2 H), 2,56 (dd, $J=16,0$, 5,5 Hz, 1 H), 2,64 (dd, $J=16,0$, 7,5 Hz, 1 H), 5,20 (m, 1 H, H-3).

Ejemplo 13 Preparación del compuesto 16

El compuesto **9** (5,0 g, 13,8 mmoles), tricloroacetamido de bencilo (7,0 g, 27,6 mmoles), polvo de tamiz molecular (4 Å, 3,0 g), diclorometano anhidro (100 ml) y hexano anhidro (100 ml) se colocaron en un matraz de 250 ml de fondo redondo y se agitaron durante 30 min bajo atmósfera de N_2 . Se enfrió a 0°C y se añadió ácido trifluorometil-sulfónico (0,414 g, 2,8 mmoles) y se agitó durante 5 h a 0°C . Cuando no presentó ninguna mejora más en la formación del producto en la TLC, la reacción se enfrió con trietil-amina (2 ml). La mezcla de reacción se filtró a través de un pequeño lecho de celite, se lavó intensamente con diclorometano y el filtrado combinado y los lavados se concentraron. Se purificó el residuo incoloro obtenido en una columna de sílice (acetato de etilo: hexano, 1: 10) para obtener **16** puro (6,0 g, 96%) como sólido blanco brillante. TLC: $R_f=0,36$ (hexano: acetato de etilo, 6: 1). $[\alpha]_D^{20} = -7,4$ (c 2,0, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,88$ (t, $J=6,5$ Hz, 3 H, CH_3), 1,25 (br s, 18 H), 1,62 (m, 2 H), 2,66 (dd, $J=15,0$, 5,5 Hz, 1 H), 2,80 (dd, $J=15,0$, 7,5 Hz, 1 H), 3,95 (m, 1 H), 4,54 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,60 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 5,27 (d, $J=15,5$ Hz, 1 H), 5,35 (d, $J=15,5$ Hz, 1 H), 7,32 (m, 5 H, Ar-H), 7,47 (m, 2 H), 7,60 (m, 1 H), 7,90 (m, 2 H).

Ejemplo 14 Preparación del compuesto 17

Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación del compuesto **14**, se preparó el compuesto **17** a partir del compuesto **16** (6,0 g) en presencia de polvo de cinc (10,0 g) y ácido acético glacial (100 ml). La reacción se completó en 30 min. Después de la preparación, se purificó el residuo incoloro en una columna de sílice acetato de etilo:hexano:ácido acético 2: 8: 1%) como sistema disolvente. La evaporación del disolvente proporcionó **17** como un sólido blanco con 65% de rendimiento. TLC: $R_f=0,45$ (hexano: acetato de etilo, 4: 1). $[\alpha]_D^{20} = -5,4$ (c 2,0, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,88$ (t, $J=6,5$ Hz, 3 H, CH_3), 1,26 (br s, 18 H), 1,60 (m, 2 H), 2,55 (dd, $J=15,5$, 5,5 Hz, 1 H), 2,64 (dd, $J=15,5$, 6,5 Hz, 1 H), 3,87 (m, 1 H), 4,58 (s, 2 H), 7,30 (m, 5 H, Ar-H).

Ejemplo 15 Preparación del compuesto 19

(1) Compuesto **18**: Una mezcla de alcohol dodecílico (810,0 mg, 4,348 mmoles), piridina (394 μl) y CH_2Cl_2 (0,5 ml) se añadió lentamente a una solución enfriada de anhídrido del ácido trifluorometil-sulfónico (anhídrido trifílico, 1,433 ml en 8,0 ml de CH_2Cl_2) a 0°C durante un periodo de 15 minutos. La mezcla resultante se agitó a continuación a la misma temperatura durante 20 minutos en cuyo periodo la reacción parecía como suspensión ligeramente naranja y su TLC indicaba la ausencia de alcohol dodecílico. Se añadió hexano (20 ml) enfriado. Se eliminó a continuación el sólido filtrando a través de un lecho de sulfato sódico y se lavó con algo más de hexano. La eliminación del disolvente proporcionó producto triflato en bruto como líquido transparente. Después de secar más a alto vacío la cantidad de triflato **18** en bruto fue de 1,433 g. TLC: $R_f=0,77$ (hexano: acetato de etilo, 10: 1).

(2) Compuesto **19**: El lípido **9** (1,05 g; 2,989 mmoles) y Na_2SO_4 (7,0 g) en 1,2-dicloroetano anhidro (25 ml) se agitaron durante 5 minutos antes de añadir la solución de triflato **18** en bruto (1,433 g en 2 ml de 1,2-dicloroetano anhidro). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana. Se calentó a continuación a 80°C durante 2 horas. Todavía permanecía algún lípido **9** en la mezcla de reacción, pero la reacción terminó. Se filtró el sólido

a través de un lecho de Na₂SO₄ y se lavó con CH₂Cl₂ (150 ml). Los filtrados combinados se lavaron con NaHCO₃ saturado (20 ml), agua (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄. Los restos de la eliminación del disolvente se purificaron en columna de gel de sílice ultrarrápida (CH₂Cl₂: hexano, 1: 1) para proporcionar **19** ligeramente impuro que se volvió a purificar en una segunda columna (CH₂Cl₂: hexano, 4: 1) para proporcionar **19** puro (1,05 g, 69%). TLC: R_f=0,29 (hexano: acetato de etilo, 10: 1). $[\alpha]_D^{20} = -3,8$ (c 1,0, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ =0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,26 (br s, 36 H), 1,55 (m, 4 H), 2,60 (dd, J=15,5, 5,5 Hz, 1 H), 2,74 (dd, J=15,5, 7,5 Hz, 1 H), 3,46 (m, 2 H), 3,76 (m, 1 H), 5,30 (d, J=16,5 Hz, 1 H), 5,39 (d, J=16,5 Hz, 1 H), 7,49 (m, 1 H), 7,61 (m, 1 H), 7,91 (m, 2 H).

10 **Ejemplo 16** Preparación del compuesto **20**

Utilizando el mismo procedimiento descrito para la síntesis del compuesto **14**, se preparó el compuesto **20** a partir de la reacción del compuesto **19** (1,02 g; 1,922 mmoles) con polvo de cinc (1,12 g) en ácido acético (12,0 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, se eliminó el Zn y se evaporaron a sequedad los filtrados combinados. El residuo se aplicó sobre columna de gel de sílice ultrarrápida para purificación, inicialmente con CH₂Cl₂: hexano (8: 1) para eliminar todas las impurezas con alto valor de R_f y después acetato de etilo: hexano (1: 5) para eluir el producto **20** deseado con 88% de rendimiento (741,5 mg). TLC: R_f=0,20 (diclorometano: hexano, 8: 1). $[\alpha]_D^{20} = -4,8$ (c 1,0, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ =0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,27 (br s, 36 H), 1,56 (m, 4 H), 2,54 (d, J=6,0 Hz, 2 H), 3,50 (m, 2 H), 3,69 (m, 1 H).

25 **Ejemplo 17** Preparación del compuesto **21**

Se disolvió (-)-DIP-Cl (9,6 g, 30 mmoles) en éter dietílico anhidro (35 ml, destilado sobre Na/benzofenona) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió a -40°C (nieve carbónica / acetona). Se añadió bromuro de alil-magnesio (Aldrich, solución 1,0 M en éter dietílico se consideró como solución 0,9 M y por lo tanto 27,7 ml, 25 mmoles) lentamente a la solución enfriada anteriormente. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se continuó agitando durante 30 min. (total agitado 1,0 h). Mientras tanto se disolvía dodecanal (4,41 ml, 3,68 g, 20 mmoles) en éter dietílico anhidro y se enfriaba a 0°C utilizando un baño con hielo.

La mezcla de reacción anterior que se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. se enfrió a -78°C y la solución de dodecanal enfriada se añadió lentamente en 15 min. y se continuó la agitación a -78°C durante 1,0 h. cuando la TLC (acetato de etilo: hexano, 1: 15) mostraba casi la terminación de la reacción, se retiró el baño frío y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 5 a 10 min. La solución acuosa saturada de acetato sódico (5,0 ml) y peróxido de hidrógeno (50%, 5,0 ml) se añadieron lenta y minuciosamente y se agitó durante 5 min. La adición de la solución de acetato sódico y peróxido de hidrógeno se repitió a intervalos de 5 min., se añadieron en total 20 ml de acetato sódico y 15 ml de peróxido de hidrógeno. Durante la adición de estos reactivos, la mezcla de reacción se calentó más y debió tenerse cuidado que la temperatura no aumentase demasiado (si es necesario utilizar un baño para enfriar). La mezcla resultante se extrajo con éter dietílico (3 x 20 ml). Los extractos etéreos combinados se lavaron con agua y salmuera (1 x 25 ml) se secaron sobre sulfato sódico anhidro anhidro (60 g) y se concentraron para obtener un compuesto aceitoso incoloro. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando 10% de hexano en acetato de etilo proporcionó **21** puro como aceite viscoso incoloro con 60% de rendimiento. TLC: R_f=0,26 (hexano: acetato de etilo, 15: 1). $[\alpha]_D^{20} = +4,9$ (c 0,57, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ =0,88 (t, J=6,5 Hz, 3 H, CH₃), 1,28 (br s, 18 H), 1,46 (m, 2 H), 2,09-2,18 (m, 1 H), 2,30 (m, 1 H), 3,63 (m, 1 H, OH), 5,13 (m, 2 H), 5,83 (m, 1 H).

50 **Ejemplo 18** Preparación del compuesto **22**

El compuesto **20** (250 mg, 0,61 mmoles) y el **21** (272 mg, 1,21 mmoles) se disolvieron en diclorometano anhidro (5 ml). Se añadieron DCC (377 mg, 1,83 mmoles) y DMAP (15,0 mg, 0,12 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se enfrió la reacción añadiendo agua (0,3 ml) y metanol (5 ml) y se agitó la mezcla durante 10 min. La solución se concentró a sequedad al vacío por destilación junto con cloroformo (10 ml) dos veces y el residuo se trató con hexano (10 ml). Se filtró el sólido y se concentró el filtrado al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (hexano: acetato de etilo, 30: 1) para proporcionar **22** (302 mg, 81%). TLC: R_f=0,3 (hexano: acetato de etilo, 3: 1). $[\alpha]_D^{20} = +8,2$ (c 1,0, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ =0,89 (t, J=6,5 Hz, 9 H, 3 CH₃), 1,26 (br s, 54 H), 1,52 (m, 6 H), 2,31 (m, 2 H), 2,36 (dd, J=15,5, 6,5 Hz, 1 H), 3,43 (m, 2 H), 3,68 (m, 1 H), 4,93 (m, 1H), 5,07 (m, 2 H), 5,75 (m, 1 H). ES-MS calc. para C₄₁H₈₀O₃: 620,6; Encontrado: 621,9 (M+H+).

Ejemplo 19 Preparación del compuesto 23

El compuesto 22 (280 mg, 0,45 mmoles) se disolvió en hexano (10 ml) y ácido acético (2 ml) y se añadió Aliquat (3 gotas). Se enfrió la mezcla a 0°C y se añadió solución de permanganato potásico (980 mg em 15 ml de agua). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 6 h. Cuando terminó la reacción, se añadieron sulfito sódico (2,5 g) y solución de cloruro de hidrógeno (6 N, 5 ml). El sólido marrón oscuro desapareció y la mezcla se volvió solución transparente. Se extrajo la mezcla con hexano (30 ml x 3) y con diclorometano (30 ml x 3). Tanto los extractos de hexano como los de diclorometano contenían producto y se lavaron, por separado, con solución saturada de cloruro sódico (20 ml), se secaron con sulfato sódico y se concentraron al vacío. El residuo combinado se purificó por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (acetato de etilo: hexano, 1: 3) para proporcionar **23** (176 mg, 61%). TLC: $R_f=0,30$ (hexano: acetato de etilo, 1: 3). $[\alpha]_D^{20} = -2,4$ (c 0,5, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,89$ (t, $J=6,5$ Hz, 9 H, 3 CH_3), 1,27 (br s, 54 H), 1,48 - 1,65 (m, 6 H), 2,38 (dd, $J=15,0$, 6,0 Hz, 1 H), 2,53 (dd, $J=15,0$, 7,0 Hz, 1 H), 2,57 (dd, $J=15,5$, 5,5 Hz, 1 H), 2,66 (dd, $J=15,5$, 7,0 Hz, 1 H), 3,42 (m, 2 H), 3,67 (m, 1 H), 5,22 (m, 1 H). ES-MS calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{78}\text{O}_5$: 638,6; Encontrado: 639,3 (M+H+).

Ejemplo 20 Preparación del compuesto 26

(1) Hidrocloruro de D-glucosamina (195 g, 0,88 mmoles) y bicarbonato sódico (152 g, 1,89 mmoles) se disolvieron en agua (2 l) en un recipiente de plástico con agitación mecánica. A esta mezcla se añadió lentamente en 35 min. cloruro de tricloroetoxi-carbonilo (180 g, 0,85 mmoles). Tras el fin de la adición, se continuó la adición durante 1,5 h. La mezcla de reacción se acidificó a continuación con solución al 10% de HCl (300 ml). Se filtró el sólido y se lavó con agua (800 ml) y éter dietílico (500 ml), se secó a 50°C al vacío para proporcionar la D-glucosamina protegida por N-Troc (275 g, 91%) que se utilizó directamente para la siguiente etapa de la reacción.

(2) Compuesto 24: Se barboteó ácido clorhídrico (g) en alcohol bencílico (30 ml, 282 mmoles) durante 12 min. a 0°C para proporcionar aproximadamente 1,45 g de HCl. Este alcohol bencílico y la solución ácida se añadieron a continuación a un matraz de fondo redondo que contenía D-glucosamina protegida por N-Troc (10,0 g, 28,2 mmoles). La mezcla como suspensión se calentó a 100°C durante 15 min. y durante el calentamiento, la suspensión gradualmente se convirtió en una solución transparente. Tras el enfriamiento de la reacción a temperatura ambiente durante 30 min. se trató con hexano (200 ml) y se agitó intensamente. Se descartó la capa orgánica superior y se conservó el sólido lechoso en el fondo del matraz. Se repitió dos veces este tratamiento en el sólido lechoso con diferentes disolventes [(acetato de etilo: hexano (1: 4, 50 ml) y acetato de etilo (50 ml)]. El tratamiento adicional del sólido lechoso con hexano (200 ml) proporcionó **24** (8,72 g, 70%) como producto en bruto que estaba exento de alcohol bencílico y se utilizó en la etapa siguiente de la reacción.

(3) Compuesto 26: El compuesto **24** (3,14 g, 7,06 mmoles) se puso en suspensión en acetonitrilo anhidro (50 ml). Se añadieron dimetilacetal benzaldehído (3,21 ml, 21,38 mmoles) y ácido p-toluensulfónico (50 mg, 0,26 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, y se añadió trietilamina (1 ml) para enfriar la reacción. Se eliminó a continuación el disolvente y se purificó el residuo por recristalización en acetato de etilo y hexano para proporcionar **26** (3,63 g, 96%).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 2,52$ (s, 1 H, OH), 3,59 (m, 1 H), 3,77 (dd, $J=10,0$, 10,0 Hz, 1 H), 3,85 - 4,00 (m, 3 H), 4,25 (dd, $J=11,0$, 5,5 Hz, 1 H), 4,55 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,60 - 4,84 (m, 3 H), 4,99 (d, $J=3,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,30 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, NH), 5,57 (s, 1 H), 7,25-7,50 (m, 10 H, Ar-H).

Ejemplo 21 Preparación del compuesto 27

Una mezcla de **24** en bruto (1,35 g, 3,04 mmoles) y CaSO_4 anhidro (0,6 g) en CH_2Cl_2 (16 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A esta suspensión, se añadió 2,2-dimetoxi-propano (1,2 ml, 9,12 mmoles) y seguido de una adición de ácido p-toluensulfónico monohidratado (62 mg, 0,30 mmoles). La mezcla resultante se dejó reaccionar a continuación durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se neutralizó a continuación con NaHCO_3 sólido y se filtró el sólido a continuación y se lavó con CH_2Cl_2 . El residuo procedente de la eliminación del disolvente y del reactivo se purificó en una columna de gel de sílice ultrarrápida (acetato de etilo: hexano, 1: 2) para proporcionar el compuesto **27** como espuma incolora (1,19 g, 81%). TLC: $R_f=0,67$ (hexano: acetato de etilo, 3: 2). $[\alpha]_D^{20} = +104,2$ (c 1,0, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,45$ (s, 3 H, CH_3), 1,55 (s, 3 H, CH_3), 3,59 - 3,88 (m, 5 H), 3,93 (ddd, $J=9,5$, 9,5, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,49 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,65 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,72 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,80 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,93 (d, $J=3,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,32 (d, $J=9,5$ Hz, 1 H, NH), 7,20 (m, 5 H, Ar-H).

Ejemplo 22 Preparación del compuesto 28

(1) Compuesto 25: Se barboteó ácido clorhídrico (g) en alcohol alílico (190 ml) a 0°C durante 30 min. para proporcionar aproximadamente 9,5 g de HCl. Este alcohol alílico y la solución de HCl se transfirieron a un matraz de fondo redondo

que contenía D-glucosamina protegida por N-Troc (véase el ejemplo 20 / (1), 69 g; 194,58 mmoles). Toda la mezcla aparecía como suspensión y se convirtió en una solución transparente después de 5 minutos de inmersión en un baño a 104°C. Se continuó el calentamiento durante 35 minutos a la misma temperatura. Después de retirar la mezcla de reacción del baño y dejarle enfriar a temperatura ambiente, se eliminó a continuación el alcohol alílico por el evaporador. Se llevó a cabo además la evaporación conjunta con tolueno para eliminar cualquier humedad para proporcionar **25** en bruto en forma de copos parduzcos, que se utilizó directamente en la siguiente etapa de reacción. TLC: $R_f=0,64$ (10% de metanol en diclorometano).

(2) Compuesto **28**: El compuesto **25** en bruto anterior se disolvió a continuación en CH_3CN (600 ml) y se trató con benzaldehído acetato de dimetilo (87 ml) y ácido p-toluensulfónico monohidratado (490 mg, 2,40 mmoles) a temperatura ambiente durante 6,5 horas. La mezcla de reacción se trató a continuación con NaHCO_3 sólido (12 g) para obtener pH alcalino. Se filtró el sólido y se lavó con acetona y los filtrados combinados se concentraron a sequedad. El producto **28** deseado, como sólido incoloro (45,74 g, 49%), se obtuvo a partir de recristalización en etanol (275 ml). TLC: $R_f=0,22$ (hexano: acetato de etilo, 3: 1). $[\alpha]_D^{20} = +69,3$ (c 1,0, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ =2,50 (br s, 1 H, OH), 3,56 (dd, $J=9,5, 9,5$ Hz, 1 H), 3,75 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H), 3,82 - 4,04 (m, 4 H), 4,18 - 4,30 (m, 2 H), 4,68 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,82 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,92 (d, $J=3,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,25 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, NH), 5,28 - 5,35 (m, 2 H), 5,55 (s, 1 H), 5,89 (m, 1 H), 7,38 (m, 3 H), 7,50 (m, 2 H).

20 Ejemplo 23 Preparación del compuesto 29

Ácido tetradecanoico (1,29 g, 5,55 mmoles) y **26** (2,00 g, 3,76 mmoles) se disolvieron en diclorometano anhidro (50 ml) bajo nitrógeno. A la solución se añadieron diciclohexilcarbodiimida (DCC, 1,17 g, 5,66 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,23 g, 1,89 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y el sólido se filtró y se lavó con diclorometano (4 ml). El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 6: 1) para proporcionar **29** (2,53 g, 91%). TLC: $R_f=0,40$ (hexano: acetato de etilo, 6: 1). $[\alpha]_D^{22} = +44,7$ (c 0,57, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (t, $J=6,5$ Hz, 3 H, CH_3), 1,25 (m, 20 H), 1,57 (m, 2 H, CH_2), 2,30 (m, 2 H, CH_2), 3,72 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-4), 3,79 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-6), 3,97 (ddd, $J=10,0, 10,0, 5,5$ Hz, 1 H, H-5), 4,05 (ddd, $J=10,0, 10,0, 3,5$ Hz, 1 H, H-2), 4,21 (dd, $J=10,0, 5,5$ Hz, 1 H, H-6'), 4,54 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CH/Ph), 4,66, 4,71 (2d, $J=12,0$ Hz, cada 1 H, $\text{Cl}_3\text{CCH}_2\text{O}$), 4,76 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CH/Ph), 4,97 (d, $J=3,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,35 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, NH), 5,41 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-3), 5,53 (s, 1 H, CH/Ph), 7,30 - 7,45 (m, 10 H, Ar-H). Anal. calc. para $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{Cl}_3\text{NO}_8$ (743,16): C, 59,80; H, 6,78; N, 1,88. Encontrado: C, 60,03; H, 6,63; N, 1,97.

35 Ejemplo 24 Preparación del compuesto 30

El compuesto **29** (2,49 g, 3,35 mmoles) se convirtió en **30** mediante cinc activado (6,56 g, 100,9 mmoles) y ácido acético al 80% en acetato de etilo (150 ml) tal como se describió para la preparación de **13**. La reacción se completó en 6 horas y se obtuvo un residuo de preparación habitual. Se liofilizó a continuación en dioxano para proporcionar el compuesto de la amina libre (1,83 g, 96%). TLC: $R_f= 0,41$ (5% de metanol en diclorometano).

El compuesto amino anterior (900 mg, 1,59 mmoles) se redisolvió en CH_2Cl_2 -DMF anhidro (4:1, 100 ml). A esta solución de amina y bajo atmósfera de nitrógeno, se añadieron el compuesto **5** (1,15 g, 2,46 mmoles) y DCC (528 mg, 2,46 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 48 h. La eliminación del disolvente proporcionó el residuo que se purificó por cromatografía ultrarrápida repetida (inicialmente con 3 al 5% de acetona en cloroformo y posteriormente con 8 al 10% de acetonitrilo en diclorometano) para proporcionar **30** (1,08 g, 62%). TLC: $R_f= 0,42$ (5% de metanol en diclorometano). $[\alpha]_D^{22} = +31,0$ (c 0,29, cloroformo).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0,86 (t, $J=6,5$ Hz, 9 H, 3 CH_3), 1,23 (m, 52 H, 26 CH_2), 1,45 - 1,65 (m, 6 H, 3 CH_2), 2,18 - 2,35 (m, 5 H, 2 CH_2 , Asp- β -H), 2,70 (dd, $J=15,0, 3,5$ Hz, 1 H, Asp- β' -H), 3,16 (m, 2 H, NCH_2), 3,68 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-4), 3,75 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-6), 3,93 (ddd, $J=10,0, 10,0, 3,5$ Hz, 1 H, H-5), 4,20 (dd, $J=10,0, 3,5$ Hz, 1 H, H-6'), 4,30 (ddd, $J=10,0, 10,0, 3,5$ Hz, 1 H, H-2), 4,58, 4,70 (2 d, $J=11,0$ Hz, cada 1 H, CH_2Ph), 4,60 (m, 1 H, Asp- α -H), 4,97 (d, $J=3,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,32 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-3), 5,50 (s, 1 H, CH/Ph), 6,13 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, NH), 6,97 (t, $J=5,0$ Hz, 1 H, NH), 7,25 - 7,44 (m, 11 H, NH, Ar-H), ES-MS calculado para $\text{C}_{61}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_9$: 1017,7; Encontrado: 1019,3 (M+H).

60 Ejemplo 25 Preparación del compuesto 31

A una solución de **30** (150 mg, 0,15 mmoles) en THF- CHCl_3 anhidro (6: 1, 24 ml), tamices moleculares (4 Å, 0,5 g) se añadieron y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió cianoborohidruro sódico (188 mg, 3,00 mmoles) y la mezcla se enfrió a 0°C cuando se añadió gota a gota lentamente HCl (g)/ Et_2O hasta que no se produjo nada de gas. Se añadió más cianoborohidruro sódico (400 mg), seguido de adición lenta de HCl (g)/ Et_2O hasta que no se formó nada de gas. La mezcla se vertió en solución saturada de bicarbonato sódico (50 ml) y se extrajo con

acetato de etilo (100 ml x 3). Se lavó la capa orgánica con solución saturada de cloruro sódico (15 ml), secado sobre sulfato sódico concentrado. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (1 a 2% de metanol en diclorometano) para proporcionar **31** (130 mg, 86%). TLC: $R_f = 0,46$ (diclorometano:metanol, 95: 3, desarrollada dos veces). $[\alpha]_D^{22} = +30,7$ (c 0,46, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, J=6,5 Hz, 9 H, 3 CH₃), 1,25 (br, s, 52 H, 26 CH₂), 1,45 (m, 2 H, CH₂), 1,60 (m, 4 H, 2 CH₂), 2,21 (m, 2 H, CH₂), 2,30 (m, 2 H, CH₂), 2,35 (dd, J=15,0, 7,0 Hz, 1 H, Asp-β-H), 2,71 (dd, J=15,0, 3,5 Hz, 1 H, Asp-β'-H), 2,72 (d, J=3,0 Hz, 1 H, OH), 3,17 (m, 2 H, NCH₂), 3,65 - 3,87 (m, 4 H, H-4, H-5, 2 H-6), 4,25 (ddd, J=10,5, 9,5, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,54 - 4,73 (m, 5 H, 2 CH₂Ph, Asp-α-H), 4,96 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,13 (dd, J=10,5, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 6,13 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 7,02 (t, J=5,5 Hz, 1 H, NH), 7,28 - 7,40 (m, 11 H, NH, Ar-H). Anal. calc. para C₆₁H₁₀₁N₃O₉: C, 71,80; H, 9,98; N, 4,12. Encontrado: C, 71,66; H, 10,39; N, 4,48, ES-MS calculado 1019,8; Encontrado 1021,1 (M+H).

Ejemplo 26 Preparación del compuesto **32**

Al compuesto **31** (125 mg, 0,123 mmoles) en diclorometano anhidro (10 ml) se añadieron 1 *H*-tetrazol (26 mg, 0,37 mmoles) y dibencil-disopropilfosforamidita (86,3 mg, 0,084 ml, 0,25 mmoles). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. y a continuación se enfrió a 0°C. Se añadió ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-ACPB, 55%, 136 mg, 0,44 mmoles) y la mezcla se agitó durante 30 min. a 0°C. La mezcla se vertió a continuación en bisulfito sódico al 10% (20 ml) y se extrajo con diclorometano (20 ml x 3). Se lavó la capa orgánica con solución saturada de bicarbonato sódico (10 ml), se secó con sulfato sódico y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida repetida (hexano:acetona, 6: 1 y 4: 1; tolueno:acetona, 10: 1 y 8: 1) para proporcionar **32** (104 mg, 66%). TLC: $R_f = 0,20$ (tolueno:acetona, 8: 1). $[\alpha]_D^{22} = +23,7$ (c 0,59, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (m, 9 H, 3 CH₃), 1,25 (m, 52 H, 26 CH₂), 1,44 (m, 2 H, CH₂), 1,63 (m, 2 H, CH₂), 1,74 (m, 2 H, CH₂), 2,14 (t, J=7,0 Hz, 2 H, CH₂), 2,22 (m, 2 H, CH₂), 2,31 (dd, J=15,0, 6,5 Hz, 1 H, Asp-β-H), 2,72 (dd, J=15,0, 3,5 Hz, 1 H, Asp-β'-H), 3,17 (m, 2 H, NCH₂), 3,68 (m, 2 H, 2 H-6), 3,95 (m, 1 H, H-5), 4,28 (ddd, J=10,5, 9,5, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,47 (d, J=12,0, 1 H, CHHPh), 4,55 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,60 (m, 3 H, H-4, Asp-α-H, CHHPh), 4,72 (d, 1 H, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,90 (m, 4 H, 2 CH₂Ph), 4,99 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,34 (dd, J=10,5, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 6,13 (d, J=9,5 Hz, 1 H, NH), 7,03 (t, J=5,5 Hz, 1 H, NH), 7,28 - 7,42 (m, 21 H, NH, Ar-H). Anal. calc. para C₇₅H₁₁₄N₃O₁₂P (1280,72): C, 70,34; H, 8,97; N, 3,28; encontrado: C, 70,54; H, 8,90; N, 3,26.

Ejemplo 27 Preparación del compuesto **33**

A la solución de **32** (30 mg, 0,023 mmoles) en una mezcla de metanol:acetato de etilo:ácido acético (2: 1: 0,3, 80 ml), se añadió paladio sobre carbón (5%, 50 mg). La mezcla se agitó bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 24 h. Se filtró el sólido y se concentró el filtrado. Se liofilizó el residuo en dioxano:cloroformo (10: 1, 30 ml) para proporcionar **33** (17 mg, 79%). TLC: $R_f = 0,27$ (cloroformo: metanol: agua, 2: 1: 0,1). $[\alpha]_D^{22} = +310,8$ (aprox. 0,074, cloroformo:metanol, 4:1).

Para el isómero α:

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃-CD₃OD, 1: 1): δ 0,89 (t, J=7,0 Hz, 9 H, 3 CH₃), 1,28 (br, s, 52 H, 26 CH₂), 1,49 (m, 2 H, CH₂), 1,60 (m, 4 H, 2 CH₂), 2,23 (t, J=7,5 Hz, 2 H, CH₂), 2,35 (m, 2 H, CH₂), 2,49 (dd, J=14,0, 5,0 Hz, 1 H, Asp-β-H), 2,61 (dd, J=14,0, 6,0 Hz, 1 H, Asp-β'-H), 3,17 (m, 2 H, NCH₂), 3,72 (m, 2 H, 2 H-6), 3,96 (m, 1 H, H-5), 4,12 (dd, J=10,5, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,28 (m, 1 H, H-4), 4,65 (m, 1 H, Asp-α-H), 5,10 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,32 (dd, J=10,5, 9,5 Hz, 1 H, H-3), ³¹P RMN (202,3 MHz, DMSO-d₆): δ -0,02 ppm, ES-MS calculado para C₄₇H₅₀N₃O₁₂P: 919,6. Encontrado 921,1 (M+H).

Ejemplo 28 Preparación del compuesto **35**

A una solución de **34**³¹ (1,0 g, 3,50 mmoles) en piridina anhidra (10 ml), se añadieron cloruro de trifenilmetilo (836 mg, 3,0 mmoles) y DMAP (30,5 mg, 0,25 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Se añadieron más cloruro de tritilo (418 mg, 1,25 mmoles) y ADM. (30,5 mg, 0,25 mmoles) y la mezcla se agitó a 40°C durante 4 h. El disolvente se eliminó por destilación conjunta con tolueno y se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (hexano:acetato de etilo, 1: 1) para proporcionar **35** (1,42 g, 88%). TLC: $R_f = 0,36$ (hexano: acetato de etilo, 1:1). $[\alpha]_D^{22} = -48,3$ (c 0,6, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 2,70 (br, s, 1 H, OH), 3,00 (br s, 1 H, OH), 3,44 - 3,53 (m, 2 H, 2 H-6), 3,59 (m, 1 H, H-5), 3,65 (dd, J=9,5, 9,0 Hz, 1 H, H-4), 4,21 (dd, J=9,5, 8,0 Hz, 1 H, H-2), 4,55, 4,95 (2 d, J=12,0 Hz, cada 1 H, CH₂Ph), 5,23 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1), 7,10-7,80 (m, 24 H, Ar-H). Anal. calc. para C₄₀H₃₅NO₇·1,3 H₂O (641,72): C, 72,23; H, 5,70; N, 2,10. Encontrado: C, 72,24; H, 5,92; N, 1,83.

Ejemplo 29 Preparación del compuesto **36**

Se añadieron hidruro sódico (120 mg, 5,02 mmoles) y bromuro de bencilo (0,86 g, 0,60 ml, 5,02 mmoles) a DMF anhidra (10 ml). A esta solución, se añadió gota a gota en 3 minutos una solución de **35** (1,34 g, 2,09 mmoles) en DMF (8 ml).
 5 Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. y se trató más con una cantidad adicional de bromuro de bencilo (0,43 g, 0,30 ml, 2,51 mmoles) e hidruro sódico (60 mg, 2,51 mmoles). La mezcla de reacción se dejó prolongar durante otras 2 horas. Se añadió metanol (2 ml) y la mezcla se agitó durante 10 minutos más. La reacción se vertió a continuación en agua con hielo (100 ml) y se extrajo con éter dietílico (60 ml x 3). Se lavaron las capas de éter combinadas con agua con hielo (15 ml x 3), se secaron sol sulfato sódico y se concentraron. Se purificó el residuo por
 10 cromatografía ultrarrápida (hexano: acetato de etilo, 5: 1) para proporcionar **36** (1,55 g, 90%). TLC: $R_f = 0,60$ (hexano: acetato de etilo, 3: 1). $[\alpha]_D^{22} = +5,5$ (c 0,8, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 3,32 (dd, $J=10,0$, 4,5 Hz, 1 H, H-6a), 3,60 (m, 1 H, H-5), 3,68 (dd, $J=10,0$, 1,8 Hz, 1 H, H-6b), 4,03 (dd, $J=9,5$, 8,2 Hz, 1 H, H-2), 4,33 (m, 2 H, H-3, H-4), 4,43 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,47 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,61 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,72 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,80 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,94 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 5,20 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H, H-1), 6,84 - 7,80 (m, 34 H, Ar-H). Anal. calc. para $\text{C}_{54}\text{H}_{47}\text{NO}_7 \cdot 1,3 \text{H}_2\text{O}$ (821,97): C, 76,72; H, 5,91; N, 1,66. Encontrado: C, 76,56; H, 6,13; N, 1,52.

Ejemplo 30 Preparación del compuesto **37**

La solución de **36** (1,42 g, 1,73 mmoles) en ácido acético-agua (4: 1, 60 ml) se agitó a 110°C durante 1 h. El disolvente se eliminó por destilación conjunta con etileno y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexano: acetato de etilo, 2: 1) para proporcionar **37** (700 mg, 70%). TLC: $R_f = 0,31$ (hexano: acetato de etilo, 2: 1). $[\alpha]_D^{22} = +16,0$ (c 0,25, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1,90 (dd, $J=6,5$, 6,5 Hz, 1 H, OH), 3,54 (m, 1 H, H-5), 3,73 (dd, $J=9,5$, 9,0 Hz, 1 H, H-4), 3,78 (m, 1 H, H-6a), 3,93 (m, 1 H, H-6b), 4,19 (dd, $J=10,0$, 8,5 Hz, 1 H, H-2), 4,36 (dd, $J=10,0$, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 4,43 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,50 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,73 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,76 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,79 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,90 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 5,20 (d, $J=8,5$ Hz, 1 H, H-1), 6,80- 7,80 (m, 19 H, Ar-H). Anal. calc. para $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{NO}_7 \cdot 0,8 \text{H}_2\text{O}$ (579,65): C, 70,76; H, 5,87; N, 2,35. Encontrado: C, 70,74; H, 6,14; N, 2,20.

Ejemplo 31 Preparación del compuesto **38**

A la solución de **37** (0,60 g, 1,04 mmoles) en etanol al 95% (40 ml) se añadió monohidrato de hidrazina (2,06 g, 2,0 ml, 41,2 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. y a continuación se eliminó el disolvente al vacío. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (1 a 2% de metanol en diclorometano) para proporcionar **38** (450 mg, 97%). TLC: $R_f = 0,20$ (2% de metanol en diclorometano). $[\alpha]_D^{22} = -9,4$ (c 0,35, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1,75 (br, s, 3 H, OH, NH_2), 2,92 (dd, $J=9,0$, 8,0 Hz, 1 H, H-2), 3,43 (m, 1 H, H-5), 3,49 (dd, $J=9,5$, 9,5 Hz, 1 H, H-4), 3,66 (dd, $J=9,5$, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 3,76 (dd, $J=12,0$, 5,0 Hz, 1 H, H-6a), 3,91 (dd, $J=12,0$, 2,5 Hz, 1 H, H-6b), 4,39 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 4,63 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,70 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,74 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,86 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,88 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,99 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 7,35 (m, 15 H, Ar-H). Anal. calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{NO}_5$ (449,55): C, 72,14; H, 6,95; N, 3,15. Encontrado: C, 72,34; H, 7,15; N, 3,12.

Ejemplo 32 Preparación del compuesto **39**

El compuesto **38** (400 mg, 0,89 mmoles), **15** (401 mg, 0,83 mmoles) y DCC (275 mg, 1,34 mmoles) se disolvieron en diclorometano anhidro (10 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se filtró el sólido y se lavó con diclorometano (4 ml). Se concentró el filtrado y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (0,5 a 1% de metanol en diclorometano) para proporcionar **39** (576 mg, 76%) TLC: $R_f = 0,30$ (2% de metanol en diclorometano). $[\alpha]_D^{22} = -2,6$ (c 0,57, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,25 (br, s, 42 H, 21 CH_2), 1,55 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,14 (m, 2 H, CH_2), 2,28 (dd, $J=15,0$, 6,0 Hz, 1 H, CHH), 2,36 (dd, $J=15,0$, 6,0 Hz, 1 H, CHH), 3,48 (m, 2 H, H-2, H-5), 3,59 (dd, $J=9,0$, 9,0 Hz, 1 H, H-4), 3,71 (dd, $J=11,5$, 4,5 Hz, 1 H, H-6a), 3,87 (dd, $J=11,5$, 2,5 Hz, 1 H, H-6b), 4,10 (dd, $J=10,0$, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 4,60 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,65 (d, $J=11,5$ Hz, 2 H, 2 CHHPh), 4,80 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,81 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,83 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,95 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 5,04 (m, 1 H, lipid-3-H), 5,90 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, NH), 7,35 (m, 15 H, Ar-H). Anal. calc. para $\text{C}_{57}\text{H}_{87}\text{NO}_8 \cdot 0,3 \text{H}_2\text{O}$ (914,32): C, 74,44; H, 9,60; N, 1,52. Encontrado: C, 74,38; H, 9,85; N, 1,56.

Ejemplo 33 Preparación del compuesto **40**

A la solución del compuesto **38** (410 mg, 0,913 mmoles) en diclorometano anhidro (30 ml), se añadieron el compuesto **14** (623 mg, 1,37 mmoles) y DCC (564 mg, 2,74 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas.
 5 Se filtró el sólido y se lavó con diclorometano (4 ml). Se concentró el filtrado y se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice (0,5 a 1% de metanol en diclorometano) para proporcionar **40** (664 mg, 82%). TLC: $R_f = 0,33$ (2% de metanol al 1% en diclorometano). $[\alpha]_D^{22} = -3,2$ (c 0,6, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (t, $J=7,0$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,25 (m, 38 H, 19 CH_2), 1,55 (m, 4 H, 2 CH_2), 1,89 (dd, $J=7,0, 6,0$ Hz, 1 H, OH), 2,15 (m, 2 H, CH_2), 2,27 (dd, $J=15,0, 5,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,36 (dd, $J=15,0, 6,0$ Hz, 1 H, CHH), 3,46 (m, 1 H, H-5), 3,52 (m, 1 H, H-4), 3,59 (dd, $J=10,0, 9,0$ Hz, 1 H, H-3), 3,70 (m, 1 H, H-6a), 3,86 (m, 1 H, H-6b), 4,10 (dd, $J=10,0, 8,0$ Hz, 1 H, H-2), 4,60 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,64 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,65 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,81 (d, $J=11,5$ Hz, 2 H, 2 CHHPh), 4,83 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,95 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 5,04 (m, 1 H, lipid-3-H), 5,92 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 15 H, Ar-H). Anal. calc. para: $\text{C}_{55}\text{H}_{83}\text{NO}_8$ (886,26): C, 74,47; H, 9,44; N, 1,58. Encontrado: C, 74,25; H, 9,44; N, 1,64.

Ejemplo 34 Preparación del compuesto **41**

El compuesto **28** (312 mg, 0,65 mmoles), **14** (200 mg, 0,44 mmoles), DCC (136 mg, 0,66 mmoles) y DMAP (27 mg, 0,22 mmoles) se disolvieron en diclorometano anhidro (5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Se filtró el sólido y se lavó con acetato de etilo (5 ml). Se concentró el filtrado y se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (hexano:acetato de etilo, 8: 1) para proporcionar **41** (398 mg, 98%). TLC: $R_f = 0,69$ (hexano:acetato de etilo, 3:1). $[\alpha]_D^{22} = +32,0$ (c 0,5, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,25 (m, 38 H, 19 CH_2), 1,52 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,16 (t, $J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 2,50 (dd, $J=16,0, 6,0$ Hz, 1 H, CHH), 2,63 (dd, $J=16,0, 6,0$ Hz, 1 H, CHH), 3,71 (dd, $J=9,5, 9,5$ Hz, 1H, H-4), 3,78 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-6a), 3,94 (m, 1 H, H-5), 3,98 - 4,08 (m, 2 H, H-2, CHHCH=CH₂), 4,21 (m, 1 H, CHHCH=CH₂), 4,29 (dd, $J=10,0, 5,0$ Hz, 1 H, H-6b), 4,69, 4,76 (2 d, $J=12,0$ Hz, cada 1 H, Troc-CH₂), 4,94 (d, $J=3,6$ Hz, 1 H, H-1), 5,16 (m, 1 H, lipid-3-H), 5,30 (m, 2 H, CH=CH₂), 5,39 (dd, $J=9,5, 9,5$ Hz, 1 H, H-3), 5,42 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, NH), 5,53 (s, 1 H, CHPh), 5,90 (m, 1 H, CH=CH₂), 7,30 - 7,35 (m, 15 H, Ar-H). Anal. calc. para $\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{Cl}_3\text{NO}_{10}$ (919,46): C, 61,40; H, 8,11; N, 1,52. Encontrado: C, 61,40; H, 8,19; N, 1,58.

Ejemplo 35 Preparación del compuesto **42**

El compuesto hexafluorofosfato de [bis(metilidifenilfosfina)](1,5-ciclooctadieno) iridio (I) (37 mg, 0,044 mmoles) se puso en suspensión en THF anhidro (5 ml) y se barboteó gas hidrógeno durante 5 min. para proporcionar una solución amarillenta, que se añadió a la solución de **41** (400 mg, 0,44 mmoles) en THF anhidro (5 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron a continuación agua (0,5 ml) y N-bromosuccinimida (NBS, 117 mg, 0,66 mmoles) y la reacción se agitó durante más de 1 hora. El resto obtenido en la eliminación del disolvente se disolvió en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con solución de saturada de bicarbonato sódico (20 ml x 2). Se secaron las capas orgánicas combinadas con sulfato sódico y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexano: acetato de etilo, 4:1 y 3:1) para proporcionar **42** (314 mg, 82%) como mezcla anomérica en una proporción de $\alpha/\beta=4:1$. TLC: $R_f = 0,36$ (hexano: acetato de etilo 3: 1). $[\alpha]_D^{22} = -9,6$ (c 1,0, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) para el α -isómero: δ 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,24 (m, 38 H, 19 CH_2), 1,50 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,16 (t, $J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 2,49 (dd, $J=15,0, 5,0$ Hz, 1 H, CHH), 2,60 (dd, $J=15,0, 7,0$ Hz, 1 H, CHH), 3,65 (d, $J=4,0$ Hz, 1 H, OH), 3,70 (dd, $J=9,5, 9,5$ Hz, 1 H, H-4), 3,77 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-6a), 4,03 (m, 1 H, H-2), 4,17 (m, 1 H, H-5), 4,28 (dd, $J=10,0, 4,5$ Hz, 1 H, H-6b), 4,67, 4,75 (2 d, $J=12,0$ Hz, cada 1 H, Troc-CH₂), 5,15 (m, 1 H, lipid-3-H), 5,35 (dd, $J=4,0, 4,0$ Hz, 1 H, H-1), 5,43 (dd, $J=9,5, 9,5$ Hz, 1 H, H-3), 5,51 (s, 1 H, CHPh), 5,81 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, NH), 7,32 - 7,47 (m, 5 H, Ar-H). Anal. calc. para $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{Cl}_3\text{NO}_{10}$ (879,39): C, 60,10; H, 8,02; N, 1,59. Encontrado: C, 60,11; H, 8,09; N, 1,61.

Ejemplo 36 Preparación del compuesto **43**

A una solución de **42** (2,50 g, 2,88 mmoles) en diclorometano anhidro (30 ml), se le añadieron tricloroacetronitrilo (8,64 g, 6,0 ml, 60,0 mmoles) y DBU (10 gotas). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. y se concentró al vacío (no a sequedad). Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (hexano: acetato de etilo: trietilamina, 6:1: 1% y 5:1:15) para proporcionar **43** (2,40 g, 81%). TLC: $R_f = 0,25$ (hexano: acetato de etilo, 8:1). $[\alpha]_D^{22} = +35,0$ (c 1,0, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (t, $J=7,0$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,25 (m, 38 Hz, 19 CH_2), 1,50 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,20 (t, $J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 2,56 (dd, $J=15,5, 5,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,65 (dd, $J=15,5, 7,0$ Hz, 1 H, CHH), 3,81 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-4), 3,83 (dd, $J=10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-6a), 4,06 (m, 1 H, H-5), 4,25 (ddd, $J=10,0, 9,0, 4,0$ Hz, 1 H, H-2), 4,36 (dd, $J=10,0, 5,0$ Hz, 1 H, H-6b), 4,63, 4,78 (2 d, $J=12,0$ Hz, cada 1 H, Troc-CH₂), 5,18 (m, 1 H, lípido-3-H), 5,45 (dd, $J=10,0,$

10,0 Hz, 1 H, H-3), 5,56 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 5,58 (s, 1 H, CHPh), 6,42 (d, J=4,0 Hz, 1 H, H-1), 7,30 - 7,45 (m, 5 H, Ar-H), 8,73 (s, H, NH). Anal, calc, para $C_{46}H_{70}Cl_6N_2O_{10}$ (1023,78): C, 53,97; H, 6,89; N, 2,74. Encontrado: C, 53, 80; H, 6,77; N, 2,80.

5 Ejemplo 37 Preparación del compuesto 44

A la solución de **39** (269 mg, 0,295 mmoles) y **43** (452 mg, 0,442 mmoles) en diclorometano anhidro (6 ml) se le añadieron tamices moleculares (4 Å, 1,0 g). La mezcla se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 20 min. y a continuación se enfrió a 0°C. La solución de trifluoroboro eterato (0,15 M en CH_2Cl_2 , 0,5 ml) se añadió gota a gota y la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 30 minutos. Se trató a continuación con trietilamina (0,05 ml). Se filtró el sólido y se lavó con diclorometano. Se concentró el filtrado y se purificó el residuo por precipitación en acetato de etilo y por cromatografía en gel de sílice (1,5% de metanol en diclorometano) para proporcionar **44** (340 mg, 65%). TLC: R_f = 0,31 (2% de metanol en diclorometano). $[\alpha]_D^{22} = -13,3$ (c 0,7, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 12 H, 4 CH_3), 1,24 (m, 72 H, 36 CH_2), 1,52 (m, 8 H, 4 CH_2), 1,70 (m, 4 H, 2 CH_2), 1,94 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,16 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,27 (dd, J=15,0, 6,0 Hz, 1 H, CHH), 2,35 (dd, J=15,0, 6,5 Hz, 1 H, CHH), 2,49 (dd, J=15,5, J=5,5 Hz, 2 H, CHH), 2,59 (dd, J=15,5, 7,0 Hz, 1 H, CHH), 3,35 - 4,14 (m, 10 H, H-2, H-3, H-4, H-5, 2 H-6, H-2', H-4', H-5', H-6'a), 4,31 (dd, J=10,5, 5,5 Hz, 1 H H-6'b), 4,53 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1'), 4,57 - 4,69 (m, 5 H, $Cl_3C CH_2$, 3 CHHPh), 4,75 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,78 (d, J=11,0, 1 H, CHHPh), 4,88 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,89 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1), 5,04 (m, 1 H, lipid-3-H), 5,18 (m, 2 H, H-3', lipid-3-H), 5,48 (s, 1 H, CHPh), 7,25 - 7,45 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para $C_{101}H_{155}Cl_3N_2O_{17} \cdot 2H_2O$ (1775,70): C, 66,95; H, 8,84; N, 1,55. Encontrado: C, 66,83; H, 8,63; N, 1,66.

25 Ejemplo 38 Preparación del compuesto 45

Utilizando el mismo procedimiento descrito para la preparación de **30**, se sintetizó el compuesto **45**. Inicialmente se obtuvo la amina en bruto de **44** (224 mg, 0,126 mmoles) tratada con cinc activado (5,0 g) y 80% de ácido acético en acetato de etilo (500 ml) durante 60 horas a temperatura ambiente. Se liofilizó en dioxano para proporcionar el compuesto amina (192 mg, 95%). Después, este compuesto de amina (212 mg, 0,132 mmoles) y **13** (115 mg, 0,238 mmoles) en presencia de DFC (122 mg, 0,60 mmoles) y diclorometano anhidro (10 mg) se convirtieron en el compuesto **45** en 48 horas a temperatura ambiente. Se obtuvo **45** puro (160 mg, 60%) procedente de la purificación cromatográfica en gel de sílice (3% de acetona en cloroformo) de **45** en bruto. TLC: R_f = 0,30 (2% de metanol en diclorometano). $[\alpha]_D^{22} = -8,9$ (c 0,73, cloroformo)

¹H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,10 - 1,90 (m, 126 H, 63 CH_2), 2,14 (t, J=7,0 Hz, 4 H, 2 CH_2), 2,26 (m, 6 H, 3 CH_2), 2,50 (dd, J=15,5, 5,5 Hz, 1 H, CHH), 2,59 (dd, J=15,5, 7,5 Hz, 1 H, CHH), 3,40 - 4,14 (m, 10 H, H-2, H-3, H-4, H-5, 2 H-6, H-2', H-4', H-5', H-6'a), 4,27 (dd, J=11,0, 5,0 Hz, 1 H, H-6'b), 4,60 (d, J=11,5 Hz, 2 H, 2 CHHPh), 4,66 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,73 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1'), 4,74 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,75 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,82 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1), 4,86 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 5,05 (m, 2 H, 2 lipid-3-H), 5,15 (m, 1 H, lípido-3-H), 5,25 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3'), 5,48 (s, 1 H, CHPh), 5,94 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 6,06 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 7,25 - 7,43 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para $C_{124}H_{202}N_2O_{18} \cdot 1,5H_2O$ (2008,96): C, 73,15; H, 10,14; N, 1,37. Encontrado: C, 73,06; H, 9,95; N, 1,22.

45 Ejemplo 39 Preparación del compuesto 46

A una solución de **45** (148 mg, 0,074 mmoles) en THF anhidro (8 ml) se le añadieron tamices moleculares (4 Å, 1,0 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 20 min. Se añadió cianoborohidruro sódico (340 mg, 5,41 mmoles) y la mezcla se enfrió a 0°C. Se añadió gota a gota lentamente solución HCl (g)/ Et_2O (~3 ml) hasta que no se produjo nada de gas. La mezcla se vertió a continuación en solución saturada de bicarbonato sódico (50 ml) y se extrajo con diclorometano (100 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de cloruro sódico saturado (20 ml) y se secaron con sulfato sódico, y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución con cloroformo: acetona, de 100: 2 a 100: 5) para proporcionar **46** (79 mg, 53%). TLC: R_f = 0,16 (cloroformo: acetona, 100: 5). $[\alpha]_D^{22} = -16,0$ (c 0,2, cloroformo).

¹H RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0,89 (t, J=6,5 Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,08 - 1,94 (m, 126 H, 63 CH_2), 2,13 - 2,36 (m, 10 H, 5 CH_2), 2,51 (dd, J=15,0, 5,0 Hz, 1 H, CHH), 2,58 (dd, J=15,0, 8,0 Hz, 1 H, CHH), 3,32 (br,s, 1 H, OH), 3,43 - 3,77 (m, 8 H, H-2, H-4, H-5, 2 H-6, H-4', H-5', H-6'a), 3,86 (ddd, J=10,0, 8,5, 8,5 Hz, 1 H, H-2'), 3,92 (dd, J=9,0, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 4,08 (dd, J=11,0, 2,5 Hz, 1 H, H-6'b), 4,61 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,55 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,56 (d, J=8,5 Hz, 1 H, H-1'), 4,57 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,60 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,64 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,72 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,73 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,79 (d, J=7,5 Hz, 1 H, H-1), 4,83 (d, J=12,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,95 (dd, J=10,5, 9,0 Hz, 1 H, H-3'), 4,99 - 5,08 (m, 2 H, 2 lípido-3-H), 5,11 (m, 1 H, lípido-33-H), 5,77 (d, J=8,5 Hz, 1H, NH), 5,93 (d, J=8,5 Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para $C_{124}H_{204}N_2O_{18}$ (2010,98): C, 74,06; H, 10,22; N, 1,39. Encontrado: C, 73,74; H, 10,57; N, 1,43.

Ejemplo 40 Preparación del compuesto **47**

5 Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **32**, se obtuvo el compuesto **47** procedente de la reacción de **46** (68 mg, 0,034 mmoles) con 1*H*-tetrazol (10 mg, 0,144 mmoles), dibencil-disopropilfosforamida (33 mg, 0,032 ml, 0,096 mmoles) y ácido *m*-cloroperbenzoico (59 mg, ~55%, 0,19 mmoles) en diclorometano anhidro (3 ml). Después de la agitación durante 1 hora a 0°C, la preparación proporcionó el residuo que se purificó por cromatografía en gel de sílice repetida (gradiente de elución con 1 al 5% de acetona en cloroformo y tolueno: acetona, de 18: 1 a 12: 1) proporcionó **47** (65 mg, 85%). TLC: $R_f = 0,22$ (5% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -4,0$ (c 0,4, cloroformo).

10 $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (m, 18 H, 6 CH_3), 1,25 (m, 114 H, 57 CH_2), 1,45 - 1,70 (m, 12 H, 6 CH_2), 2,10 - 2,50 (m, 12 H, 6 CH_2), 3,52 - 3,93 (m, 9 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-2', H-5', 2 H-6'), 4,09 (br, d, $J = 11,0$ Hz, 1 H, H-6b), 4,43 (m, 3 H, CH_2Ph , H-4'), 4,56 - 4,91 (m, 12 H, 6 CH_2Ph), 4,78 (d, $J = 7,5$ Hz, 1 H, H-1'), 4,98 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,05 (m, 2 H, 2 lípido-33-H), 5,16 (m, 1 H, lípido-3 H), 5,39 (dd, $J = 10,0, 9,0$ Hz, 1 H, H-3'), 5,88 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H, NH), 6,08 (d, $J = 7,5$ Hz, 1 H, NH), 7,25 (m, 30 H, Ar-H). Anal, calc, para $\text{C}_{138}\text{H}_{217}\text{N}_2\text{O}_{21}\text{P}$ (2271,21): C, 72,98; H, 9,63; N, 1,23. Encontrado: C, 72,83; H, 9,60; N, 1,23,

Ejemplo 41 Preparación del compuesto **48**

20 A una solución de **47** (48 mg, 0,021 mmoles) en THF-HOAC (10: 1, 90 ml) se le añadió paladio sobre carbón (5%, 70 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno durante 24 h. Se filtró el sólido y se concentró el filtrado al vacío. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (cloroformo: metanol: agua, 4: 1: 0 y a continuación 3: 1: 0,1) para proporcionar **48** (25 mg, 68%). TLC: $R_f = 0,38$ (cloroformo: metanol: agua, 3: 1: 0,1). $[\alpha]_D^{22} = +8,0$ (c 0,1, cloroformo: metanol, 4: 1). ES-MS calculada para $\text{C}_{96}\text{H}_{181}\text{N}_2\text{O}_{21}\text{P}$: 1729,3. Obtenido: 1728,3 (M-H) (modo negativo) (modo negativo).

Ejemplo 42 Preparación del compuesto **49**

30 A una solución de **40** (290 mg, 0,328 mmoles) y **43** (503 mg, 0,492 mmoles) en diclorometano (6 ml) se le añadieron tamices moleculares (4 Å, 0,5 g). Se agitó la mezcla bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadió gota a gota solución de trifluoroboro eterato (0,1 M en CH_2Cl_2 , 1,3 ml) en 20 min. Se agitó la mezcla durante 1 h. y a continuación se vertió en solución saturada de bicarbonato sódico (10 ml) y se extrajo con diclorometano (20 ml x 3). Se secaron las capas orgánicas combinadas con sulfato sódico y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (0,5 a 1% de metanol en diclorometano) para proporcionar **49** (457 mg, 80%). TLC: $R_f = 0,21$ (3% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -17,8$ (c 0,6, cloroformo).

35 $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (t, $J = 7,0$ Hz, 12 H, 4 CH_3), 1,25 (m, 76 H, 38 CH_2), 1,52 (m, 8 H, 4 CH_2), 2,15 (m, 4 H, 2 CH_2), 2,26, 2,35 (2 dd, $J = 14,0, 6,0$ Hz, each 1 H, CH_2), 2,48 (dd, $J = 15,0, 5,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,58 (dd, $J = 15,0, 7,0$ Hz, 1 H, CHH), 3,34 - 3,78 (m, 8 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-2', H-4', H-6'a), 4,02 - 4,13 (m, 2 H, H-6b, H-5'), 4,30 (dd, $J = 10,5, 5,0$ Hz, 1 H, H-6'b), 4,52 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H, H-1'), 4,57 - 4,90 (m, 8 H, 3 CH_2Ph , Troc- CH_2), 4,89 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H, H-1) 5,02 (m, 1 H, lípido-33-H), 5,15 (m, 3 H, NH, H-3', lípido-33-H), 5,55 (s, 1 H, CHPh), 6,00 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H, NH), 7,25 - 7,45 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para $\text{C}_{99}\text{H}_{151}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{17}$ (1747,64): C, 68,04; H, 8,71; N, 1,60. Encontrado: C, 67,92, H, 8,85, N, 1,64.

Ejemplo 43 Preparación del compuesto **50**

45 Se sintetizó el compuesto **50** a partir de **49** (740 mg, 0,424 mmoles) tratado con cinc activado (5,0 g, 76,5 mmoles) y 80% de ácido acético en acetato de etilo (400 ml) a temperatura ambiente durante 60 horas tal como se describe para la preparación de 13. El producto **50** en bruto (666 mg, 100%) obtenido de la eliminación del disolvente se liofilizó en dioxano y se utilizó sin más purificación.

Ejemplo 44 Preparación del compuesto **51**

55 En un procedimiento similar al descrito para **45**, el compuesto **50** (175 mg, 0,11 mmoles) se acopló con **14** (101 mg, 0,22 mmoles) en presencia de DCC (68 mg, 0,33 mmoles) en diclorometano anhidro (5 ml). Tras el desarrollo habitual y cromatografía en gel de sílice (1% de metanol en diclorometano) proporcionó **51** (150 mg, 67%). TLC: $R_f = 0,27$ (1% de metanol en diclorometano). $[\alpha]_D^{20} = -14,2$ (c 0,5, cloroformo).

60 $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (t, $J = 7,0$ Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,25 (m, 114 H, 57 CH_2), 1,53 (m, 12 H, 6 CH_2), 2,15 (t, $J = 7,0$ Hz, 4 H, 2 CH_2), 2,23 - 2,39 (m, 6 H, 3 CH_2), 2,56 (dd, $J = 15,5, 5,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,60 (dd, $J = 15,5, 7,0$ Hz, 1 H, CHH), 3,37 - 4,00 (m, 9 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-2', H-4', H-5', H-6'a), 4,09 (dd, $J = 11,0, 2,0$ Hz, 1 H, H-6b), 4,27 (dd, $J = 11,0, 4,5$ Hz, 1 H, H-6'b), 4,58 - 4,88 (m, 7 H, 3 CH_2Ph , H-1'), 4,82 (d, $J = 7,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,00 - 5,09 (m, 2 H, 2 lípido-33-H), 5,16 (m, 1 H, lípido-33-H), 5,26 (dd, $J = 10,0, 10,0$ Hz, 1 H, H-3'), 5,47 (s, 1 H, CHPh), 5,93 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H, NH), 6,06 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H, NH), 7,25 - 7,45 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para $\text{C}_{124}\text{H}_{202}\text{N}_2\text{O}_{18} \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (2008,96): C, 73,80; H, 10,14; N, 1,39. Encontrado: C, 73,64; H, 9,88; N, 1,41.

Ejemplo 45 Preparación del compuesto 52

5 En un procedimiento similar al descrito para **31**, se trató el compuesto **51** (135 mg, 0,067 mmoles) con cianoborohidruro sódico (211 mg, 3,36 mmoles) y HCl (g) / Et₂O en THF anhidro: CHCl₃ (4:1, 50 ml) a temperatura ambiente. Tras el desarrollo habitual y cromatografía ultrarrápida (2 a 5% de acetona en cloroformo) proporcionó **52** (112 mg, 63%). TLC: R_f=0,20 (2% de metanol en diclorometano). [α]_D²² = -13,5 (c 0,6, cloroformo).

10 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, J=6,5 Hz, 18 H, 6 CH₃), 1,25 (m, 114 H, 57 CH₂), 1,50 (m, 12 H, 6 CH₂), 2,14 (t, J=7,0 Hz, 2 H, CH₂), 2,23-2,60 (m, 10 H, 5 CH₂), 3,33 (d, J=3,3 Hz, 1 H, OH), 3,44 - 3,96 (m, 10 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-2', H-4', H-5', 2 H-6'), 4,09 (dd, J=10,0, 2,0 Hz, 1 H, H-6b), 4,49 - 4,86 (m, 9 H, 4 CH₂Ph, H-1'), 4,80 (d, J=7,5 Hz, 1 H, H-1), 4,92 - 5,18 (m, 4 H, H-3', 3 lípido-33-H), 5,80 (d, J=9,0 Hz, 1 H NH), 5,95 (d, J=8,5 Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para C₁₂₄H₂₀₄N₂O₁₈·H₂O (2010,98): C, 73,40; H, 10,23; N, 1,38. Encontrado: C, 73,40; H, 10,04; N, 1,38.

Ejemplo 46 Preparación del compuesto 53

20 En un procedimiento similar al descrito para **32**, se trató el compuesto **52** (61 mg, 0,030 mmoles) con 1H-tetrazol (12,6 mg, 0,18 mmoles) y dibencil-diisopropilfosforamidita (42 mg, 0,041 ml, 0,12 mmoles) en diclorometano anhidro (3,0 ml) y a continuación posteriormente con m-ACPB (75 mg, 55%, 0,24 mmoles). Tras el desarrollo habitual y cromatografía en gel de sílice (1a 5% de acetona en cloroformo y a continuación tolueno:acetona, desde 18:1 hasta 12:1) proporcionó **53** (58 mg, 85%). TLC: R_f=0,17 (1% de acetona en cloroformo). [α]_D²² = -3,1 (c 0,35, cloroformo).

25 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,87 (t, J=6,5 Hz, 18 H, 6 CH₃), 1,24 (m, 114 H, 57 CH₂), 1,40-1,57 (m, 12 H, 6 CH₂), 2,11-2,50 (m, 12 H, 6 CH₂), 3,52 - 3,94 (m, 9 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-2', H-5', 2 H-6'), 4,09 (dd, J=11,0, 2,0 Hz, 1 H, H-6b), 4,44 (m, 3 H, CH₂Ph, H-4'), 4,56 - 4,90 (m, 12 H, 6 CH₂Ph), 4,78 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1'), 4,98 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1), 5,05 (m, 2 H, 2 lípido-33-H), 5,16 (m, 1H, lípido-33-H), 5,39 (dd, J=10,0, 9,0 Hz, 1 H, H-3'), 5,88 (d, J=8,5 Hz, 1 H, NH), 6,08 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 7,25 (m, 30 H, Ar-H). Anal, calc, para C₁₃₈H₂₁₇N₂O₂₁P·0,5H₂O (2271,21): C, 72,69; H, 9,63; N, 1,22. Encontrado: C, 72,45; H, 9,32; N, 1,19.

Ejemplo 47 Preparación del compuesto 54

35 En un procedimiento similar al descrito para **33**, el compuesto **53** (54 mg, 0,028 mmoles) se convirtió en **54** (30 mg, 62%) utilizando paladio sobre carbón (5%, 70 mg) en THF: ácido acético, 10:1 (90 ml) en atmósfera de hidrógeno. TLC: R_f=0,35 (cloroformo: metanol: agua, 3: 1: 0,1). [α]_D²² = -10,0 (c 0,35, cloroformo: metanol, 4: 1). ES-MS calculada para C₉₆H₁₈₁N₂O₂₁P: 1729,3 (M-H) (modo negativo).

Ejemplo 48 Preparación del compuesto 55

40 En un procedimiento similar al descrito para **30**, el compuesto **50** (300 mg, 0,19 mmoles) se acopló con **5** (222 mg, 0,475 mmoles) en diclorometano: DMF (4:1, 50 ml). La cromatografía en gel de sílice (2 a 6% de acetona en cloroformo) proporcionó **55** (256 mg, 66%). TLC: R_f=0,33 (cloroformo: acetona, 9: 1). [α]_D²² = -24,0 (c 0,2, cloroformo: metanol, 5: 1).

45 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃: CD₃OD, 4: 1): δ 0,98 (t, J=6,5 Hz, 18 H, 6 CH₃), 1,25 (m, 108 H, 54 CH₂), 1,40 - 1,60 (m, 14 H, 7 CH₂), 2,07 - 2,63 (m, 12 H, 6 CH₂), 3,12 (t, J=7,0 Hz, 2 H, N CH₂), 3,45 - 3,90 (m, 9 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-2', H-4', H-5', H-6'a), 4,10 (dd, J=11,0, 2,0 Hz, 1 H, H-6b), 4,31 (dd, J=11,0, 5,5 Hz, H-6'b), 4,48 (t, J=6,5 Hz, 1 H, Asp-α-H), 4,56 - 4,87 (m, 7 H, 3 CH₂Ph, H-1'), 4,85 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1), 5,08 - 5,19 (m, 2 H, 2 lípido-33-H), 5,34 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3'), 5,51 (s, 1 H, CHPh), 7,20 - 7,45 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para ¹²³H₂₀₀N₄O₁₈·H₂O (2022,95): C, 72,38; H, 9,97; N, 2,74. Encontrado: C, 72,19; H, 9,68; N, 2,70.

Ejemplo 49 Preparación del compuesto 56

55 En un procedimiento similar al descrito para **31**, se trató el compuesto **55** (220 mg, 0,109 mmoles) con cianoborohidruro sódico (1,37 g, 21,78 mmoles) y HCl (g) / Et₂O en THF anhidro: CHCl₃ (4:1, 50 ml) a temperatura ambiente para proporcionar **56** (150 mg, 68%). TLC: R_f=0,20 (2% de metanol en diclorometano). [α]_D²² = -14,0 (c 0,2, cloroformo).

60 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃ - CD₃OD, 4: 1): δ 0,72 (t, J=6,5 Hz, 18 H, 6 CH₃), 1,10 (m, 108 H, 54 CH₂), 1,21 - 1,46 (m, 14 H, 7 CH₂), 1,96 - 2,39 (m, 12 H, 6 CH₂), 2,15 (d, J=6,0 Hz, 1 H, OH), 2,95 (m, 2 H, N CH₂), 3,30 - 3,77 (m, 10 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-2', H-4', H-5', 2 H-6'), 3,96 (dd, J=11,0, 2,0 Hz, 1 H, H-6b), 4,31 (m, 1 H, Asp-α-H), 4,35 - 4,68 (m, 9 H, 4 CH₂Ph, H-1), 4,48 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1'), 4,86 (dd, J=10,0, 9,0 Hz, 1 H, H-3'), 4,96 (m, 2 H, 2 lípido-33-H), 7,10 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para C₁₂₃H₂₀₂N₄O₁₈·1,5H₂O(2024,96): C, 72,00; H, 10,07; N, 2,73. Encontrado: C, 71,97; H, 9,91; N, 2,69.

Ejemplo 50 Preparación del compuesto 57

En un procedimiento similar al descrito para **32**, el compuesto **56** (85 mg, 0,042 mmoles) se convirtió en **57** (80 mg, 83%). TLC: $R_f=0,37$ (cloroformo: acetona, 9: 1). $[\alpha]_D^{22} = -6,2$ (c 0,4, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (m, 18 H, 6 CH₃), 1,23 (m, 108 H, 54 CH₂), 1,25 - 1,60 (m, 14 H, 7 CH₂), 2,12 - 2,57 (m, 12 H, 6 CH₂), 3,15 (m, 2 H, N CH₂), 3,48 - 3,92 (m, 9 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-2', H-5', 2 H-6'), 4,10 (br, d, J=11,0 Hz, 1 H, H-6b), 4,37 - 4,90 (m, 16 H, H-1, H-1', H-4', Asp-α-H, 6 CH₂Ph), 5,08 (m, 2 H, 2 lípido-33-H), 5,32 (dd, J=10,0, 9,0 Hz, 1 H, H-3'), 6,20 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 6,62 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 7,08 (m, 2 H, 2 NH), 7,25 (m, 30 H, Ar-H). Anal. calc. para C₁₃₇H₂₁₅N₄O₂₁P·1,5H₂O (2285,19): C, 71,16; H, 9,50; N, 2,42. Encontrado: C, 71,02; H, 9,43; N, 2,23.

Ejemplo 51 Preparación del compuesto 58

En un procedimiento similar al descrito para **33**, el compuesto **57** (52 mg, 0,023 mmoles) se convirtió en **58** (32 mg, 80%). $R_f=0,29$ (cloroformo: metanol: agua, 3: 1: 0,1). $[\alpha]_D^{22} = -10,0$ (c 0,1, cloroformo: metanol, 4: 1). ES-MS calculada para C₉₅H₁₇₉N₄O₂₁P: 1743,3. Obtenido: 1742 (M-H) (modo negativo).

Ejemplo 52 Preparación del compuesto 60

(1) Compuesto **59**: A una solución de **34** (15,95 g, 40,13 mmoles) en acetonitrilo anhidro (250 ml), se le añadieron dimetilacetato benzaldehído (18,32 g, 18,01 ml, 120,4 mmoles) y ácido p-toluensulfónico (328 mg, 1,73 mmoles). Después de agitar a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno durante 1,5 horas, se terminó la reacción por una adición de trietilamina (2 ml). Se concentró a continuación al vacío y se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 7: 3) para proporcionar **59** (13,93 g, 71%).

(2) Solución de **59** (2,02 g, 4,14 mmoles) en DMF anhidro (15 ml) se añadió gota a gota en 10 min. a una mezcla de hidruro sódico (230 mg, 9,58 mmoles), bromuro de alilo (0,75 g, 0,50 ml, 6,21 mmoles) y DMF anhidro (20 ml). La mezcla de reacción se agitó a continuación a temperatura ambiente durante 3 horas. Procedimiento similar al descrito para **36** y purificación por cromatografía en gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 5: 1) proporcionó el compuesto 3-O-alilo (1,79 g, 82%).

(3) El compuesto 3-O-alilo (5,79 g, 11,0 mmoles) se trató con ácido acético – agua (4: 1, 130 ml) a 65°C durante 6 h. Se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexano: acetato de etilo, 1: 2) para proporcionar el compuesto 4,6-dihidroxi (4,91 g, 95%).

(4) A una solución del compuesto 4,6-dihidroxi anterior (4,79 g, 10,91 mmoles) en piridina anhidra (50 ml), se le añadieron cloruro de trifetilmetilo (6,38 g, 22,86 mmoles) y DMAP (266 mg, 2,18 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a continuación a temperatura ambiente durante 6 horas y a continuación a 35°C durante 16 horas. El residuo de la eliminación del disolvente se purificó por cromatografía en gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 4: 1) para proporcionar **60** (5,82 g, 79%). TLC: $R_f=0,66$ (acetato de etilo:hexano, 1: 2). $[\alpha]_D^{22} = -37,2$ (c 1,0, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 2,71 (d, J=2,8 Hz, 1 H, OH), 3,46 (m, 2 H, 2 H-6), 3,59 (m, 1 H, H-5), 3,80 (m, 1 H, H-4), 3,95 (m, 1 H, CHHCH=CH₂), 4,15 (dd, J=10,0, 8,5 Hz, 1 H, H-3), 4,16 (m, 1 H, CHHCH=CH₂), 4,25 (dd, J=10,0, 8,0 Hz, 1 H, H-2), 4,55 (d, J=12,0 Hz, CHHPh), 4,84 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,85 (m, 1 H, CHH=CH), 5,02 (m, 1 H, CHH=CH), 5,19 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1), 5,59 (m, 1 H, CH₂=CH), 7,09 - 7,90 (m, 24 H, Ar-H). Anal. calc. para C₄₃H₃₉NO₇ (681,78): C, 75,75; H, 5,76; N, 2,04. Encontrado: C, 75,37; H, 5,67; N, 2,04.

Ejemplo 53 Preparación del compuesto 61

A una mezcla de hidruro sódico (200 mg, 8,33 mmoles), bromuro de bencilo (1,01 g, 0,70 ml, 8,35 mmoles) y DMF anhidra (20 ml), se le añadió gota a gota en 10 min. una solución de **60** (3,80 g, 5,57 mmoles) en DMF anhidra (20 ml). Después de agitación durante 3 horas a temperatura ambiente, se añadió metanol (4 ml) y se continuó agitando durante 10 minutos más. Se vertió a continuación la reacción en solución saturada enfriada en hielo de cloruro sódico (500 ml) y se extrajo con diclorometano (200 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato sódico y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (hexano: acetato de etilo, 4: 1) para proporcionar **61** (2,45 g, 57%). TLC: $R_f=0,67$ (hexano: acetato de etilo, 2: 1). $[\alpha]_D^{22} = -37,2$ (c 1,0, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 3,32 (dd, J=10,0, 3,5 Hz, 1 H, H-6a), 3,62 (m, 1 H, H-5), 3,69 (dd, J=10,0, 1,0 Hz, 1 H, H-6b), 3,93 (m, 1 H, CHHCH=CH₂), 3,96 (m, 1 H, H-4), 4,25 (m, 1 H, CHHCH=CH₂), 4,27 (dd, J=10,5, 8,5 Hz, 1 H, H-2), 4,42 (dd, J=10,5, J=8,5 Hz, 1 H, H-3), 4,44 (d, J=10,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,66 (d, J=12,0, Hz, 1 H, CHHPh), 4,70 (d, J=10,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,83 (m, 1 H, CHH=CH), 4,99 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 5,02 (m, 1 H, CHH=CH), 5,27 (d, J=8,5 Hz, 1 H, H-1), 5,59 (m, 1 H, CH₂=CH), 6,92-7,90 (m, 29 H, Ar-H). Anal. calc. para C₅₀H₄₅NO₇·0,5H₂O (771,91): C, 76,90; H, 5,94; N, 1,79. Encontrado: C, 76,72; H, 6,11; N, 1,78.

Ejemplo 54 Preparación del compuesto **62**

5 El compuesto **61** (1,50 g, 1,34 mmoles) se disolvió en ácido acético: agua: alcohol alílico (8: 2: 1, 220 ml) y esta solución se calentó a 110°C durante 1 h. El disolvente se eliminó a continuación al vacío y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexano: acetato de etilo, 2,5: 1 y después 2: 1) para proporcionar **62** (0,90 g, 87%). TLC: $R_f = 0,33$ (hexano: acetato de etilo, 2: 1). $[\alpha]_D^{22} = -16,3$ (c 1,0, cloroformo).

10 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1,90 (dd, $J=6,0, 6,0$ Hz, 1 H OH), 3,52 (m, 1 H, H-6a), 3,65 (dd, $J=9,5, 8,5$ Hz, 1 H, H-4), 3,75 (m, 1 H, H-5), 3,90 (m, 2 H, H-6b, $\text{CHHCH}=\text{CH}_2$), 4,20 (m, 2 H, H-3, $\text{CHHCH}=\text{CH}_2$), 4,28 (dd, $J=10,0, 8,0$ Hz, 1 H, H-2), 4,52 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,68 (d, $J=10,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,79 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,80 (m, 1 H, $\text{CHH}=\text{CH}$), 4,84 (d, $J=10,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 5,00 (m, 1 H, $\text{CHH}=\text{CH}$), 5,23 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 5,55 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 7,10 -7,85 (m, 14 H, Ar-H). Anal, calc, para $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{NO}_7 \cdot 0,7\text{H}_2\text{O}$ (529,59): C, 68,67; H, 6,02; N, 2,58. Encontrado: C, 68,46; H, 5,93; N, 2,53.

15

Ejemplo 55 Preparación del compuesto **63**

20 A la solución de **62** (0,90 g, 1,70 mmoles) en etanol al 95% (60 ml) se le añadió hidrazina monohidratada (3 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. El disolvente se eliminó a continuación al vacío y se purificó el residuo por cromatografía flash (1% de metanol en diclorometano) para proporcionar **63** (525 mg, 77%). TLC: $R_f = 0,28$ (3% de metanol en diclorometano). $[\alpha]_D^{22} = -17,0$ (c 0,5, cloroformo).

25 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1,75 (s, 3 H, NH_2 , OH), 2,87 (dd, $J=9,5, 8,0$ Hz, 1 H, H-2), 3,35 (dd, $J=9,5, 9,5$ Hz, 1 H, H-4), 3,36 (m, 1 H, H-5), 3,57 (dd, $J=9,5, 9,5$ Hz, 1 H, H-3), 3,72 (dd, $J=12,0, 4,0$ Hz, 1 H, H-6a), 3,88 (dd, $J=12,0, 2,5$ Hz, 1 H, H-6b), 4,24 (m, 1 H, $\text{CHHCH}=\text{CH}_2$), 4,36 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 4,42 (m, 1 H, $\text{CHHCH}=\text{CH}_2$), 4,62 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,64 (d, $J=1,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,82 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,88 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 5,18 - 5,33 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,97 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 7,30 (m, 10 H, Ar-H).

Ejemplo 56 Preparación del compuesto **64**

30 En un procedimiento similar al descrito para **40**, el compuesto **63** (510 mg, 1,28 mmoles) se acopló con **14** (870 mg, 1,92 mmoles) en presencia de DCC (659 mg, 3,20 mmoles) para proporcionar **64** (853 mg, 80%) después de cromatografía en gel de sílice (2 a 5% de acetona en cloroformo). TLC: $R_f = -38$ (tanto % metanol diclorometano). $[\alpha]_D^{22} = -6,0$ (c 1,0, cloroformo).

35 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,25 (br, s, 38 H, 19 CH_2), 1,59 (m, 4 H, 2 CH_2), 1,86 (t, $J=7,0$ Hz, 1 H, OH), 2,23 (t, $J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 2,37 (dd, $J=15,0, 5,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,48 (dd, $J=15,0, 5,5$ Hz, 1 H, CHH), 3,40 (m, 2 H, H-2, H-5), 3,52 (dd, $J=9,5, 8,5$ Hz, 1 H, H-4), 3,70 (m, 1 H, H-6a), 3,85 (m, 1 H, H-6b), 4,00 (dd, $J=10,0, 8,5$ Hz, 1 H, H-3), 4,14 (m, 1 H, $\text{CHHCH}=\text{CH}_2$), 4,26 (m, 1 H, $\text{CHHCH}=\text{CH}_2$), 4,59 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,63 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,82 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,83 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,96 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 5,08 (m, 1 H, lípido-33-H), 5,13 (m, 1 H, $\text{CHH}=\text{CH}$), 5,23 (m, 1 H, $\text{CHH}=\text{CH}$), 5,88 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6,00 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, NH), 7,35 (m, 10 H, Ar-H). Anal, calc, para $\text{C}_{51}\text{H}_{81}\text{NO}_8 \cdot 0,7\text{H}_2\text{O}$ (836,20): C, 72,17; H, 9,78; N, 1,65. Encontrado: C, 72,07; H, 9,81; N, 1,72.

Ejemplo 57 Preparación del compuesto **65**

45 En un procedimiento similar al descrito para **44**, se preparó el compuesto **65** utilizando el imidato **43** (1,15 g, 1,12 mmoles) y el aceptor de glucosilo **64** (652 mg, 0,75 mmoles) con PF_3 eterato (0,15 M en CH_2Cl_2 , 3,5 ml). La cromatografía en gel de sílice (1 a 2% de acetona en cloroformo) proporcionó **65** (1,30 g, 83%). TLC: $R_f = 0,36$ (6% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -18,6$ (c 0,5, cloroformo).

50 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0,86 (t, $J=6,5$ Hz, 12 H, 4 CH_3), 1,22 (br, s, 76 H, 38 CH_2), 1,53 (m, 8 H, 4 CH_2), 2,15 (t, $J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 2,20 (t, $J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 2,32 (dd, $J=14,0, 5,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,42 (dd, $J=14,0, 6,0$ Hz, 1 H, CHH), 2,47 (dd, $J=15,0, 5,0$ Hz, 1 H, CHH), 2,57 (dd, $J=15,0, 7,0$ Hz, 1 H, CHH), 3,34 - 4,21 (m, 12 H, H-2, H-3, H-4, H-5, 2 H-6, H-2', H-4', H-5', H-6'a, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,30 (dd, $J=10,0, 5,0$ Hz, 1 H, H-6'b), 4,51 (d, $J=8,5$ Hz, 1 H, H-1'), 4,57 (m, 4 H, 2 CHHPh , $\text{Cl}_3\text{C CH}_2\text{O}$), 4,78 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,85 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,88 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 5,00 - 5,25 (m, 5 H, H-3', 2 lípido-33-H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,45 (s, 1 H, CHPh), 5,85 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6,00 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 15 H, Ar-H). Anal, calc, para $\text{C}_{95}\text{H}_{149}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{17}$ (1697,58): C, 67,21; H, 8,85; N, 1,65. Encontrado: C, 66,99; H, 8,96; N, 1,65.

60

Ejemplo 58 Preparación del compuesto **67**

(1) Compuesto **66**: En el procedimiento similar descrito para **50**, el compuesto **65** (350 mg, 0,206 mmoles) se trató con cinc activado (9,0 g) y ácido acético al 80% en acetato de etilo (500 ml) a temperatura ambiente para proporcionar **66**

(314 mg, 100%), que se utilizó directamente en la etapa siguiente.

(2) Compuesto **67**: El compuesto **66** (304 mg, 0,20 mmoles), **14** (191 mg, 0,42 mmoles) y DCC (130 mg, 0,62 mmoles) se disolvió en diclorometano anhidro (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y el sólido se filtró. Se concentró el filtrado y se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (2% de acetona en cloroformo) para proporcionar **67** (220 mg, 56%). TLC: $R_f = 0,25$ (5% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -16,0$ (c 0,5, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (t, $J=6,5$ Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,23 (br, s, 114 H, 57 CH_2), 1,55 (m, 12 H, 6 CH_2), 2,13 - 2,48 (m, 10 H, 5 CH_2), 2,50 (dd, $J=15,0, 5,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,59 (dd, $J=15,0, 7,5$ Hz, 1 H, CHH), 3,38 - 4,24 (m, 12 H, H-2, H-3, H-4, H-5, 2 H-6, H-2', H-4', H-5', H-6'a, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,30 (dd, $J=10,5, 5,5$ Hz, 1 H, H-6'b), 4,58 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,59 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,73 (d, $J=8,5$ Hz, 1 H, H-1'), 4,77 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,83 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 4,85 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,99 - 5,30 (m, 6 H, H-3', $\text{CH}_2=\text{CH}$, 3 lípido-33-H), 5,48 (s, 1 H, CHPh), 5,87 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,91 (d, $J=8,5$ Hz, 1 H, NH), 6,07 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, NH), 7,35 (m, 15 H, Ar-H). Anal. calc, para $\text{C}_{120}\text{H}_{200}\text{N}_2\text{O}_{18}$ (1958,90): C, 73,58; H, 10,30; N, 1,43. Encontrado: C, 73,40; H, 10,70; N, 1,39.

Ejemplo 59 Preparación del compuesto 68

De manera similar a la descrita para **31**, el compuesto **67** (194 mg, 0,10 mmoles) se convirtió en **68** (130 mg, 67%). TLC: $R_f = 0,22$ (8% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -9,6$ (c 0,5, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (t, $J=7,0$ Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,25 (br s, 114 H, 57 CH_2), 1,49 - 1,58 (m, 12 H, 6 CH_2), 2,21 (t, $J=8,0$ Hz, 2 H, CH_2), 2,26 (m, 3 H, CH_2 , CHH), 2,27 (t, $J=8,0$ Hz, 2 H, CH_2), 2,33 (dd, $J=14,0, 6,0$ Hz, 1 H, CHH), 2,36 (dd, $J=15,0, 6,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,43 (dd, $J=15,0, 6,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,50 (dd, $J=16,5, 6,50$ Hz, 1 H, CHH), 2,53 (dd, $J=16,5, 8,0$ Hz, 1 H, CHH), 3,28 (d, $J=3,0$ Hz, 1 H, OH), 3,43 (m, 2 H, H-4, H-5'), 3,54 (m, 2 H, H-2, H-6a), 3,62 (ddd, $J=10,0, 9,0, 3,0$ Hz, 1 H, H-4'), 3,71 (m, 3 H, H-5, 2 H-6'), 3,84 (m, 2 H, H-3, H-2'), 4,06 (dd, $J=11,0, 2,5$ Hz, 1 H, H-6b), 4,10 - 4,20 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,52 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,58 (m, 4 H, H-1', 3 CHHPh), 4,74 (d, $J=10,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,80 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 4,83 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,95 (dd, $J=10,0, 9,0$ Hz, 1 H, H-3'), 5,02 (m, 1H, lípido-33-H), 5,10 (m, 3 H, 2 lípido-33-H, $\text{CHH}=\text{CH}$), 5,22 (m, 1 H, $\text{CHH}=\text{CH}$), 5,77 (d, $J=9,0$ Hz, 1 H, NH), 5,85 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,98 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 15 H, Ar-H). Anal. calc, para $\text{C}_{120}\text{H}_{202}\text{N}_2\text{O}_{18}$ (1960,92): C, 73,50; H, 10,38; N, 1,43. Encontrado: C, 73,25; H, 10,95; N, 1,60.

Ejemplo 60 Preparación del compuesto 69

De manera similar a la descrita para **32**, el compuesto **68** (117 mg, 0,060 mmoles) se convirtió en **69** (81 mg, 61%) que se purificó por cromatografía ultrarrápida repetida (inicialmente con 1 a 3% de acetona en cloroformo y a continuación con tolueno: acetona, desde 15: 1 hasta 12: 1 y posteriormente con hexano: acetona, desde 6: 1 hasta 5: 1). TLC: $R_f = 0,46$ (9% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -4,8$ (c 0,33, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (t, $J=6,5$ Hz, 18 H, 6 CH_3), 1,25 (br, s, 114 H, 57 CH_2), 1,45 - 1,55 (m, 12 H, 6 CH_2), 2,19 - 2,51 (m, 12 H, 6 CH_2), 3,45 - 4,23 (m, 12 H, H-2, H-3, H-4, H-5, 2 H-6, H-2', H-5', 2 H-6', $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,50 (m, 3 H, H-4', CH_2Ph), 4,58 (d, $J=12,5$ Hz, 2 H, 2 CHHPh), 4,75 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,80 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1), 4,88 (m, 5 H, 5 CHHPh), 4,99 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1'), 5,05 - 5,26 (m, 5 H, 3 lípido-33-H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,41 (dd, $J=10,0, 9,0$ Hz, 1 H, H-3'), 5,86 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,93 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, NH), 6,09 (d, $J=7,5$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 25 H, Ar-H). Anal. calc, para $\text{C}_{134}\text{H}_{215}\text{N}_2\text{O}_{21}\text{P}$ (2221,15): C, 72,46; H, 9,76; N, 1,26. Encontrado: C, 72,21; H, 9,92; N, 1,27.

Ejemplo 61 Preparación del compuesto 70

De manera similar a la descrita para **33**, el compuesto **69** (73 mg, 0,035 mmoles) se convirtió en **70** (55 mg, 95%) TLC: $R_f = 0,35$ (cloroformo: metanol: agua, 3: 1: 0,1). $[\alpha]_D^{22} = +6,0$ (c 0,1, cloroformo: metanol, 4: 1). ES-MS calculada para $\text{C}_{99}\text{H}_{187}\text{N}_2\text{O}_{21}\text{P}$: 1771,3. Obtenido (modo negativo): 1770,3 (M-H), 1771,3 (M-H, máximo isotópico).

Ejemplo 62 Preparación del compuesto 71

De manera similar a la descrita para **42**, el compuesto **65** (350 mg, 0,195 mmoles) se convirtió en **71** (200 mg, 62%) TLC: $R_f = 0,30$ (5% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -25,7$ (c 0,83, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (t, $J=6,5$ Hz, 12 H, 4 CH_3), 1,25 (br, s, 76 H, 38 CH_2), 1,55 (m, 8 H, 4 CH_2), 1,70 (s, 1 H, OH), 2,17 (t $J=7,0$ Hz, 2 H, CH_2), 2,26 (t, $J=7,0$ Hz, 2 H, CH_2), 2,43 (m, 2 H, CH_2), 2,50 (dd, $J=14,0, 5,5$ Hz, 1 H, CHH), 2,60 (dd, $J=15,0, 7,5$ Hz, 1 H, CHH), 3,40 - 3,90 (m, 9 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-2', H-4', H-5', H-6'a), 4,13 (br, d, $J=10,0$ Hz, 1 H, H-6b), 4,34 (dd, $J=10,0, 5,0$ Hz, 1 H, H-6'b), 4,51, 4,52 (2 d, $J=8,5$ Hz, each 1 H, H-1, H-1'), 4,60 (d, $J=12,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,66 (m, 3 H, CHHPh , $\text{Cl}_3\text{C CH}_2\text{O}$), 4,90 (d, $J=12,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 4,98 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H, CHHPh), 5,04 - 5,25 (m, 3 H, H-3', 2 lípido-33-H), 5,49 (s, 1 H, CHPh), 6,02 (d, $J=5,0$ Hz, 1H, NH), 7,40 (m, 15 H, Ar-H). Anal. calc, para $\text{C}_{92}\text{H}_{145}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{17}\cdot 0,8\text{H}_2\text{O}$ (1657,52): C, 66,09; H, 8,84; N, 1,67. Encontrado: C, 66,06; H, 8,84; N, 1,64.

Ejemplo 63 Preparación del compuesto **72**

De manera similar a la descrita para **28**, el compuesto **71** (670 mg, 0,405 mmoles) se acopló con **17** (270 mg, 0,81 mmoles) en presencia de DCC (208 mg, 1,01 mmoles) y DMPA (25 mg, 0,20 mmoles). La reacción se terminó en 72 h. La cromatografía en gel de sílice (diclorometano: hexano: acetona, 2: 1: 3%; y 1% de metanol en diclorometano) proporcionó **72** (570 mg, 71%). TLC: $R_f = 0,60$ (diclorometano: hexano: acetona, 10: 5: 1). $[\alpha]_D^{22} = -20,0$ (c 1,0, cloroformo).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=7,0 Hz, 15 H, 5 CH₃), 1,25 (m, 74 H, 37 CH₂), 1,53 (m, 10 H, 5 CH₂), 2,17 (t, J=7,5 Hz, 2 H, CH₂), 2,22 (dd, J=15,0, 6,0 Hz, 1 H, CHH), 2,24 (t, J=7,5 Hz, 2 H, CH₂), 2,34 (dd, J=15,0, 6,5 Hz, 1H, CHH), 2,45 (dd, J=16,0, 5,0 Hz, 1 H, CHH), 2,50 (dd, J=15,5, 5,5 Hz, 1 H, CHH), 2,55 (dd, J=16,0, 7,5 Hz, 1 H, CHH), 2,59 (dd, J=15,5, 7,5 Hz, 1H, CHH), 3,38 (ddd, J=10,0, 10,0, 5,0 Hz, 1 H, H-5'), 3,56 (m, 2 H, H-4, H-5), 3,62 (m, 1 H, H-2), 3,64 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-4'), 3,69 (dd, J=11,0, 5,0 Hz, 1 H, H-6a), 3,76 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-6'a), 3,83 (m, 1 H, lípido-33-H), 3,95 (m, 1 H, H-2'), 4,05 (br, d, J=11,0 Hz, 1 H, H-6b), 4,32 (dd, J=10,0, 5,0 Hz, 1 H, H-6'b), 4,45 (d, J=11,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,48 (d, J=11,0 Hz, 2 H, 2 CHHPh), 4,51 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1), 4,59 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1'), 4,60 - 4,67 (m, 4 H, 2 CHHPh, Cl3C CH₂O), 4,85 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 5,01 (m, 1 H, lípido-33-H), 5,12 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 5,19 (m, 4 H, H-3, H-3', 2 lípido-33-H), 5,48 (s, 1 H, CHPh), 5,71 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 7,20 - 7,45 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para C₁₁₃H₁₇₇Cl₃N₂O₁₉ (1974,00): C, 68,76; H, 9,04; N, 1,42. Encontrado: C, 68,68; H, 9,10; N, 1,39.

Ejemplo 64 Preparación del compuesto **74**

(1) Compuesto **73**: En el procedimiento similar descrito para **50**, el compuesto **72** (550 mg, 0,279 mmoles) se trató con cinc activado (9,0 g) y ácido acético al 80% en acetato de etilo (500 mg) a temperatura ambiente para proporcionar **73** (500 mg, 100%). TLC: $R_f = 0,12$ (2% de metanol en diclorometano).

(2) Compuesto **74**: El compuesto **73** (270 mg, 0,15 mmoles), **5** (211 mg, 0,45 mmoles) y DCC (139 mg, 0,68 mmoles) se disolvieron en CH₂Cl₂ anhidro: DMF (4: 1, 15 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se eliminó el disolvente y se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice (3 a 7% de acetona en cloroformo) para proporcionar **74** (220 mg, 65%). TLC: $R_f = 0,15$ (8% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -20,0$ (c 0,5, cloroformo).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (m, 21 H, 7 CH₃), 1,25 (m, 126 H, 63 CH₂), 1,50 (m, 14 H, 7 CH₂), 2,13 (m, 2 H, CH₂), 2,16 - 2,25 (m 5 H, 2 CH₂, CHH), 2,31 (dd, J=15,5, 7,0 Hz, 1 H, CHH), 2,36 (dd, J=15,0, 7,0 Hz, 1 H, CHH), 2,45 (dd, J=16,0, 5,0 Hz, 1 H, CHH), 2,50 (m, 2 H, 2 CHH), 2,55 (dd, J=15,5, 5,5 Hz, 1 H, CHH), 2,60 (dd, J=15,0, 7,5 Hz, 1 H, CHH), 3,17 (m, 2 H, N CH₂), 3,42 (ddd, J=10,0, 10,0, 5,0 Hz, 1 H, H-5'), 3,52 (dd, J=10,0, 9,0 Hz, 1 H, H-4), 3,61 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-4'), 3,64 (m, 2 H, H-5, H-2'), 3,73 (m, 1 H, H-6a), 3,75 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-6'a), 3,82 (m, 1 H, lípido-33-H), 4,06 (m, 2 H, H-2, H-6b), 4,33 (dd, J=10,0, 5,0 Hz, 1 H, H-6'b), 4,44 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,46 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,47 (m, 1 H, Asp-α-H), 4,49 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,57 (d, J=11,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,67 (d, J=12,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,73 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1), 4,85 (d, J=12,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,89 (d, J=8,5 Hz, 1 H, H-1'), 5,06 (m, 1 H, lípido-33-H), 5,13 (m, 2 H, 2 lípido-33-H), 5,21 (dd, J=10,0, 9,0 Hz, 1H, H-3), 5,38 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3'), 5,47 (s, 1 H, CHPh), 5,97 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 6,46 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 7,05 (t, J=5,0 Hz, 1 H, NH), 7,10 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 7,22 - 7,45 (m, 20 H, Ar-H). Anal, calc, para C₁₃₇H₂₂₆N₄O₂₀ (2249,31): C, 73,15; H, 10,13; N, 2,49. Encontrado: C, 73,00; H, 10,51; N, 2,41.

Ejemplo 65 Preparación del compuesto **75**

En un procedimiento similar al descrito para **31**, se trató el compuesto **74** (140 mg, 0,062 mmoles) con cianoborohidruro sódico (780 mg, 12,4 mmoles) y HCl (g) / Et₂O en THF anhidro (25 ml) a temperatura ambiente para proporcionar **75** (90 mg, 64%). TLC: $R_f = 0,17$ (10% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -16,0$ (c 0,5, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, J=6,5 Hz, 21 H, 7 CH₃), 1,25 (br, s, 126 H, 63 CH₂), 1,40 - 1,60 (m, 14 H, 7 CH₂), 2,15 - 2,60 (m, 14 H, 7 CH₂), 3,15 (m, 2 H, N CH₂), 3,33 (d, J=3,0 Hz, 1 H, OH), 3,43 - 4,12 (m, 11 H, H-2, H-4, H-5, 2 H-6, H-2', H-4', H-5', 2 H-6', lípido-33-H), 4,41 - 4,59 (m, 6 H, Asp-α-H, 5 CHHPh), 4,61 (d, J=11,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,65 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,70 (d, J=8,5 Hz, 1 H, H-1), 4,77 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1'), 4,85 (d, J=12,0 Hz, 1 H, CHHPh), 5,04 - 5,21 (m, 4 H, H-3, H-3', 2 lípido-33-H), 5,96 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 6,31 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 7,08 (t, J=5,0 Hz, 1 H, NH), 7,15 - 7,30 (m, 21 H, NH, Ar-H). Anal, calc, para C₁₃₇H₂₂₆N₄O₂₀ (2251,32): C, 73,09; H, 10,21; N, 2,48. Encontrado: C, 73,31; H, 10,77; N, 2,41.

Ejemplo 66 Preparación del compuesto **76**

De manera similar a la descrita para **32**, el compuesto **75** (120 mg, 0,053 mmoles) se convirtió en **76** (81 mg, 60%) que se purificó por cromatografía ultrarrápida repetida (inicialmente con 3% de acetona en cloroformo y a continuación con tolueno: acetona, desde 10: 1 hasta 8: 1). TLC: $R_f = 0,30$ (9% de acetona en cloroformo). $[\alpha]_D^{22} = -10,9$ (c 0,33,

cloroformo).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (t, J=7,0 Hz, 21 H, 7 CH₃), 1,25 (br, s, 126 H, 63 CH₂), 1,45 - 1,60 (m, 14 H, 7 CH₂), 2,15 - 2,55 (m, 14 H, 7 CH₂), 3,16 (m, 2 H, N CH₂), 3,51-4,10 (m, 10 H, H-2, H-4, H-5, 2 H-6, H-2', H-5', 2 H-6', lípido-33-H), 4,38 - 4,50 (m, 7 H, H-4', 6 CHHPh), 4,55 (d, J=11,0 Hz, 1 H, CHHPh), 4,65 (d, J=12,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,70 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1), 4,84 (d, J=12,5 Hz, 1 H, CHHPh), 4,87 - 4,92 (m, 5 H, Asp-α-H, H-1', 3 CHHPh), 5,07 (m, 2 H, 2 lípido-33-H), 5,18 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3), 5,31 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3'), 5,93 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 6,51 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 7,03 (t, J=5,5 Hz, 1 H, NH), 7,09 (d, J=7,0 Hz, 1 H, NH), 7,16 - 7,33 (m, 30 H, Ar-H). Anal, calc. para C₁₅₁H₂₄₁N₄O₂₃P (2511,55): C, 72,21; H, 9,67; N, 2,23. Encontrado: C, 72,13; H, 9,82; N, 2,17.

Ejemplo 67 Preparación del compuesto 77

De manera similar a la descrita para **33**, el compuesto **76** (70 mg, 0,03 mmoles) se convirtió en **77** (42,5 mg, 78%) TLC: R_f= 0,37 (cloroformo: metanol: agua, 3: 1: 0,1). [α]_D²² = -11,0 (c 0,1, cloroformo: metanol, 4: 1). ES-MS calculada para C₁₀₉H₂₀₅N₄O₂₃P: 1969,5. Obtenido (modo negativo): 1968,5 (M-H, máximo isotópico).

Ejemplo 68 Preparación del compuesto 78

El ácido lipídico **17** (1,5 g, 4,5 mmoles), el compuesto de azúcar **27** (3,18 g, 7,8 mmoles), EDCI (1,3 g, 6,8 mmoles) y DMAP (0,275 g, 2,2 mmoles) se recogieron en diclorometano anhidro (40 ml) y se agitaron durante 3 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. TLC indicó la terminación de la reacción. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo incoloro se purificó por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo el 10% en hexano) para proporcionar **78** (2,4 g, 70%). TLC: R_f= 0,54 (hexano: acetato de etilo, 3: 1). [α]_D²⁰ = + 69,1 (c 0,53, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ =0,88 (t, J=6,5 Hz, 3 H, CH₃), 1,25 (br s, 18 H), 1,32 (s, 3 H, CH₃), 1,43 (s, 3 H, CH₃), 1,51 (m, 2 H), 2,42 (dd, J=15,5, 5,5 Hz, 1 H), 2,68 (dd, J=15,5, 6,5 Hz, 1 H), 3,71 - 3,86 (m, 5 H), 4,02 (ddd, J=10,0, 10,0, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,45 (d, J=11,5 Hz, 1 H), 4,49 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,55 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,58 (d, J=11,5 Hz, 1 H), 4,69 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,71 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,92 (d, J=3,5 Hz, 1H,H-1), 5,24 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1H,H-3), 5,32 (d, J=10,0 Hz, 1H, NH), 7,30 (m, 10 H, Ar-H).

Ejemplo 69 Preparación del compuesto 79

El compuesto **78** (2,4 g) y 80% de ácido acético en acetato de etilo (50 ml) se agitó a 35°C durante 2 horas. Se eliminó a continuación el disolvente a presión reducida y se evaporó junto con tolueno. El residuo incoloro obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice (10% de acetona en tolueno) para proporcionar **79** (2,1 g, 85%). TLC: R_f= 0,25 (tolueno: acetona, 4:1). [α]_D²⁰ = +54,6 (c 2,0, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ =0,88 (t, J=6,5 Hz, CH₃), 1,25 (br s, 18 H, 9 CH₂), 1,51 (m, 2 H, CH₂), 1,99 (br s, 1 H, OH), 2,49 (dd, J=14,5, 4,5 Hz, 1 H), 2,61 (dd, J=14,5, 7,5 Hz, 1 H), 3,01 (br s, 1 H, OH), 3,62 - 3,95 (m, 6 H), 4,98 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,50 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,53 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,62 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,67 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,94 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,15 (dd, J=10,0, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 5,29 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 10 H, Ar-H).

Ejemplo 70 Preparación del compuesto 80

En un procedimiento similar al descrito para **46**, se trató el compuesto **41** (1,45 g, 1,60 mmoles) con cianoborohidruro sódico (1,0 g, 15,96 mmoles) y solución saturada reciente de éter dietílico con gas cloruro de hidrógeno para proporcionar **80** (1,23 g, 85%) tras la cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (inicialmente con hexano: acetato de etilo, 5: 1 y luego 4: 1). TLC: R_f=0,20 (hexano: acetato de etilo, 4: 1). [α]_D²² = +47,5 (c 1,0, CHCl₃).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,25 (br s, 38 H, 19 CH₂), 1,50 (m, 4 H, 2 CH₂), 2,28 (t, J=7,5 Hz, 2 H, CH₂), 2,48 (dd, J=14,0, 4,0 Hz, 1 H), 2,58 (dd, J=14,0, 7,5 Hz, 1 H), 3,27 (d, J=3,5 Hz, 1 H, OH), 3,70 - 3,86 (m, 4 H), 3,92 - 4,03 (m, 2 H), 4,58 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,64 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,66 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,76 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,92 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,13 (m, 2 H), 5,19- 5,31 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,40 (d, J=9,5 Hz, 1 H, NH), 5,88 (m, 1 H, CH₂=CH), 7,30 (m, 5 H, Ar-H), ES-MS calc. para C₄₇H₇₆Cl₃NO₁₀: 919,5. Encontrado: 920,8 (M+H).

Ejemplo 71 Preparación del compuesto 81

De manera similar a la descrita para **47**, se trató el compuesto **80** (1,20 g, 1,30 mmoles) con 1H tetrazol y dibencil-diisopropilfosforamidita (900 mg, 0,875 ml, 2,61 mmoles) en diclorometano anhidro (12 ml) y seguido de m-CPBA (1,63 g, 55%, 5,22 mmoles) para proporcionar **81** (1,33 g, 86%) después de la cromatografía en gel de sílice (inicialmente hexano: acetato de etilo, 4: 1 y después 3: 1). TLC: R_f= 0,31 (hexano: acetato de etilo, 3: 1). [α]_D²² = +35,0 (c 1,0, CHCl₃).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,24 (br s, 38 H, 19 CH₂), 1,50 (m, 4 H, 2 CH₂), 2,17 (t,

J=7,0 Hz, 2 H, CH₂), 2,41 (dd, J=16,5, 5,5 Hz, 1 H), 2,51 (dd, J=16,5, 7,5 Hz, 1 H), 3,66 (dd, J=11,0, 4,5 Hz, 1 H), 3,74 (dd, J=11,0, 2,0 Hz, 1 H), 3,91 (m, 1 H), 4,00 (m, 2 H), 4,20 (m, 1 H), 4,44 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,53 (m, 1 H, H-4), 4,54 (d, J=12,0, 1 H), 4,63 (d, J=12,0, 1 H), 4,88-4,95 (m, 5 H), 5,11 (m, 1 H), 5,20 - 5,32 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,35 (dd, J=10,5, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 5,41 (d, J=9,5 Hz, 1 H, NH), 5,88 (m, 1 H, CH₂=CH), 7,30 (m, 15 H, Ar-H), ES-MS calc. para C₆₁H₈₉Cl₃NO₁₃P: 1179,6. Encontrado: 1181,0 (M+H).

Ejemplo 72 Preparación del compuesto 82

De manera similar a la descrita para 42 se disolvió el compuesto 81 (1,30 g, 1,10 mmoles) en THF anhidro (10 ml) y se trató con hexafluorofosfato de [bis(metildifenilfosfina)](1,5-ciclooctadieno) iridio (I) (14 mg, 0,0165 mmoles), seguido de tratamiento con agua (0,5 ml) y N-succinimida (NBS, 294 mg, 1,62 mmoles) para proporcionar 82 (950 mg, 76%). TLC: R_f= 0,31 (acetato de etilo: hexano, 1: 2). [α]_D²⁰ = +17,5 (c 1,0, CHCl₃).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,24 (br s, 38 H, 19 CH₂), 1,50 (m, 4 H, 2 CH₂), 2,18 (t, J=7,0 Hz, 2 H, CH₂), 2,39 (m, 2 H, CH₂), 3,59 (dd, J=11,0, 6,0 Hz, 1 H), 3,71 (dd, J=11,0, 1,5 Hz, 1 H), 3,94 (m, 1H), 4,16 (m, 1 H), 4,40 (m, 3 H); 4,49 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,65 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,72 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,90 (m, 4 H), 5,09 (m, 1 H), 5,39 (t, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,37 (dd, J=10,0, 9,5 Hz, 1 H, H-3), 5,70 (d, J=9,5 Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 15 H, Ar-H), ES-MS calc. para C₅₈H₈₅Cl₃NO₁₃P: 1139,5. Encontrado: 1141,0 (M+H).

Ejemplo 73 Preparación del compuesto 83

En un procedimiento similar al descrito para 43, el compuesto 82 (920 mg, 0,81 mmoles) se trató con tricloroacetoneitrilo (2 ml) y DBU (4 gotas). La purificación por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (hexano: acetato de etilo, 4: 1, 3,5: 1 y 3: 1, con 0,5% de trietilamina) proporcionó 83 (700 mg, 68%). TLC: R_f= 0,36 (hexano: acetato de etilo, 3: 1). [α]_D²⁰ = +12,5 (c 0,4, CHCl₃).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,24 (br s, 38 H, 19 CH₂), 1,50 (m, 4 H, 2 CH₂), 2,19 (t, J=7,0 Hz, 2 H, CH₂), 2,46 (m, 2 H, CH₂), 3,71 (m, 2 H), 4,04 (m, 1 H), 4,15 (ddd, J=1,0, 8,5, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,43 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,52 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,61 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,71 (ddd, J=9,5, 9,5, 9,5 Hz, 1 H, H-4), 4,77 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,94 (m, 4 H), 5,12 (m, 1 H), 4,39 (dd, J=10,0, 9,5 Hz, 1 H, H-3), 5,65 (d, J=8,5 Hz, 1 H, NH), 6,47 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 7,32 (m, 15 H, Ar-H), 8,72 (s, 1 H, NH), ES-MS calc. para C₆₀H₈₅Cl₆N₂O₁₃P: 1282,4. Encontrado: 1284,0 (M+H).

Ejemplo 74 Preparación del compuesto 84

De manera similar a la descrita para 44, el imidato 83 (190 mg, 0,148 mmoles) y 79 (112 mg, 0,148 mmoles) se trataron con trifluoroboro dietiliterato en solución de diclorometano (0,1 M, 0,4 ml) para proporcionar 84 (172 mg, 66%). TLC: R_f= 0,25 (hexano: acetato de etilo, 2,5: 1). [α]_D²⁰ = +17,5 (c 2,0, CHCl₃).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 9 H, 3 CH₃), 1,24 (br s, 56 H, 28 CH₂), 1,42 - 1,62 (m, 6 H, 3 CH₂), 2,23 (m, 2 H, CH₂), 2,38 (dd, J=15,0, 8,0 Hz, 1 H), 2,46 (dd, J=15,0, 4,0 Hz, 1 H), 2,47 (dd, J=15,0, 5,0 Hz, 1 H), 2,63 (dd, J=15,0, 7,5 Hz, 1 H), 3,00 (s, 1 H, OH), 3,48 (m, 1 H, lípido-33-H), 3,61 (dd, J=11,0, 5,5 Hz, 1 H), 3,65 (m, 2 H), 3,78 (dd, J=11,0, 2,0 Hz, 1 H), 3,83 (m, 3 H), 3,94 (ddd, J=10,0, 10,0, 4,0 Hz, 1 H, H-2), 4,06 (br d, J=10,0 Hz, 1 H), 4,42 (ddd, J=9,5, 9,5, 9,5 Hz, 1 H, H-4'), 4,45 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,50 (m, 4 H), 4,52 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,57 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,66 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,72 (m, 2 H), 4,90 (m, 6 H), 5,15 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3), 5,19 (m, 1 H, lípido-33-H), 5,25 (d, J=10,0 Hz, 1 H, NH), 5,38 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3'), 5,61 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 25 H, Ar-H),

La asignación se basó en espectro de ¹H-¹H COSY.

Para una prueba estructural, se trató el compuesto 84 con anhídrido acético y piridina para proporcionar su monoacetato. TLC: R_f= 0,30 (tolueno: acetona, 8: 1). [α]_D²⁰ = +21,4 (c 0,4, CHCl₃).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 9 H, 3 CH₃), 1,23 (br s, 56 H, 28 CH₂), 1,50 (m, 6 H, 3 CH₂), 1,80 (s, 3 H, CH₃), 2,18 (t, J=7,0 Hz, 2 H, CH₂), 2,44 (m, 3 H), 2,53 (dd, J=16,0, 7,0 Hz, 1 H), 3,45 (m, 1 H), 3,61 (m, 3 H), 3,80 (m, 2 H), 3,97 (m, 3 H), 4,42 (m, 1 H), 4,49 (m, 6 H), 4,58 - 4,75 (m, 5 H), 4,89 (m, 2 H), 4,91 (m, 2 H), 4,96 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,05 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-4), 5,24 (d, J=10,0 Hz, 1 H, NH), 5,32 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 2 H, H-3, H-3'), 5,70 (d, J=8,0 Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 25 H, Ar-H).

Ejemplo 75 Preparación del compuesto 85

Se disolvió el compuesto 84 (30 mg, 0,017 mmoles) en ácido acético (10 ml) y se trató con cinc (1,0 g) a temperatura ambiente durante 30 min. Se filtró el sólido y se lavó con diclorometano (50 ml). Se eliminó el disolvente y se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (1% a 3% de metanol en diclorometano) para proporcionar el compuesto de amina libre (20 mg, 78%).

La solución del compuesto de amina libre anterior (19 mg, 0,012 mmoles), **14** (22,5 mg, 0,049 mmoles) y DCC (10,2 mg, 0,049 mmoles) en diclorometano anhidro (3 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida repetida (inicialmente con 0,5 a 2% de metanol en diclorometano y a continuación hexano: acetona, 6: 1) para proporcionar **85** (16 mg, 54%). TLC: $R_f = 0,43$ (4% metanol en diclorometano). $[\alpha]_D^{20} = +30,0$ (c 0,25, CHCl₃).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (m, 21 H, 7 CH₃), 1,25 (m, 132 H, 66 CH₂), 1,50 (m, 14 H, 7 CH₂), 2,18 (dd, J=8,5, 3,5 Hz, 1 H), 2,20 -2,37 (m, 9 H), 2,41 (dd, J=14,5, 7,5 Hz, 1 H), 2,44 (dd, J=15,5, 4,5 Hz, 1 H), 2,48 (dd, J=15,5, 3,5 Hz, 1 H), 2,63 (dd, J=15,5, 7,0 Hz, 1 H), 3,58 - 3,63 (m, 2 H), 3,67 (m, 1 H), 3,72 - 3,79 (m, 4 H), 3,81 - 3,86 (m, 2 H), 4,00 (dd, J=11,0, 2,5 Hz, 1 H), 4,24 (ddd, J=10,5, 9,0, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,38 (ddd, J=9,0, 9,0, 9,0 Hz, 1 H, H-4'), 4,44 (d, J=12,0, 1 H), 4,44 (d, J=11,5 Hz, 1 H), 4,45 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,51 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,54 (d, J=11,5 Hz, 1 H), 4,70 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,88 (m, 5 H), 4,99 (d, J=8,0 Hz, 1 H, H-1'), 5,05 (m, 1 H), 5,13 (m, 2 H), 5,18 (dd, J=10,5, 9,0 Hz, 1 H, H-3), 5,34 (dd, J=10,5, 9,0 Hz, 1 H, H-3'), 5,92 (d, J=9,0 Hz, 1 H, NH), 6,27 (d, J=7,5 Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 25 H, Ar-H), ES-MS calc. para C₁₄₅H₂₃₇N₂O₂₃P: 2405,7. Encontrado: 1204,4 (M+2H⁺).

Ejemplo 76 Preparación del compuesto 86

En un procedimiento similar al descrito para **48**, el compuesto **85** (12,0 mg, 0,005 mmoles) se convirtió en **86** (9,5 mg, 97%) TLC: $R_f = 0,46$ (cloroformo: metanol: agua, 3: 1: 1). $[\alpha]_D^{20} = -6,6$ (c 0,1, cloroformo: metanol, 4: 1). ES-MS calculada para C₁₁₀H₂₀₇N₂O₂₃P: 1955,5. Obtenido: 1954,5 (M-H, modo negativo).

Ejemplo 77 Preparación del compuesto 87

En un procedimiento similar al descrito para **78**, el ácido lipídico **20** (547,9 mg; 1,33 mmoles) se trató con EDCI (286,82 mg, 1,33 mmoles), DMAP (85,36 mg, 1,15 mmoles) y **28** (706,14 mg, 1,46 mmoles) en CH₂Cl₂ anhidro (14,0 ml) para proporcionar **87** (1,08 g, 92%) tras la cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo: hexano, 1: 9). TLC: $R_f = 0,31$ (acetato de etilo: hexano, 1: 7). $[\alpha]_D^{20} = +33,1$ (c 1,0, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,25 (m, 36 H), 1,40 (m, 4 H), 2,35 (dd, J=15,0, 6,0 Hz, 1 H), 2,60 (dd, J=15,0, 6,5 Hz, 1 H), 3,28 (m, 1 H), 3,41 (m, 1 H), 3,63 (m, 1 H), 3,72 (dd, J=9,5, 9,5 Hz, 1 H), 3,79 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H), 3,91 - 4,10 (m, 3 H), 4,23 (m, 1 H), 4,23 (m, 1 H), 4,30 (dd, J=10,0, 4,5 Hz, 1 H), 4,67 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,76 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,94 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,23 - 5,39 (m, 3 H), 5,41 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3), 5,52 (s, 1 H), 5,90 (m, 1 H), 7,34 (m, 3 H), 7,44 (m, 2 H).

Ejemplo 78 Preparación del compuesto 88

Se añadió acetonitrilo (140 ml) a **87** (1,655 g; 1,863 mmoles) y se enfrió a 0°C. A esta suspensión se añadió BH₃·Me₂NH (550,8 mg, 9,48 mmoles), se agitó durante tres minutos y después se trató lentamente con BF₃·OEt₂ (1,2 ml). Después de la adición, la reacción se dejó agitar a 0°C y a continuación 45 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción transparente se vertió en un embudo de separación que contenía NaHCO₃ saturado (50,0 ml), la capa acuosa se separó a continuación y se lavó con acetato de etilo (150 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron a sequedad y su residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (acetato de etilo: hexano, 1: 7) para proporcionar el compuesto **88** (1,25 g, 72%). TLC: $R_f = 0,14$ (hexano: acetato de etilo, 7: 1). $[\alpha]_D^{20} = +35,6$ (c 1,0, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (m, 6 H, 2 CH₃), 1,25 (m, 36 H), 1,50 - 1,60 (m, 4 H), 2,45 (dd, J=15,0, 5,0 Hz, 1 H), 2,67 (dd, J=15,0, 7,0 Hz, 1 H), 3,04 (d, J=2,5 Hz, 1 H), 3,42 (m, 2 H), 3,66 - 3,87 (m, 6 H), 4,00 (m, 2 H), 4,20 (m, 1 H), 4,58 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,64 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,68 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,73 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,94 (d, J=3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,12 - 5,33 (m, 4 H), 5,90 (m, 1 H), 7,30 (m, 5 H)

Ejemplo 79 Preparación del compuesto 89

En un procedimiento similar al descrito para **32**, el compuesto **88** (1,21 g; 1,364 mmoles) se trató con 1H-tetrazol (288 mg, 4,11 mmoles), dibencil-disopropilfosforamidita (916 μl) y a continuación con m-CPBA (942 mg, 5,456 mmoles). La cromatografía en columna de gel de sílice ultrarrápida (acetona: hexano, 1: 7) proporcionó el compuesto **89** con 72% de rendimiento. TLC: $R_f = 0,53$ (hexano/acetato de etilo, 4: 1). $[\alpha]_D^{20} = +37,6$ (c 1,0, cloroformo).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 6 H, 2 CH₃), 1,25 (m, 36 H), 1,40 (m, 4 H), 2,31 (dd, J=16,0, 6,5 Hz, 1 H), 2,53 (dd, J=16,0, 6,0 Hz, 1 H), 3,19 (m, 1 H), 3,33 (m, 1 H), 3,55 (m, 1 H), 3,72 (m, 2 H), 3,90 - 4,04 (m, 3 H), 4,20 (m, 1 H), 4,46 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,53 - 4,63 (m, 3 H), 4,81 (d, J=12,0 Hz, 1 H), 4,92 (m, 5 H), 5,21 - 5,33 (m, 3 H), 5,39 (dd, J=10,0, 10,0 Hz, 1 H, H-3), 5,90 (m, 1 H), 7,30 (m, 15 H, Ar-H).

Ejemplo 80 Preparación del compuesto 90

En un procedimiento similar al descrito para **42**, el compuesto **89** (1,13 g, 0,98 mmoles) se trató con una solución saturada de hexafluorofosfato de [bis(metildifenilfosfina)](1,5-ciclooctadieno) iridio (I) (25,2 mg, 0,03 mmoles) con gas hidrógeno en THF anhidro (23 ml) y seguido del procedimiento habitual. Se extrajeron parcialmente las impurezas de **90** en bruto en hexano y esta etapa se repitió unas pocas veces hasta que se obtuvo **90** puro con 79% de rendimiento (860,8 mg). TLC: $R_f = 0,48$ (hexano: acetato de etilo, 4: 1). $[\alpha]_D^{20} = +16,2$ (c 0,50, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,25 (br s, 36 H), 1,45 (m, 4 H), 2,30 (dd, $J=16,0$, 6,0 Hz, 1 H), 2,51 (dd, $J=16,0$, 6,0 Hz, 1 H), 3,19 (m, 1 H), 3,32 (m, 1 H), 3,53 - 3,65 (m, 3 H), 3,75 (dd, $J=11,0$, 2,0 Hz, 1 H), 3,94 (m, 1 H), 4,17 (m, 1 H), 4,42 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,45 (m, 1 H, H-4), 4,52 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,57 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,72 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,86 - 4,95 (m, 4 H), 5,28 (dd, $J=3,5$, 3,5 Hz, 1 H, H-1), 5,33 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, NH), 5,40 (dd, $J=10,5$, 9,5 Hz, 1 H, H-3), 7,30 (m, 15 H, Ar-H).

Ejemplo 81 Preparación del compuesto 91

En un procedimiento similar al descrito para **43**, el compuesto **90** (900 mg, 0,82 mmoles) se trató con tricloroacetoniitrilo (1 ml) y DBU (4 gotas) a temperatura ambiente durante 2 h. Se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (acetato de etilo: hexano, 1: 4 y 1: 3,5, con 0,5% de trietilamina) para proporcionar **91** (626 mg, 61%). TLC: $R_f = 0,30$ (acetato de etilo: hexano, 1: 3). $[\alpha]_D^{20} = +42,7$ (c 2,0, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,25 (br s, 36 H), 1,40 (m, 4 H), 2,37 (dd, $J=15,5$, 6,0 Hz, 1 H), 2,53 (dd, $J=15,5$, 6,0 Hz, 1 H), 3,21 (m, 1 H), 3,34 (m, 1 H), 3,57 (m, 1 H), 3,73 (d, $J=2,5$ Hz, 2 H), 4,04 (m, 1 H), 4,15 (ddd, $J=9,5$, 8,5, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,45 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,50 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,53 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,80 (m, 1 H), 4,83 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,95 (m, 4 H), 5,30 (d, $J=8,5$ Hz, 1 H, NH), 5,43 (dd, $J=10,5$, 9,5 Hz, 1 H, H-3), 6,45 (d, $J=3,5$ Hz, 1 H, H-1), 7,30 (m, 15 H, Ar-H), 8,75 (s, 1 H, NH).

Ejemplo 82 Preparación del compuesto 92

En un procedimiento similar al descrito para **44**, la mezcla de imidato **91** (221,1 mg, 0,17 mmoles), compuesto **79** (109,7 mg, 0,15 mmoles) y tamices moleculares (4 Å, 500 mg) en CH_2Cl_2 (4 ml) se trató con una solución diluida de BF_3 dietileterato (75 μl). Esta solución diluida de BF_3 eterato se preparó diluyendo 50 μl de solución de BF_3 eterato con 300 μl de CH_2Cl_2 anhidro. Seguido del procedimiento habitual y cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo: CH_2Cl_2 : hexano 1: 1: 2) proporcionó el compuesto puro **92** (183,1 mg, 68%). TLC: $R_f = 0,35$ (acetato de etilo: hexano, 1: 2). $[\alpha]_D^{20} = +21,2$ (c 0,5, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ =0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 9 H, 3 CH_3), 1,26 (m, 54 H), 1,42 - 1,60 (m, 6 H), 2,34 (dd, $J=16,0$, 6,0 Hz, 1 H), 2,44 (dd, $J=16,0$, 5,0 Hz, 1 H), 2,47 (dd, $J=15,0$, 5,0 Hz, 1 H), 2,63 (dd, $J=15,0$, 7,5 Hz, 1 H), 3,11 (d, $J=3,5$ Hz, 1 H, OH), 3,21 (m, 1 H), 3,35 (m, 1 H), 3,54 (m, 1 H), 3,65 (m, 3 H), 3,82 (m, 4 H), 3,92 (ddd, $J=10,0$, 10,0, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,07 (br d, $J=9,5$ Hz, 1 H), 4,45 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,47 - 4,61 (m, 7 H), 4,65 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,65 (m, 1 H), 4,70 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,80 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1'), 4,90 (m, 5 H), 5,16 (dd, $J=9,5$ H, 9,5 Hz, 1 H), 5,26 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H, NH), 5,37 (m, 2 H), 7,30 (m, 25 H, Ar-H).

Ejemplo 83 Preparación del compuesto 93

En un procedimiento similar al descrito para **85**, el compuesto **92** (173,9 mg) se convirtió en su compuesto amino libre con Zn en polvo (475 mg) y ácido acético (4 ml). La mezcla del compuesto amínico se acopló con el ácido lipídico **20** (251 mg, 0,58 mmoles) utilizando DCC (205,83 mg = 1,0 mmol). Tras el desarrollo habitual y cromatografía en gel de sílice (acetona: hexano: cloroformo) proporcionó **93** puro (96,3 mg, 45%). TLC: $R_f=0,30$ (hexano: diclorometano: acetona, 6: 2: 1). $[\alpha]_D^{20} = +22,0$ (c 1,0, cloroformo).

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ =0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 21 H, 7 CH_3), 1,24 (m, 126 H), 1,30 - 1,50 (m, 14 H), 2,21 - 2,31 (m, 4 H), 2,32 (dd, $J=16,0$, 6,5 Hz, 1 H), 2,42 (dd, $J=15,0$, 5,0 Hz, 1 H), 2,50 (dd, $J=15,5$, 5,5 Hz, 1 H), 2,61 (dd, $J=15,5$, 7,0 Hz, 1 H), 3,18 (m, 1 H), 3,28 - 3,41 (m, 5 H), 3,49 - 3,56 (m, 4 H), 3,61 - 3,87 (m, 8 H), 4,02 (m, 1 H), 4,28 (ddd, $J=10,5$, 9,5, 3,5 Hz, 1 H, H-2), 4,43 (m, 4 H), 4,51 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,53 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,69 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,83 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, H-1'), 4,89 (m, 5 H), 5,19 (dd, $J=10,5$, 9,5 Hz, 1 H), 5,36 (dd, $J=10,5$, 9,5 Hz, 1 H), 6,44 (d, $J=9,5$ Hz, 1 H, NH), 6,57 (d, $J=7,5$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 25 H, Ar-H).

Ejemplo 84 Preparación del compuesto 94

En un procedimiento similar al descrito para **33**, el compuesto **93** (60,8 mg, 0,027 mmoles) se convirtió en **94** que se purificó por cromatografía en gel de sílice (cloroformo: metanol: agua: ácido acético, 15: 1: 0,1: 0,1) para proporcionar **94** (26,9 mg, 55%) TLC: $R_f = 0,32$ (cloroformo: metanol: agua: ácido acético, 10: 1: 0,1: 0,1). $[\alpha]_D^{20} = +15,0$ (c 0,1, cloroformo). ES-MS calculada para $\text{C}_{104}\text{H}_{201}\text{N}_2\text{O}_{20}\text{P}$: 1829,5. Obtenido: 1829,5 (modo negativo, M-H, máximo isotópico)

de ^{13}C).

Ejemplo 85 Preparación del compuesto 95

5 El compuesto **27** (500 mg, 1,03 mmoles) y tricloroacetamido de bencilo (521 mg, 2,06 mmoles) se disolvieron en diclorometano anhidro: hexano, 1: 2 (15 ml) y se añadieron tamices moleculares (4 Å, ~1,0 g). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min. y se añadió ácido trifluorometansulfónico (460 mg, 28 µl, 0,31 mmoles). La reacción continuó durante 2 h. y a continuación se añadió trietilamina (0,2 ml). Se filtró el sólido a través de celite y se lavó con diclorometano. Se concentró el filtrado al vacío y se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida para proporcionar **95** (300 mg, 56%). TLC: $R_f = 0,36$ (acetato de etilo: hexano, 1: 4). $[\alpha]_D^{20} = +93,8$ (c 0,8, CHCl_3).

15 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,45$ (s, 3 H, CH_3), 1,55 (s, 3 H, CH_3), 3,62 (dd, $J = 10,0, 8,5$ Hz, 1 H), 3,70 - 3,88 (m, 5 H), 3,98 (ddd, $J = 10,0, 10,0, 3,5$ Hz, 1 H), 4,47 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,63 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,68 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,71 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,75 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,86 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,93 (d, $J = 3,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,09 (d, $J = 10,0$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 10 H, Ar-H).

Ejemplo 86 Preparación del compuesto 96

20 El compuesto **95** (280 mg, 0,49 mmoles) se trató con ácido acético: agua (4: 1, 20 ml) a 45°C durante 2 h. El procedimiento habitual y la cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (tolueno: acetona, 4: 1) proporcionó **96** (247 mg, 95%). TLC: $R_f = 0,20$ (tolueno: acetona, 3: 1). $[\alpha]_D^{20} = +90,0$ (c 0,5, CHCl_3). $[\alpha]_D^{20} = +90,0$ (c 0,5, CHCl_3).

25 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 2,00$ (br s, 1 H, OH), 2,60 (br s, 1 H, OH), 3,62 - 3,73 (m, 3 H), 3,81 (br s, 2 H), 3,98 (ddd, $J = 10,0, 10,0, 4,0$ Hz, 1 H, H-2), 4,50 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,66 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,70 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,72 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,77 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,82 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,93 (d, $J = 4,0$ Hz, 1 H, H-1), 5,19 (d, $J = 10,0$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 10 H, Ar-H), ES-MS calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{NO}_7$: 533,1. Encontrado: 533,8 (M+H).

Ejemplo 87 Preparación del compuesto 97

30 El compuesto **96** (450 mg, 0,84 mmoles) se disolvió en ácido acético (30 mg) y se trató con zinc (6,0 g) a temperatura ambiente durante 6 h. Se filtró el sólido y se lavó con ácido acético, y el filtrado se concentró al vacío. El residuo a través de una columna corta de gel de sílice (6% a 8% de diclorometano en metanol) para proporcionar **97** (300 mg, 95%). TLC: $R_f = 0,20$ (6% metanol en diclorometano). $[\alpha]_D^{20} = +133,0$ (c 0,2, metanol).

35 ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 3,10$ (dd, $J = 10,0, 3,5$ Hz, 1 H, H-2), 3,57 - 3,82 (m, 5 H), 4,60 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,69 (d, $J = 11,0$ Hz, 1 H), 4,75 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 5,06 (d, $J = 11,0$ Hz, 1 H), 5,23 (d, $J = 3,5$ Hz, 1 H, H-1), 7,35 (m, 10 H, Ar-H).

Ejemplo 88 Preparación del compuesto 98

40 En un procedimiento similar al descrito para **55**, el compuesto **97** (100 mg, 0,28 mmoles) se trató con **23** (162 mg, 0,25 mmoles) y DCC (209 mg, 1,02 mmoles) en diclorometano: dimetilformamida (5: 1, 6 ml). El procedimiento habitual seguido por la cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (cloroformo: acetona, 9: 1) proporcionó **98** (93 mg, 38%). TLC: $R_f = 0,30$ (diclorometano: metanol, 100: 2). $[\alpha]_D^{20} = +52,0$ (c 0,4, cloroformo).

45 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,88$ (t, $J = 6,5$ Hz, 6 H, 2 CH_3), 1,25 (br s, 54 H), 1,45 - 1,60 (m, 6 H), 2,00 (m, 1 H, OH), 2,29 (dd, $J = 15,5, 5,5$ Hz, 1 H), 2,40 (m, 3 H), 2,50 (d, $J = 1,5$ Hz, 1 H, OH), 3,37 (t, $J = 6,5$ Hz, 2 H), 3,61 - 3,80 (m, 5 H), 4,30 (ddd, $J = 9,5, 9,5, 3,5$ Hz, 1 H, H-2), 4,48 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,65 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,70 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 4,73 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,89 (d, $J = 3,5$ Hz, 1 H, H-1), 5,07 (m, 1 H), 5,96 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 10 H, Ar-H), ES-MS calc. para $\text{C}_{60}\text{H}_{101}\text{NO}_9$: 979,7. Encontrado: 980,9 (M+H).

Ejemplo 89 Preparación del compuesto 99

55 En un procedimiento similar para **44**, la mezcla, **91** (188 mg, 0,15 mmoles), **98** (93 mg, 0,10 mmoles), tamices moleculares (4 Å, 1,0 g) y diclorometano anhidro (3 ml) se trató con solución de BF_3 heterato (0,05 M en diclorometano, 0,6 ml). El procedimiento habitual seguido por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida repetida (hexano: acetato de etilo, 2,5: 1 y 2: 1; tolueno: acetona, 8: 1) para proporcionar **99** (109 mg, 56%). TLC: $R_f = 0,33$ (hexano: acetato de etilo, 2: 1). $[\alpha]_D^{20} = +24,0$ (c 0,3, cloroformo).

60 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,88$ (t, $J = 6,5$ Hz, 15 H, 5 CH_3), 1,25 (m, 90 H), 1,40 - 1,58 (m, 10 H), 2,25 - 2,45 (m, 6 H), 2,95 (br s, 1 H, OH), 3,21 (m, 1 H), 3,36 (m, 3 H), 3,47 - 3,53 (m, 2 H), 3,57 - 3,67 (m, 4 H), 3,72 (m, 2 H), 3,80 (m, 2 H), 4,03 (br d, $J = 11,0$ Hz, 1 H), 4,25 (ddd, $J = 10,0, 9,0, 3,5$ Hz, 1 H, H-2), 4,44 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,48 (m, 3 H), 4,59 (m, 2 H), 4,67 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,69 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,75 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,85 - 4,92 (m, 6 H), 5,04 (m, 1 H), 5,36 (m, 2 H), 5,80 (d, $J = 9,0$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 25 H, Ar-H).

Ejemplo 90 Preparación del compuesto **100**

5 En un procedimiento similar al descrito para **45**, el compuesto **99** (95 mg, 0,046 mmoles) se convirtió en su compuesto **100** amino libre utilizando zinc el polvo (2,0 g) y ácido acético (20 ml). El compuesto en bruto se liofilizó en dioxano para proporcionar **100** (85 mg, 97%). TLC: $R_f = 0,11$ (2% de metanol en diclorometano).

Ejemplo 91 Preparación del compuesto **101**

10 En un procedimiento similar al descrito para **45**, el compuesto amino libre, **100** (42 mg, 0,02 mmoles) se acopló con ácido lipídico, **20** (36,8 mg, 0,09 mmoles) utilizando DCC (28 mg, 0,13 mmoles) en diclorometano anhidro (3 ml). El procedimiento habitual seguido por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (hexano: cloroformo: acetona, 6: 3: 1,5) proporcionó **101** (38 mg, 75%). TLC: $R_f = 0,50$ (hexano: cloroformo: acetona, 6: 3: 2). $[\alpha]_D^{20} = +21,2$ (c 0,4, cloroformo).

15 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,86$ (m, 21 H, 7 CH_3), 1,23 - 1,60 (m, 140 H), 2,20-2,39 (m, 8 H), 2,47 (dd, $J=15,5$, 5,5 Hz, 1 H), 3,17 (m, 1 H), 3,31 - 3,39 (m, 5 H), 3,50 - 3,67 (m, 7 H), 3,68 - 3,78 (m, 4 H), 3,84 (dd, $J=11,0$, 3,5 Hz, 1 H), 3,96 (dd, $J=11,0$, 3,0 Hz, 1 H), 4,21 (ddd, $J=10,5$, 9,0, 3,0 Hz, 1 H, H-2), 4,40 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,43 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,44 (m, 1 H), 4,47 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,64 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,65 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,87 (m, 7 H), 5,03 (m, 1 H), 5,34 (dd, $J=10,5$ H, 9,0 Hz, 1 H), 5,75 (d, $J=9,0$ Hz, 1 H, NH), 6,57 (d, $J=9,0$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 25 H, Ar-H).

Ejemplo 92 Preparación del compuesto **102**

25 En un procedimiento similar al descrito para **33**, bajo atmósfera de hidrógeno el compuesto **101** (20 mg, 8,78 μmoles) se convirtió en **102** mediante paladio sobre carbón activo (5%, 50 mg) en THF-ácido acético (10: 1, 50 ml) durante 24 h. El procedimiento habitual y la purificación por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (cloroformo: metanol: agua: ácido acético, 9: 1: 0,1: 0,1 y 8: 1: 0,1: 0,1) proporcionó **102** (12 mg, 75%). TLC: $R_f = 0,38$ (cloroformo: metanol: agua: hidróxido amónico, 7: 3: 0,4: 0,2). $[\alpha]_D^{20} = +2,0$ (c 0,2, cloroformo: metanol, 4: 1). ES-MS calculada para $\text{C}_{104}\text{H}_{201}\text{N}_2\text{O}_{20}\text{P}$: 1829,4; observado: 1829,5 (modo negativo, M-H, máximo isotópico ^{13}C).

Ejemplo 93 Preparación del compuesto **103**

30 En un procedimiento similar al descrito para **101**, se trataron el compuesto **100** (42 mg, 0,02 mmoles) y **17** (30 mg, 0,09 mmoles) con DCC (28 mg, 0,134 mmoles) en diclorometano anhidro (3 ml) para proporcionar **103** (37 mg, 76%) que se purificó por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida repetida (hexano: acetato de etilo, 2: 1; hexano: acetona, 3: 1).
35 TLC: $R_f = 0,39$ (hexano: cloroformo: acetona, 6: 3: 2). $[\alpha]_D^{20} = +21,2$ (c 0,4, cloroformo).

40 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,86$ (m, 18 H, 6 CH_3), 1,23 - 1,60 (m, 120 H), 2,23 (dd, $J=15,0$, 6,5 Hz, 1 H), 2,25 - 2,39 (m, 7 H), 2,44 (dd, $J=15,5$, 5,5 Hz, 1 H), 3,17 (m, 1 H), 3,34 (m, 3 H), 3,50 - 3,76 (m, 12 H), 3,89 (dd, $J=11,0$, 3,0 Hz, 1 H), 4,20 (ddd, $J=10,0$, 9,0, 3,0 Hz, 1 H, H-2), 4,37 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,39 - 4,43 (m, 3 H), 4,46 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,51 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H), 4,53 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,61 (d, $J=11,5$ Hz, 1 H), 4,65 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 4,82 - 4,90 (m, 6 H), 5,03 (m, 1 H), 5,22 (dd, $J=10,0$, 9,0 Hz, 1 H), 5,71 (d, $J=9,0$ Hz, 1 H, NH), 6,38 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H, NH), 7,30 (m, 30 H, Ar-H).

Ejemplo 94 Preparación del compuesto **104**

45 En un procedimiento similar al descrito para **102**, el compuesto **103** (16 mg, 7,27 μmoles) se trató con paladio sobre carbón activo (50 mg) bajo atmósfera de hidrógeno en THF: ácido acético (10: 1, 50 ml) para proporcionar **104** (10,5 mg, 87%) que se purificó por cromatografía en gel de sílice ultrarrápida (cloroformo: metanol: agua: ácido acético, 9: 1: 0,1: 0,1, 8: 1: 0,1: 0,1 y 6: 1: 0,1: 0,1). TLC: $R_f = 0,20$ (cloroformo: metanol: agua: hidróxido amónico, 7: 3: 0,4: 0,2). $[\alpha]_D^{20} = -3,5$ (c 0,2, cloroformo: metanol, 4: 1). ES-MS calculada para $\text{C}_{92}\text{H}_{177}\text{N}_2\text{O}_{20}\text{P}$: 1661,3; observado: 1661,3 (modo negativo, M-H, máximo isotópico ^{13}C).

Ejemplo 95 Preparación de formulaciones liposómicas

55 Los análogos **33**, **48**, **54**, **58**, **70**, **77**, **86**, **94**, **102**, **104** de lípido A sintético y el producto comercial de lípido A **Lípido A Natural**, se incorporaron en formulaciones liposómicas. El **Lípido A Natural** se adquirió en AVANTI y contenía una mezcla de análogos de lípido A extraídos de la pared celular bacteriana de *Salmonella*.

60 Por lo general, la formulación liposómica estaba compuesta por 400 μg de lipopéptido BP1-148 a base de MUC1, H_2N -STAPPAHGVTSAPDTRPAGSTAPPK(Pal)G-OH, 200 μg de análogo de lípido A, 6,94 mg de colesterol, 1,46 mg de dimiristol-fosfatidilglicerol (DMPG) y 11,62 mg de dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) por 1 ml de solución salina (solución salina de NaCl al 0,9%). Los montajes liposómicos se formularon disolviendo en primer lugar los fosfolípidos, colesterol y análogo de lípido A en terc-butanol a aproximadamente 53°C. Se añadieron a continuación lipopéptido y agua (5%, v/v) a la solución de terc-butanol. La solución de terc-butanol al 95% transparente resultante se inyectó en

aproximadamente 4 volúmenes de agua agitada rápidamente a aproximadamente 50°C, utilizando un jeringuilla de vidrio con una aguja de calibre 18. Las pequeñas vesículas unilaminares (SUV) formadas en este proceso se enfriaron, se estabilizaron por filtración a través de un filtro de membrana de 0,22 µm, se llenaron en viales y se liofilizaron. El polvo anhidro se rehidrató con solución salina esterilizada antes de la inyección, dando como resultado la formación de grandes vesículas multilaminares (MLV). Los liposomas formados se utilizan para inmunizar ratones.

Ejemplo 96 Ratones inmunizados con vacunas liposómicas

Se inmunizaron por vía subcutánea grupos de ratones negros C57 con la vacuna liposómica que contenía 40 µg de lipopéptido BP1-148 a base de MUC1 (figura 34), que tiene la secuencia peptídica de H₂N-STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK(Pal)G-OH, y 20 µg de análogo de lípido A por dosis. Nueve días después de la inyección de la vacuna se sacrificaron los ratones y se extrajeron linfocitos de los ganglios linfáticos drenantes (respuesta local) o de los bazo (respuesta general) para determinar la respuesta inmunitaria en cada grupo. Los linfocitos extraídos de los ratos inmunizados se incubaron en cultivos *in vitro* en presencia de antígeno BP1-151 de refuerzo a base de MUC1, que tiene la secuencia peptídica H₂N-STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK-OH.

Ejemplo 97 Medición de la proliferación de linfocitos T

Se evaluó la proliferación de linfocitos T utilizando un ensayo de incorporación de ³H-timidina patrón. En resumen, se añadieron linfocitos de ganglio linfático inguinal pasados a través de lana de nilón de cada ratón a un cultivo que contenía 10⁶ esplenocitos isogénicos tratados con mitomicina C natural, que sirve como células presentadoras de antígeno (CPA). Se añadió a cada pocillo 20 µg de péptido BP1-151 de refuerzo a base de MUC1, H₂N-STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK-OH (código de aminoácidos de una sola letra, tabla 8), se añadió para referencia positiva; y los cultivos que no contienen ni antígeno ni péptido BP1-72, que tiene la secuencia peptídica H₂N-EAIQPGCIGGPKGLPGLPGP-OH, se utilizaron como referencia negativa. Se incubó el cultivo durante 72 h. en un volumen total de 250 µl/pocillo, seguido de adición de 1 µCi de ³H-timidina en un volumen de 50 µl. Se incubaron las placas durante otras 18 a 20 h. Se recogieron las células y se midió la incorporación de [³H]dTh por recuento de centelleo líquido. Los resultados de la proliferación de linfocitos T correspondientes a varias vacunas liposómicas con adyuvante de diferentes análogos de lípido A se resumen en las tablas 1 a 3 y en las figura 31 a figura 33.

Descripción de las tablas de 1 a 8

Tabla 1	Proliferación de linfocitos T y producción de interferón-gamma de análogos 33 , 48 y 58 de lípido A
Tabla 2	Proliferación de linfocitos T y producción de interferón-gamma de análogos 48 , 54 , 70 , 77 y 86 de lípido A
Tabla 3	Proliferación de linfocitos T y producción de interferón-gamma de análogos 86 , 94 , 102 y 104 de lípido A
Tabla 4	Comparación de toxicidad letal de análogos sintéticos y naturales de lípido A
Tabla 5	Abreviaturas frecuentes utilizadas en el texto
Tabla 6	Listado de estructuras de análogos de lípido A preparados en la presente invención
Tabla 7	Listado de denominaciones de la IUPAC de compuestos preparados en la presente invención
Tabla 8	Códigos de aminoácidos de una sola letra y de tres letras

Tabla 1 Proliferación de linfocitos T y producción de interferón-gamma de análogos **33**, **48** y **58** de lípido A

Análogos de lípido A	Proliferación de linfocitos T (CPM)	Interferón-gamma (IFN-γ, pg/ml)
33	822	0
48	14112	2430
58	686	0
lípido A natural	14172	2938
solución salina	3274	0

Tabla 2 Proliferación de linfocitos T y producción de interferón-gamma de análogos **48**, **54**, **70**, **77** y **86** de lípido A

Análogos de lípido A	Proliferación de linfocitos T (CPM)	Interferón-gamma (IFN-γ, pg/ml)
48	28149	18261
54	32976	36166
70	25034	17321
77	2565	0
86	52382	36461
lípido A natural	37851	31741
solución salina	183	0

Ejemplo 98 Medición de la producción de interferón-gamma (IFN- γ)

Se determinaron las concentraciones de interferón-gamma (IFN- γ) en los sobrenadantes de cultivo celular utilizando ensayo inmunoabsorbente con encima ligada (ELISA). Se recubrieron placas de 96 pocillos con 50 μ l de Mab receptor en 50 μ l de R4.6AZ a 37°C durante 30 min. Se lavaron a continuación las placas y se incubaron con muestras de ensayo durante 45 min. Después de dos lavados se añadió el segundo anticuerpo biotinilado, XMG1.2. Después del lavado, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa y se incubó otra vez durante 30 min. Por último, se añadieron 100 μ l solución de sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRPO). Se midió la densidad óptica con un lector de ELISA Thermomax a una longitud de onda de 405 nm en modo cinético durante 10 min. Las concentraciones de interferón-gamma (IFN- γ) correspondientes a varios análogos de lípido-A se muestran en las tablas 1 a 3 y en las figura 31 a figura 33.

Tabla 3 Proliferación de linfocitos T y producción de interferón-gamma de análogos **86**, **94**, **102** y **104** de lípido A

Análogos de lípido A	Proliferación de linfocitos T (CPM)	Interferón-gamma (IFN- γ , pg/ml)
86	15486	17697
94	10882	2150
102	13389	10587
104	12635	14669
lípido A natural	14539	31166
solución salina	5078	362

Ejemplo 99 Toxicidad letal de análogos de lípido A sintético y natural

Se ensayó la toxicidad letal del análogo **86** de lípido A sintético y el de lípido A natural (para más detalle véase el Ejemplo 95). Los procedimientos y resultados del ensayo se resumen a continuación (Tabla 4).

- Preparación de solución de análogo de lípido A: Se disolvió 1 mg de análogo de lípido a en 1 ml de DMSO al 20% y se diluyó con solución salina para obtener dosis de 50 μ g, 10 μ g y 2 μ g en 0,5 ml.
- Preparación de actinomicina D: Se disolvieron 5 mg de actinomicina D en 1 ml de etanol y se diluyeron con solución salina para obtener una dosis de 550 μ g/Kg en 0,5 ml.
- Procedimiento: Se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) varias dosis de análogo de lípido A o de disolvente como referencia en ratones negros C57. Veinte minutos después todos los grupos de ratones se inyectaron con 500 μ l de actinomicina D. Se observó a continuación la mortalidad en los ratones o cualquier otro síntoma de toxicidad.

Durante el primer periodo de observación de 24 horas los tres ratones inyectados con la alta dosis de 50 μ g de **Lípido A Natural** así como los dos ratones inyectados con una dosis de 10 μ g de **Lípido A Natural** se encontraron muertos (Tabla 4). Los grupos de ratones inyectados con las tres dosis de análogo **86** de lípido A sintético y los ratones inyectados con la dosis baja de 2 μ g de **Lípido A Natural** sobrevivieron al estudio. No se registraron más muertes de ratones después de las 24 horas y el experimento se concluyó 4 días después. Los resultados de este estudio demostraron que el análogo **86** de lípido a sintético es mucho menos tóxico que el producto **Lípido A Natural** probado en este experimento.

Tabla 4 Comparación de la toxicidad letal de análogos de lípido A sintético y natural

Grupo	Análogo de lípido A	Dosis (μ g/ μ l)	Actinomicina D	n° supervivientes / n° ensayados (+ 24 h.)
1	86	50/500	+	3/3
2	86	10/500	+	3/3
3	86	2/500	+	3/3
4	Natural	50/500	+	0/3
5	Natural	10/500	+	1/3
6	Natural	2/500	+	3/3
7	Disolvente	0/500	+	3/3

Los ejemplos anteriores describieron los procedimientos detallados de la síntesis de análogos de lípido A y sus productos intermedios, y los procedimientos para preparar vacunas liposómicas, con adyuvantes de análogos de lípido A sintético, para provocar respuestas inmunitarias específicas en ratones. Las abreviaturas corrientes utilizadas en el texto de la presente invención se presentan en la Tabla 5. Las estructuras de análogos de lípido A preparados y probados en su poder adyuvante se presentan en la Tabla 6. Un listado completo de las denominaciones de la IUPAC de todos los compuestos preparados en la presente invención se proporciona en la Tabla 7. Para la secuencia peptídica, se utilizan códigos de aminoácidos de una sola letra en la presente invención. Como referencia, por favor

véase el listado de códigos de una sola letra y tres letras estándares de aminoácidos naturales Tabla 8.

Tabla 5 Abreviaturas frecuentes utilizadas en el texto

All	alilo
APC	célula presentadora de antígeno
BF ₃ OEt ₂	trifluoroborano dietil-eterato
Bn	bencilo
^t Bu	terc-butilo
m-CPBA	ácido m-cloroperbenzóico
CPM	recuentos por minuto
DBU	1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno
DCC	diciclohexilcarbodiimida
(-)-DIPCI	(-)-B-clorodiisopinocanfenilborano
DAMP	4-dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
DMPG	dimiristoil-fosfatidil-glicerol
DPPC	dipalmitoil-fosfatidil-colina
DMSO	sulfóxido de dimetilo
EDCI	hidrocloruro de 1-[3-(dimetilamina)propil]-3-etil carbodiimida
ES-MS	espectrometría de masas con atomización de electrones
Et	etilo
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
IFN-γ	interferón-gamma
LPS	lipopolisacárido
Me	metilo
MLV	vesículas multilaminares grandes
NBS	N-bromosuccinimida
NMM	N-metilmorfolina
RMN	resonancia magnética nuclear
Pal	palmitoilo
Ph	fenilo
Phth	ftalimido
IPr	isopropilo
Py	piridina
SUV	vesículas unilaminares pequeñas
Tf	trifluorometil-sulfonilo
ATF	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografía en capa fina
Troc	tricloetoxilcarbonilo
Trt	trifenilmetilo
p-TsOH	ácido p-toluensulfónico

Tabla 6 Listado de estructuras de análogos de lípido A preparados en la presente invención

(5) H								
(6) CH ₃ CH ₂ CH ₂								
(7)								
(8)								
(9)								
(10)								
Compuestos	Estructura	R1	R2	R3	R4	R5		
33	(1)	(12)	(7)	N/A	N/A	N/A		
48	(2)	(11)	(5)	(5)	(9)	(10)		
54	(2)	(10)	(5)	(5)	(10)	(10)		
58	(2)	(10)	(5)	(5)	(12)	(10)		
70	(2)	(10)	(6)	(5)	(10)	(10)		
77	(2)	(10)	(8)	(5)	(12)	(10)		
86	(2)	(10)	(8)	(5)	(10)	(10)		
94	(2)	(13)	(8)	(5)	(13)	(13)		
102	(2)	(14)	(5)	(5)	(13)	(13)		
104	(2)	(14)	(5)	(5)	(8)	(13)		
Lípido A Natural	(2)	Mezcla no identificada	Mezcla no identificada	Mezcla no identificada	Mezcla no identificada	Mezcla no identificada		

Tabla 7 Listado de denominaciones de la IUPAC de compuestos preparados en la presente invención

	Compuesto 1	Éster terc-butílico del ácido N-9-fluorenilmetoxicarbonil-L-aspártico
5	Compuesto 2	Éster terc-butílico del ácido (3S)-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-nonilamino-4-oxo-butírico
	Compuesto 3	Éster terc-butílico del ácido (3S)-3-amino-4-nonilamino-4-oxo-butírico
	Compuesto 4	Éster terc-butílico del ácido (3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butírico
10	Compuesto 5	Ácido (3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butírico
	Compuesto 6	Éster etílico del ácido 3-hidroxitetradecanoico
15	Compuesto 7	Ácido 3-hidroxitetradecanoico o ácido 3-hidroxi-mirístico
	Compuesto 8	Ácido (3R)-3-hidroxitetradecanoico o ácido (3R)-3-hidroxi-mirístico
	Compuesto 9	Éster fenácilico del ácido (3R)-3-hidroxitetradecanoico
20	Compuesto 10	Éster fenácilico del ácido (3R)-3-dodecanoíloxitetradecanoico
	Compuesto 11	Éster fenácilico del ácido (3R)-3-tetradecanoíloxitetradecanoico
25	Compuesto 12	Éster fenácilico del ácido (3R)-3-hexadecanoíloxitetradecanoico
	Compuesto 13	Ácido (3R)-3-dodecanoíloxitetradecanoico
	Compuesto 14	Ácido (3R)-3-tetradecanoíloxitetradecanoico
30	Compuesto 15	Ácido (3R)-3-hexadecanoíloxitetradecanoico
	Compuesto 16	Éster fenácilico del ácido (3R)-3-bencioxitetradecanoico
35	Compuesto 17	Ácido (3R)-3-bencioxitetradecanoico
	Compuesto 18	Trifluorometansulfonato de dodecilo
	Compuesto 19	Éster fenácilico del ácido (3R)-3-dodeciloxitetradecanoico
40	Compuesto 20	Ácido (3R)-3-dodeciloxitetradecanoico
	Compuesto 21	(4R)-4-hidroxipentadeceno-1
45	Compuesto 22	(4R)-4-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoiloxi]-pentadeceno-1
	Compuesto 23	Ácido (3R)-3-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoiloxi]-tetradecanoico
	Compuesto 24	2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranosido de bencilo
50	Compuesto 25	2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranosido de alilo
	Compuesto 26	2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranosido de bencilo
55	Compuesto 27	2-desoxi-4,6-di-O-isopropiliden 2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranosido de bencilo
	Compuesto 28	2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranosido de alilo
	Compuesto 29	2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-3-O-tetradecanoil- α -D-glucopiranosido de bencilo
60	Compuesto 30	2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-tetradecanoil- α -D-glucopiranosido de bencilo
65	Compuesto 31	6-O-bencil-2-desoxi-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-tetradecanoil- α -D-glucopiranosido de bencilo

- Compuesto **32** 6-O-bencil-2-desoxi-4-O-(di-O-bencil-fosfona)-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-tetradecanoil- α -D-glucopiranosido de bencilo
- 5 Compuesto **33** 2-desoxi-4-O-fosfona-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-tetradecanoil- α/β -D-glucopiranosida
- Compuesto **34** 2-desoxi-2-ftalimido- β -D-glucopiranosido
- 10 Compuesto **35** 2-desoxi-2-ftalimido-6-O-trifenilmetil- β -D-glucopiranosido
- Compuesto **36** 2-desoxi-3,4-di-O-bencil-2-ftalimido-6-O-trifenilmetil- β -D-glucopiranosido de bencilo
- Compuesto **37** 2-desoxi-3,4-di-O-bencil-2-ftalimido- β -D-glucopiranosido de bencilo
- 15 Compuesto **38** 2-amino-2-desoxi-3,4-di-O-bencil- β -D-glucopiranosido de bencilo
- Compuesto **39** 2-desoxi-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-hexadecanoiloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosido de bencilo
- 20 Compuesto **40** 2-desoxi-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosido de bencilo
- Compuesto **41** 2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil-amino)- α -D-glucopiranosido de alilo
- 25 Compuesto **42** 2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil-amino)- α/β -D-glucopiranosida
- 30 Compuesto **43** Tricloroacetamido de 2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil-amino)- α -D-glucopiranosilo
- Compuesto **44** 2-desoxi-6-O-[2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil-amino)- β -D-glucopiranosil]-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-hexadecanoiloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosido de bencilo
- 35 Compuesto **45** 2-desoxi-6-O-[2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-[(3R)-3-dodecanoiloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil]-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-hexadecanoiloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosido de bencilo
- 40 Compuesto **46** 2-desoxi-6-O-[6-O-bencil-2-desoxi-2-[(3R)-3-dodecanoiloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil]-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-hexadecanoiloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosido de bencilo
- 45 Compuesto **47** 2-desoxi-6-O-[6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfona)-2-desoxi-2-[(3R)-3-dodecanoiloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil]-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-hexadecanoiloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosido de bencilo
- 50 Compuesto **48** 2-desoxi-6-O-[2-desoxi-2-[(3R)-3-dodecanoiloxitetradecanamido]-4-O-fosfona-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil]-2-[(3R)-3-hexadecanoiloxitetradecanamido]- α/β -D-glucopiranosida
- Compuesto **49** 2-desoxi-6-O-[2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil-amino)- β -D-glucopiranosil]-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-hexadecanoiloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosido de bencilo
- 55 Compuesto **50** 2-desoxi-6-O-[2-amino-2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil]-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosido de bencilo
- 60 Compuesto **51** 2-desoxi-6-O-[2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil]-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosido de bencilo
- 65 Compuesto **52** 2-desoxi-6-O-[6-O-bencil-2-desoxi-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil]-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-

		tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
5	Compuesto 53	2-desoxi-6-O-{6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-tetradecanoil-oxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
10	Compuesto 54	2-desoxi-6-O-{2-desoxi-4-O-fosfono-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-α/β-D-glucopiranosida
15	Compuesto 55	2-desoxi-6-O-{2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
20	Compuesto 56	2-desoxi-6-O-{6-O-bencil-2-desoxi-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
25	Compuesto 57	2-desoxi-6-O-{6-O-bencil-4-O-di-bencil-fosfono)-2-desoxi-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-3,4-di-O-bencil-2-[(3R)-3-tetradecanoil-oxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
30	Compuesto 58	2-desoxi-6-O-{2-desoxi-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-4-O-fosfono-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-α/β-D-glucopiranosida
35	Compuesto 59	2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido de bencilo
40	Compuesto 60	3-O-alil-2-desoxi-6-O-trifenilmetil-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido de bencilo
45	Compuesto 61	3-O-alil-4-O-bencil-2-desoxi-6-O-trifenilmetil-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido de bencilo
50	Compuesto 62	3-O-alil-4-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido de bencilo
55	Compuesto 63	3-O-alil-2-amino-4-O-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido de bencilo
60	Compuesto 64	3-O-alil-4-O-bencil-2-desoxi-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
65	Compuesto 65	3-O-alil-4-O-bencil-2-desoxi-6-O-{2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-β-D-glucopiranosil}-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
	Compuesto 66	3-O-alil-6-O-{2-amino-2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-4-O-bencil-2-desoxi-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
	Compuesto 67	3-O-alil-4-O-bencil-2-desoxi-6-O-{2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
	Compuesto 68	3-O-alil-4-O-bencil-2-desoxi-6-O-{2-desoxi-6-O-bencil-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxi tetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
	Compuesto 69	3-O-alil-4-O-bencil-2-desoxi-6-O-{2-desoxi-6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
	Compuesto 70	2-desoxi-6-O-{2-desoxi-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-4-O-fosfono-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil}-3-O-propil-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanamido]-α/β-D-glucopiranosida
	Compuesto 71	4-O-bencil-2-desoxi-6-O-{2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-β-D-glucopiranosil}-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo

- 5 Compuesto **72** 4-O-bencil-3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-2-desoxi-6-O-[2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-β-D-glucopiranosil]-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
- 10 Compuesto **73** 6-O-[2-amino-2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil]-4-O-bencil-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-desoxi-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
- 15 Compuesto **74** 4-O-bencil-3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-2-desoxi-6-O-[2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil]-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
- 20 Compuesto **75** 4-O-bencil-3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-6-O-[6-O-bencil-2-desoxi-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil]-2-desoxi-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
- 25 Compuesto **76** 4-O-bencil-3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-6-O-[6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-2-[(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil]-2-desoxi-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosido de bencilo
- 30 Compuesto **77** 2-desoxi-6-O-[2-desoxi-2-(3S)-3-tetradecanamido-4-nonilamino-4-oxo-butanamido]-4-O-fosfono-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil]-3-O-[(3R)-3-hidroxitetradecanoil]-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-α/β-D-glucopiranosido de bencilo
- 35 Compuesto **78** 3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-2-desoxi-4,6-di-O-isopropiliden-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosido de bencilo
- 40 Compuesto **79** 3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosido de bencilo
- 45 Compuesto **80** 6-O-bencil-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosido de alilo
- 50 Compuesto **81** 6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosido de alilo
- 55 Compuesto **82** 6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α/β-D-glucopiranosida
- 60 Compuesto **83** Tricloroacetamidato de 6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosilo
- 65 Compuesto **84** 6-O-[6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-β-D-glucopiranosil]-3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosido de bencilo
- 70 Compuesto **85** 6-O-[6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-β-D-glucopiranosilo]-3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-2-desoxi-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-α-D-glucopiranosido de bencilo
- 75 Compuesto **86** 2-desoxi-6-O-[2-desoxi-4-O-fosfono-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-β-D-glucopiranosil]-3-O-[(3R)-3-hidroxitetradecanoil]-2-[(3R)-3-tetradecanoiloxitetradecanamido]-α/β-D-glucopiranosida
- 80 Compuesto **87** 2-desoxi-4,6-di-O-benciliden-3-O-[(3R)-3-dodeciltetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosido de alilo
- 85 Compuesto **88** 6-O-bencil-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-dodeciltetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosido de alilo
- 90 Compuesto **89** 6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-D-glucopiranosido de alilo
- 95 Compuesto **90** 6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-

		tricloroetoxicarbonilamino)- α/β -D-glucopiranosil
5	Compuesto 91	Tricloroacetamidato de 6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranosilo
	Compuesto 92	6-O-(6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- β -D-glucopiranosil)-3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranosido de bencilo
10	Compuesto 93	6-O-(6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-2-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanamido]- β -D-glucopiranosilo)-3-O-[(3R)-3-benciloxitetradecanoil]-2-desoxi-2-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanamido]- α -D-glucopiranosido de bencilo
15	Compuesto 94	2-desoxi-6-O-{2-desoxi-4-O-fosfono-2-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil}-3-O-[(3R)-3-hidroxitetradecanoil]-2-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanamido]- α/β -D-glucopiranosil
20	Compuesto 95	3-O-bencil-2-desoxi-4,6-di-O-isopropiliden-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranosido de bencilo
	Compuesto 96	3-O-bencil-2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranosido de bencilo
	Compuesto 97	2-amino-3-O-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de bencilo
25	Compuesto 98	3-O-bencil-2-desoxi-2-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-tetradecanamido)- α -D-glucopiranosido de bencilo
30	Compuesto 99	3-O-bencil-6-O-{6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- β -D-glucopiranosil}-2-desoxi-2-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-tetradecanamido)- α -D-glucopiranosido de bencilo
35	Compuesto 100	6-O-{2-amino-6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-O-D-glucopiranosil}-3-O-bencil-2-desoxi-2-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-tetradecanamido)- α -D-glucopiranosido de bencilo
40	Compuesto 101	3-O-bencil-6-O-{6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-2-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil}-2-desoxi-2-[(3R)-3-(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-tetradecanamido)- α -D-glucopiranosido de bencilo
45	Compuesto 102	2-desoxi-6-O-{2-desoxi-4-O-fosfono-2-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil}-2-[(3R)-3-(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-tetradecanamido)- α/β -D-glucopiranosil
	Compuesto 103	3-O-bencil-6-O-{6-O-bencil-4-O-(di-O-bencil-fosfono)-2-desoxi-2-[(3R)-3-benciloxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil}-2-desoxi-2-[(3R)-3-(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-tetradecanamido)- α -D-glucopiranosido de bencilo
50	Compuesto 104	2-desoxi-6-O-{2-desoxi-4-O-fosfono-2-[(3R)-3-hidroxitetradecanamido]-3-O-[(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]- β -D-glucopiranosil}-2-[(3R)-3-(3R)-3-dodeciloxitetradecanoil]-tetradecanamido)- α/β -D-glucopiranosil

Tabla 8 Códigos de una sola letra y de tres letras de aminoácidos

Aminoácido	Código de una sola letra	Código de tres letras
L-alanina	A	Ala
L-cisteína	C	Cys
L-aspartato	D	Asp
L-glutamato	E	Glu
L-fenilalanina	F	Phe
L-glicina	G	Gly
L-histidina	H	His
L-isoleucina	I	Ile
L-lisina	K	Lys
L-leucina	L	Leu

Tabla 8 (Continuación)

Aminoácido	Código de una sola letra	Código de tres letras
L-metionina	M	Met
L-asparajina	N	Asn
L-prolina	P	Pro
L-glutamina	Q	Gln
L-arginina	R	Arg
L-serina	S	Ser
L-treonina	T	Thr
L-valina	V	Val
L-triptófano	W	Trp
L-tirosina	Y	Tyr

Referencias

- 5
- 1
- a) Stryer, *Biochemistry*, 2nd Ed. W. H. Freeman and Co., New York, p74, 1981.
- 10 b) Christian H. R. Raetz, *International Patent*, WO 86/05687, 1986.
- 2
- 15 a) E. Th. Rietschel, L. Brade, B. Lindner, y U. Zähringer, 1992. *Biochemistry of lipopolysaccharides*. In: pp. 3-41, D. C. Morrison y J. L. Ryan (eds.), *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Volume I, Molecular Biochemistry and Cellular Biology*, CRC Press, Boca Raton. Ann Arbor, London, Tokyo.
- b) H. Takada and S Kotani, 1992. Structure-function relationships of Lipid-A. In: pp.107-134. *ibid*
- 20 3
- a) M. Imoto, S. Kusumoto, T. Shiba, E. T. Rietschel, C. Galanos, y O. Lüderitz, *Tetrahedron Lett.* 1985, 26, 907-908.
- 25 b) M. Imoto, H. Yoshimura, N. Sakaguchi, S. Kusumoto, T. Shiba, *Tetrahedron Lett.* 1985, 26, 1545-1548.
- 4
- 30 a) E. T. Rietschel, H. -W. Wollenweber, H. Brade, U. Zähringer, B. Lindner, U. Seydel, H. Bradaczek, G. Barnickel, H. Labishinski, y P. Giesbrecht. 1984. Structure and conformation of the lipid A component of lipopolysaccharides, pp. 187-220. In E. R. Rietschel (ed.), *Handbook of Endotoxin*, vol. 1. Chemistry of endotoxin. Elsevier Science Publishers, Amstredam.
- b) E. T. Rietschel, H.-W. Wollenweber, R. Russa, H. Brade, y U. Zähringer. *Rev. Infect. Dis.* 1984, 6, 432-438.
- 35 c) U. Seydel, B. Lindner, H.-W. Wollenweber, y E. T. Rietschel, *Eur. J. Biochem.* 1984, 145, 505-509.
- d) S. M. Strain, I. M. Armitage, L. Anderson, K. Takayama, N. Qureshi, y C. R. H. Raetz. *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 16089-16098.
- 40 5
- a) H. Takada, S Kotani, *CRC Critic. Rev. Microbiol.* 1989, 16, 477-523.
- 45 b) E. Ribí, K. Amano, J. L. Cantrell, S. M. Schwartzman, R. Parker y K. Takayama, *Cancer Immunol. Immunother.* 1982, 12, 91-102.
- 6 S. Kotani *et al*, *Infect. Immun.* 1986, 52(3), 872-884.
- 7
- 50 a) S. Kotani *et al*, *Infect. Immun.* 1986, 54, 673.
- b) M. Kiso, S. Tanaka, M. Tanahashi, Y. Fujishima, Y. Ogawa, y A. Hasagawa, *Carbohr. Res.* 1986, 148, 221.

8

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

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

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

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

10

11

a) Georges H. Wemer y Pierre Jollès, *Eur. J. Biochem*, 1996, 242, 1-19.

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

c) Keat R. Myerr, Alex T. Trachet, Patente US nº 4.912.094, 1990.

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

20

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

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

25

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

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

30

16 K. Takayama, N. Qureshi, E. Ribí, J. L. Cannell, y K. Amano. 1983. Use of endotoxin in cancer immunotherapy and characterization of its nontoxic but active lipid A components. In: pp. 219-233. L. Anderson y F. M. Unger (eds.), *Bacterial lipopolysaccharides*, American Chemical Society, Washington, D. C.

35 17 K. Von Esehen. 1992. Monophosphoryl lipid A and immunotherapy. In: D. C. Morrison y J. L. Ryan (eds.), *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Volume II, Immunopharmacology and pathophysiology*, CRC Press, Boca Raton. Ann Arbor, London, Tokyo.

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

40

19 W. J. Christ, T. Kawata, L. D. Hawkins, S. Kobayashi, O. Asano, y D. P. Rossignol Patente europea EP-536 969-A2. Dement Publications. Ltd.

20 Byung-Hee Han y Philip Boudjouk, *J. Org. Chem.* 1982, 47, 5030-5032.

45

21

a) Martine Demary, Germain Puzo, y Jean Asselineau, *Nouv. J. Chim*, 1978, 2, 373 378.

50 b) William J. Gottstein y Lee C. Cheney, *J. Org. Chem.* 1965, 30, 2072-2073.

22 Makoto Kiso, Shinji Tanaka, Masanori Tanahashi, Yushun Fujishima, Yuji Ogawa y Akira Hasagawa, *Carbohydr. Res.* 1986, 148, 221-234.

55 23 Makoto Kiso, Shinji Tanaka, Minoru Fujita, Yushun Fujishima, Yuji Ogawa, Hideharu Ishida y Akira Hasagawa, *Carbohydr. Res.* 1987, 162, 127-140.

24 Masahiro Imoto *et al*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1987, 60, 2197-2204.

60 25

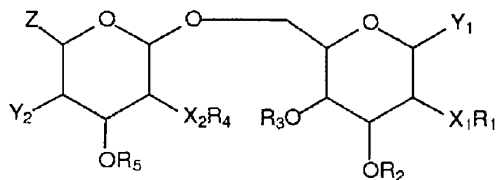
a) Prabhakar K. Jadhav, Mary E. Neville, Robert C. Newton, Subramaniam Sabesan Patente US nº 5.158.941, 1992

65 b) Prabhakar K. Jadhav, Krishna S. Bhat, P. Thirumalai Perumal y Herbert C. Brown, *J. Org. Chem.* 1986, 51, 432-439.

- c) Stephen Hanessian, Ashok Tehim, Ping Chen, *J. Org. Chem.* 1993, 58, 7768-7781.
- 5 26 Bruno Tse, Charles M. Blazey, Ben Tu y James Balkovec, *J. Org. Chem.* 1997, 62, 3236-3241.
- 27 James A. Dale y Harry S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* 1973, 95, 512-519.
- 28 Gunter Shiite y Thomas Ziegler, *Liebigs Ann.* 1996, 1599-1607.
- 10 29 Gunter Shiite y Thomas Ziegler, *Tetrahedron*, 1996, 52, 2925-2936.
- 30 Willi Bannwarth y Arnold Trzeciak, *Helv. Chim. Acta*, 1987, 70, 175-196.
- 15 31 Tomoya Ogawa y Satoru Nakabayashi, *Carbohydr. Res.* 1981, 97, 81-86.

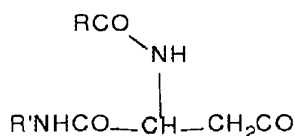
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula siguiente:



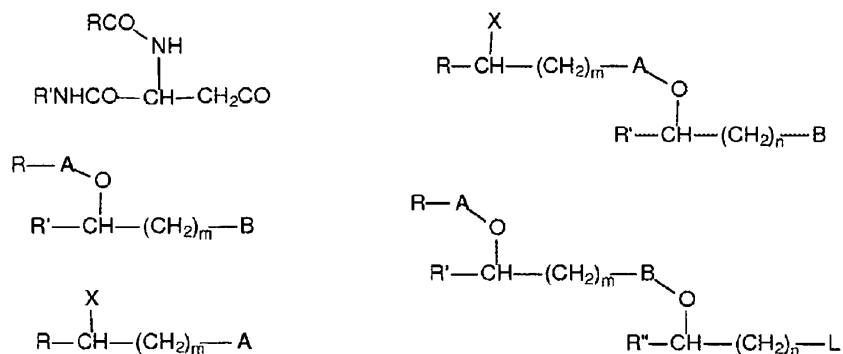
5

en la que por lo menos uno de entre R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ es la estructura siguiente



10

en la que los R₁, R₂, R₃, R₄ y/o R₅ restantes, si existen, se seleccionan de entre el grupo constituido por hidrógeno, -R, -COR y las estructuras siguientes



15

en las que cada R, R', R'' se selecciona independientemente para que sea un hidrógeno, o un hidrocarburo alifático C₁₋₂₀ sustituido o insustituido, ramificado o lineal, saturado o insaturado;

A, B y L se seleccionan independientemente de entre el grupo constituido por grupos -CH₂-, -C(=O)- y -C(=S)-;

cada X se selecciona independientemente de entre el grupo constituido por -OH, -SH, -NH₂ y -halógeno;

m y n se seleccionan independientemente de entre el intervalo de números enteros entre 0 y 10 inclusive,

25

X₁ y X₂ son -O- o -NH-,

Y₁ e Y₂ se seleccionan independientemente de entre el grupo constituido por -OH, -OP(O)(OH)₂, -COOH, -OSO₃H, -CH(COOH)₂ y -OP(O)(OH)(OCH₂CH₂NH₂),

30

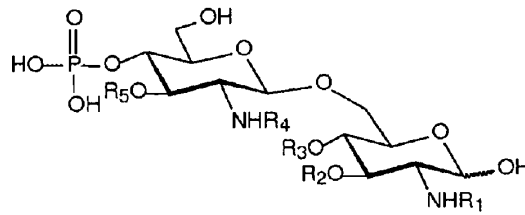
Z es H, -CH₂E o -CH₂MG, en la que E es -hidrógeno, -halógeno, -OH, -NH₂, -OSO₃H, -SO₃H, -P(O)(OH)₂ o -OP(O)(OH)₂; M es -O-, -S-, -OC(=O)-, -OC(=S)-, o -NHC(=O)-; G es un -hidrógeno, o un hidrocarburo alifático C₁₋₂₀ sustituido o insustituido, ramificado o lineal, saturado o insaturado,

35 o una sal fisiológicamente aceptable de la misma.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X₁ y X₂ son -NH-; Y₁ es -OH o -OP(O)(OH)₂; Y₂ es -OH o -OP(O)(OH)₂; y Z es -CH₂OH.

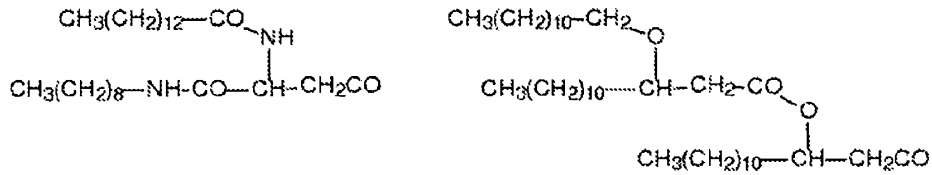
40

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que los grupos de sustitución y la estereoquímica de las sustituciones en los anillos de azúcar están definidas por la fórmula siguiente:

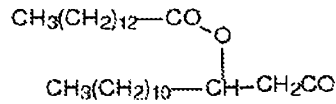


4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que por lo menos uno de entre R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 se selecciona de entre los grupos siguientes

5

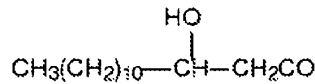


5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que R_1 y R_5 son un grupo de la estructura siguiente



10

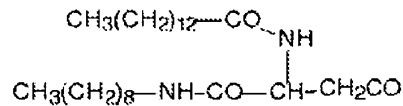
y R_2 es un átomo de hidrógeno o el grupo siguiente



15

R_3 es un átomo de hidrógeno;

y R_4 es un grupo de la estructura siguiente

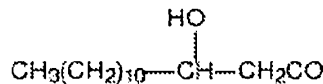


20

6. Compuesto según la reivindicación 5, en el que R_2 es un átomo de hidrógeno, y la configuración absoluta de los carbonos quirales en el grupo R_1 y R_5 es (R), mientras que en el grupo R_4 es (S).

25

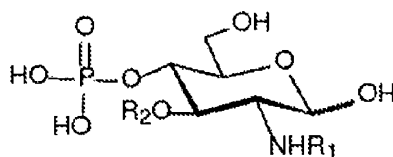
7. Compuesto según la reivindicación 5, en el que R_2 es un grupo de la estructura siguiente



30

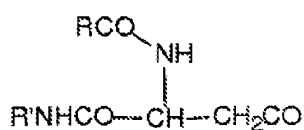
y la configuración absoluta de los carbonos quirales en el grupo R_1 , R_2 y R_5 es (R), mientras que en el grupo R_4 es (S).

8. Compuesto de la fórmula siguiente:



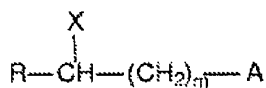
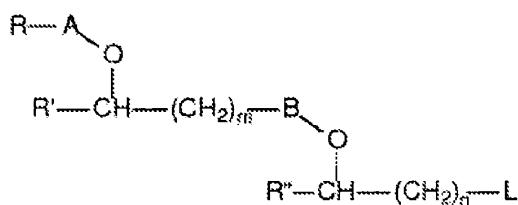
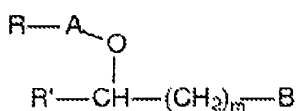
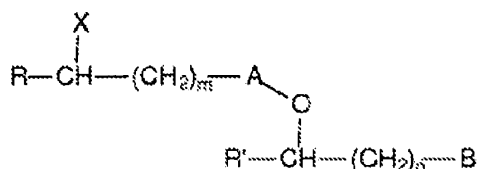
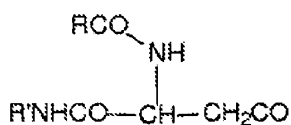
35

en la que por lo menos uno de entre R_1 y R_2 es el grupo siguiente



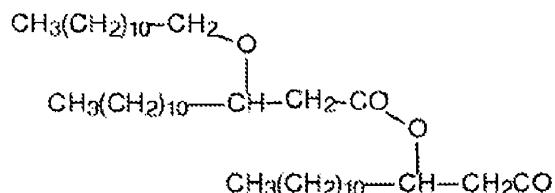
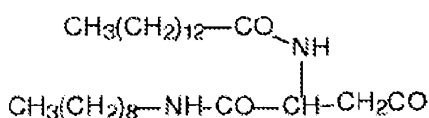
en la que cada R y R' es independientemente un hidrógeno, un hidrocarburo alifático C₁₋₂₀ sustituido o insustituido, ramificado o lineal, saturado o insaturado.

5 siendo el R₁ o R₂ restante seleccionado de entre hidrógeno, grupo -R, -COR o las estructuras siguientes

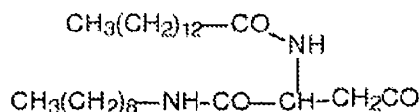


10 en las que cada R, R', R'' es independientemente un hidrógeno, un hidrocarburo alifático C₁₋₂₀ sustituido o insustituido, ramificado o lineal, saturado o insaturado; A, B y L son independientemente grupos CH₂, CO y CS; X es -OH, -SH, -NH₂ y halógeno, m y n son números enteros entre 0 y 10 inclusive.

15 9. Compuesto según la reivindicación 8, en el que por lo menos uno de entre R₁ y R₂ se selecciona de entre las estructuras siguientes



20 10. Compuesto según la reivindicación 9, en el que R₁ es un grupo de la estructura siguiente

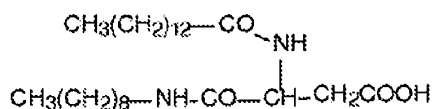


25 y R₂ es un grupo de la estructura siguiente

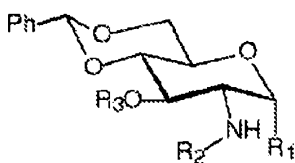


30 11. Compuesto según la reivindicación 10, en el que la configuración absoluta del carbono quiral en el grupo R₁ es (S).

12. Compuesto de la estructura siguiente

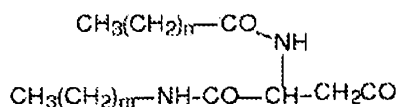


35 13. Compuesto de la fórmula siguiente



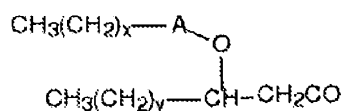
en la que R₁ es un grupo de benciloxi, aliloxi, hidroxilo u OC(NH)CCl₃;

- 5 R₂ se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, -COOCH₂CCl₃, o la estructura siguiente



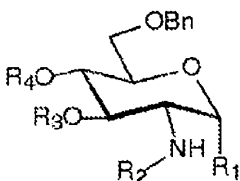
en la que m y n son números enteros seleccionados independientemente que presentan unos valores entre 0 y 20;

- 10 y R₃ es CH₃(CH₂)₂CO o la estructura siguiente



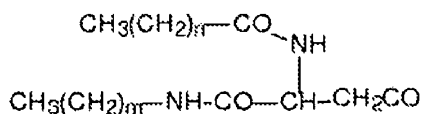
- 15 en la que A es -CH₂- o -C(=O)-, y x, y y z son números enteros seleccionados independientemente que presentan unos valores entre 0 y 20.

14. Compuesto de la fórmula siguiente



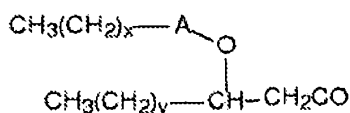
- 20 en la que R₁ es un grupo de benciloxi, aliloxi, hidroxilo, u OC(NH)CCl₃;

- 25 R₂ se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, COOCH₂CCl₃, o



en la que m y n son números enteros independientes que presentan unos valores entre 0 y 20;

- 30 R₃ es CH₃(CH₂)₂CO o la estructura siguiente

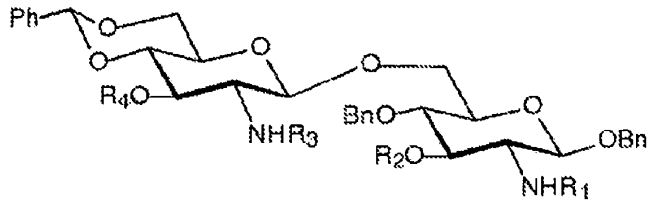


en la que A es -CH₂- o -C(=O)-;

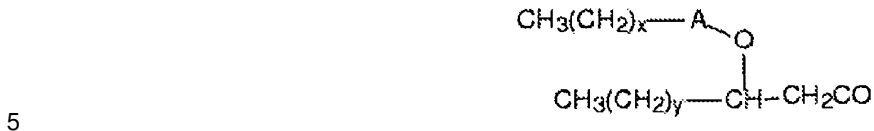
- 35 x, y y z son números enteros seleccionados independientemente que presentan unos valores entre 0 y 20; y

R₄ es hidrógeno o P(O)(OBn)₂.

- 40 15. Compuesto de fórmula siguiente:

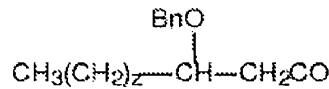


en la que R₁ es un grupo de la estructura siguiente



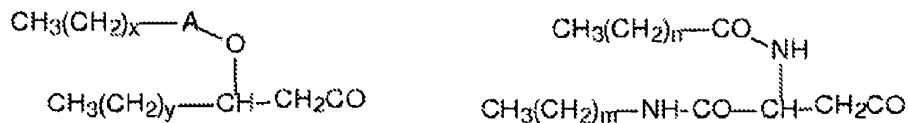
en la que A es -CH₂- o -C(=O)-; x e y son números enteros seleccionados independientemente que presentan unos valores entre 0 y 20;

10 R₂ es hidrógeno, alilo, bencilo o la estructura siguiente



en la que z es un número entero entre 0 y 20;

15 R₃ es hidrógeno, COOCH₂CCl₃, o una de las estructuras siguientes



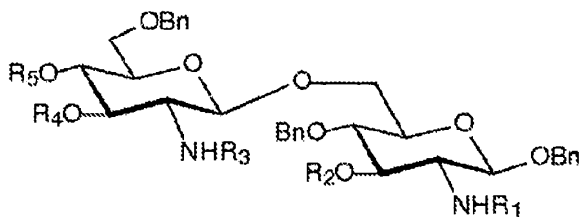
20 en la que A es -CH₂- o -C(=O)-; m, n, x e y son números enteros seleccionados independientemente que presentan unos valores entre 0 y 20;

R₄ es un grupo de la estructura siguiente



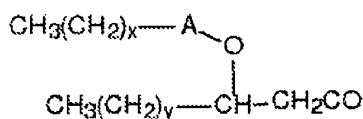
en la que A es -CH₂- o -C(=O)-; x e y son números enteros seleccionados independientemente que presentan unos valores entre 0 y 20.

30 16. Compuesto de fórmula siguiente:



en la que R₁ es un grupo de la estructura siguiente

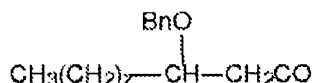
35



en la que A es -CH₂- o -C(=O)-; x e y son números enteros seleccionados independientemente que presentan unos valores entre 0 y 20;

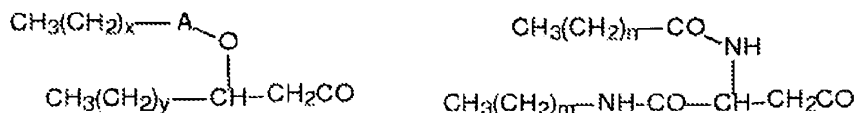
5

R₂ es hidrógeno, alilo, bencilo o la estructura siguiente



10 en la que z es un número entero entre 0 y 20;

R₃ es hidrógeno, COOCH₂CCl₃, o una de las estructuras siguientes

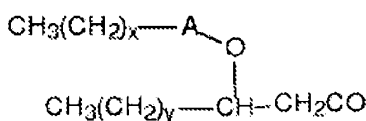


15

en la que A es -CH₂- o -C(=O)-; m, n, x e y son números enteros seleccionados independientemente que presentan unos valores entre 0 y 20;

R₄ es un grupo de la estructura siguiente

20



en la que A es -CH₂- o -C(=O)-; x e y son números enteros seleccionados independientemente que presentan unos valores entre 0 y 20;

25

R₅ es hidrógeno o (BnO)₂P(O).

17. Liposoma no natural cuya membrana comprende: (a) un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 anteriores; y (b) por lo menos un epítipo.

30

18. Liposoma según la reivindicación 17, en el que por lo menos un epítipo es un epítipo de linfocito B.

19. Liposoma según la reivindicación 17, en el que por lo menos un epítipo es un epítipo de linfocito T.

35

20. Liposoma según la reivindicación 17, en el que por lo menos un epítipo es un epítipo peptídico.

21. Liposoma según la reivindicación 17, en el que por lo menos un epítipo es un epítipo de carbohidrato, glucopéptido o glucolípido.

40

22. Composición farmacéutica que comprende un liposoma según la reivindicación 17, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz desde un punto de vista vacunal de dicho epítipo.

23. Liposoma según la reivindicación 17, en el que dicho epítipo es un epítipo asociado a un tumor.

45

24. Liposoma según la reivindicación 17, en el que por lo menos un epítipo es un epítipo de MUC1.

25. Liposoma según la reivindicación 24, en el que el epítipo es proporcionado por un péptido o lipopéptido que presenta la secuencia de aminoácidos siguiente

50



26. Liposoma según la reivindicación 24 para su utilización en la prevención o el tratamiento de una enfermedad que puede prevenirse o tratarse provocando una respuesta inmunitaria a dicho epítipo.

27. Liposoma según la reivindicación 26, en el que dicho análogo de lípido A presenta un efecto adyuvante sobre la respuesta inmunitaria a dicho epítipo.

5 28. Liposoma según la reivindicación 26 ó 27, en el que dicha enfermedad es un cáncer.

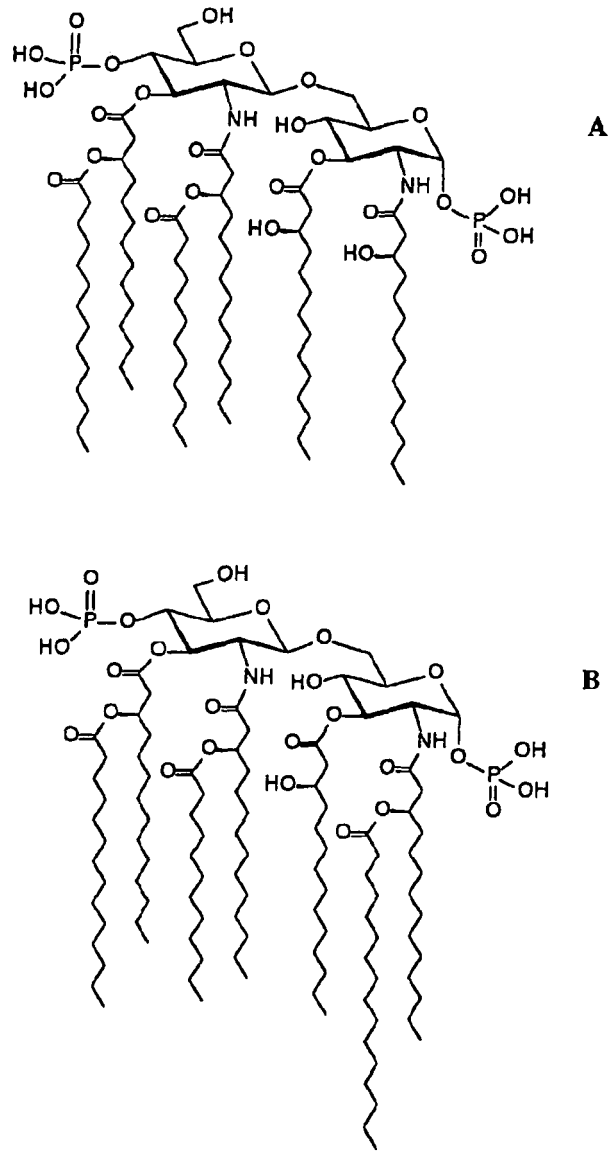


FIG. 1 Ejemplos de estructuras de lípido A natural, cepas A de *E. coli* y B de *Salmonella*

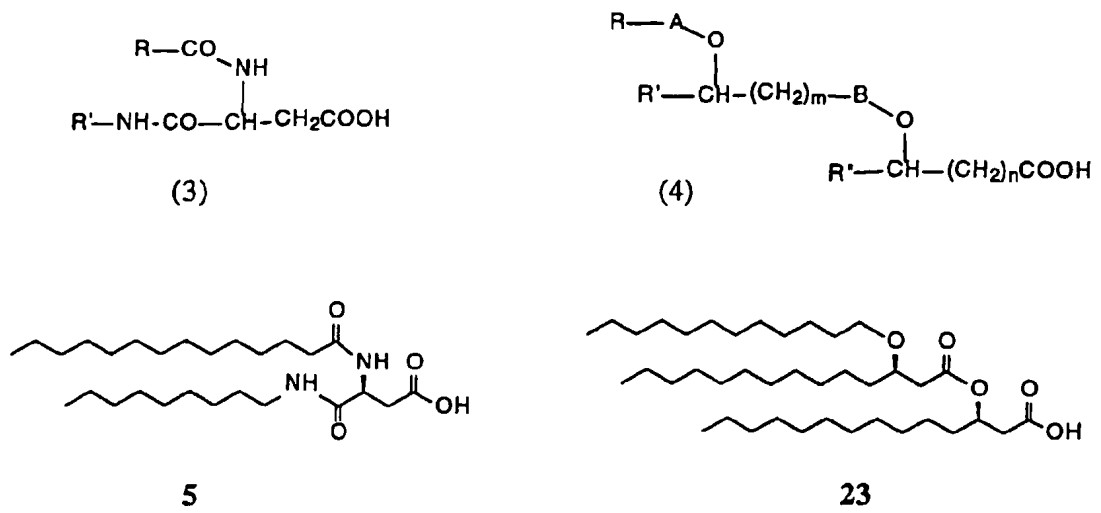
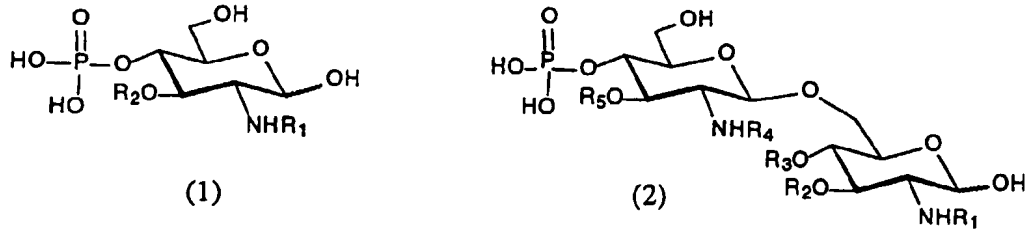


FIG. 2 Nuevos ácidos lipídicos (3) y (4) y dos ejemplos de los mismos



por lo menos uno de entre R1, R2, R3, R4 y R5 tiene la estructura (I) o (II) de lípido

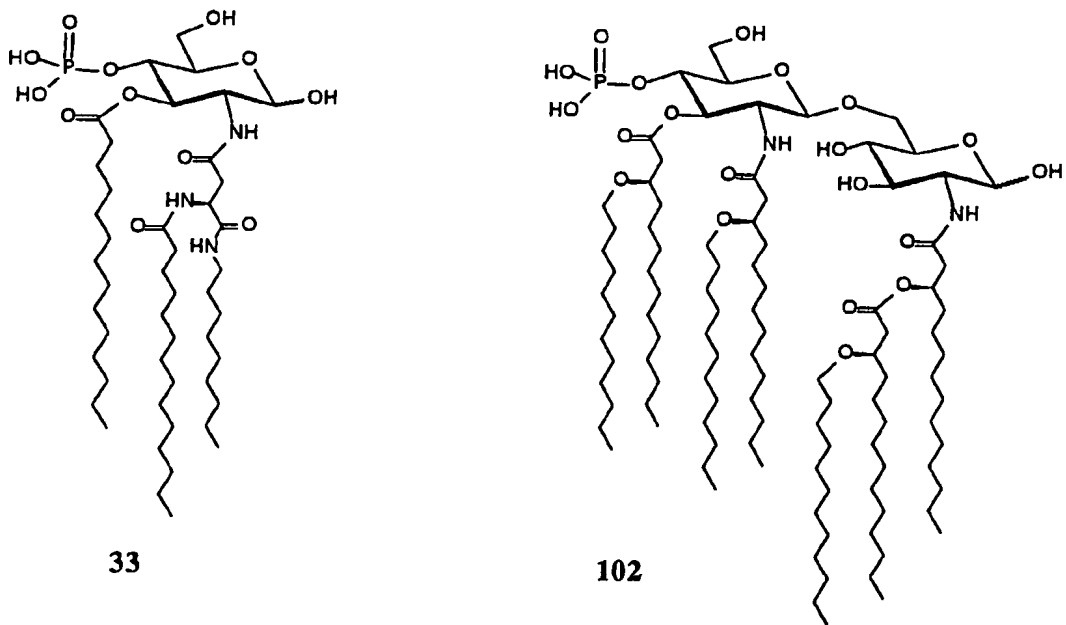
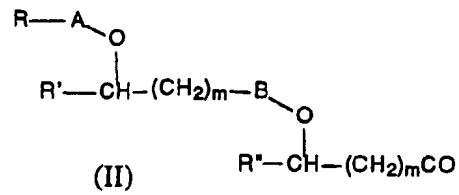
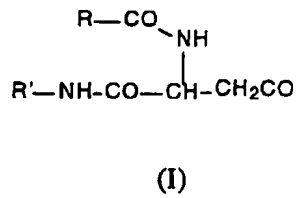
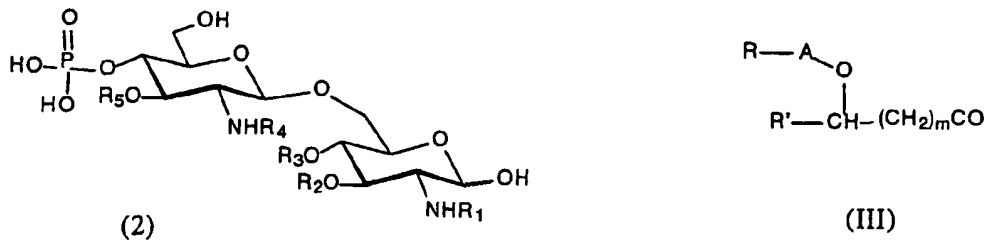


FIG. 3 Análogos de lípido A monosacáridos y disacáridos que contienen nuevas estructuras lipídicas y dos ejemplos de los mismos



R1, R4 y R5 tienen el mismo grupo de sustitución de estructura (III) (II)

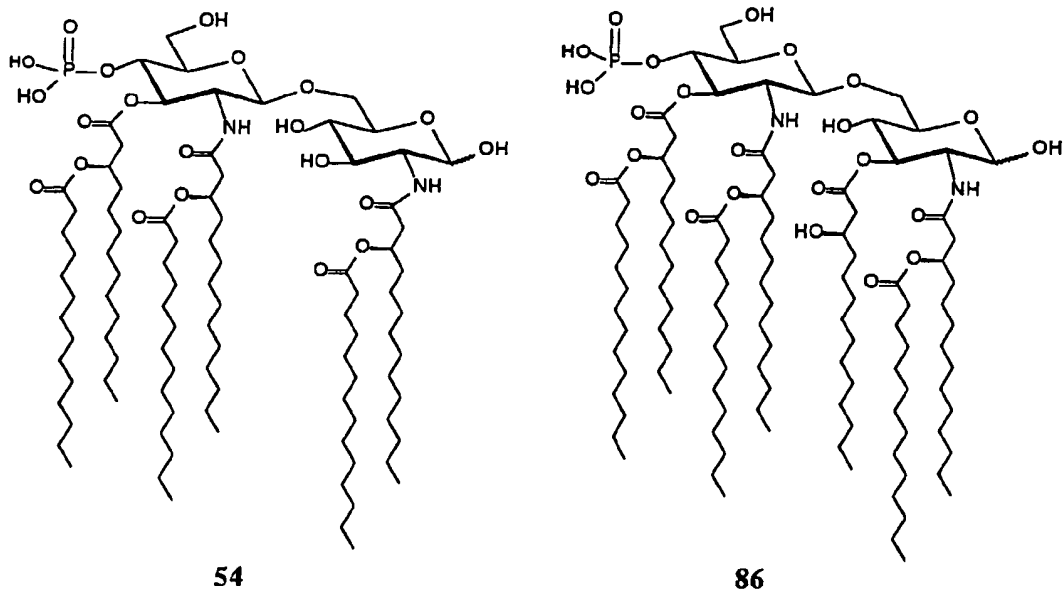


FIG. 4 Análogos de lípido A de disacárido que contienen cadenas dilípídicas uniformes y dos ejemplos de los mismos

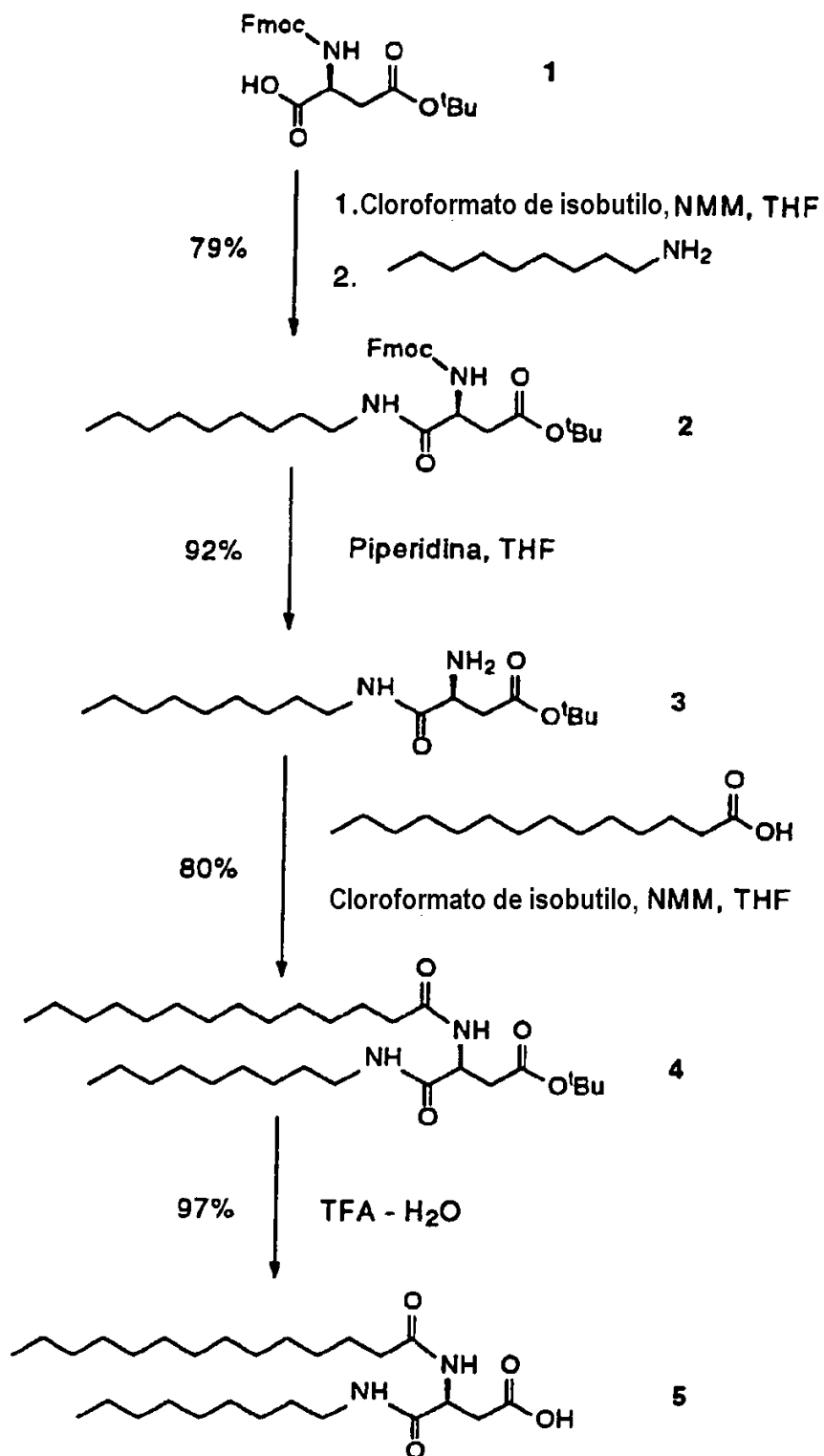


FIG. 5 Síntesis de lípido 5

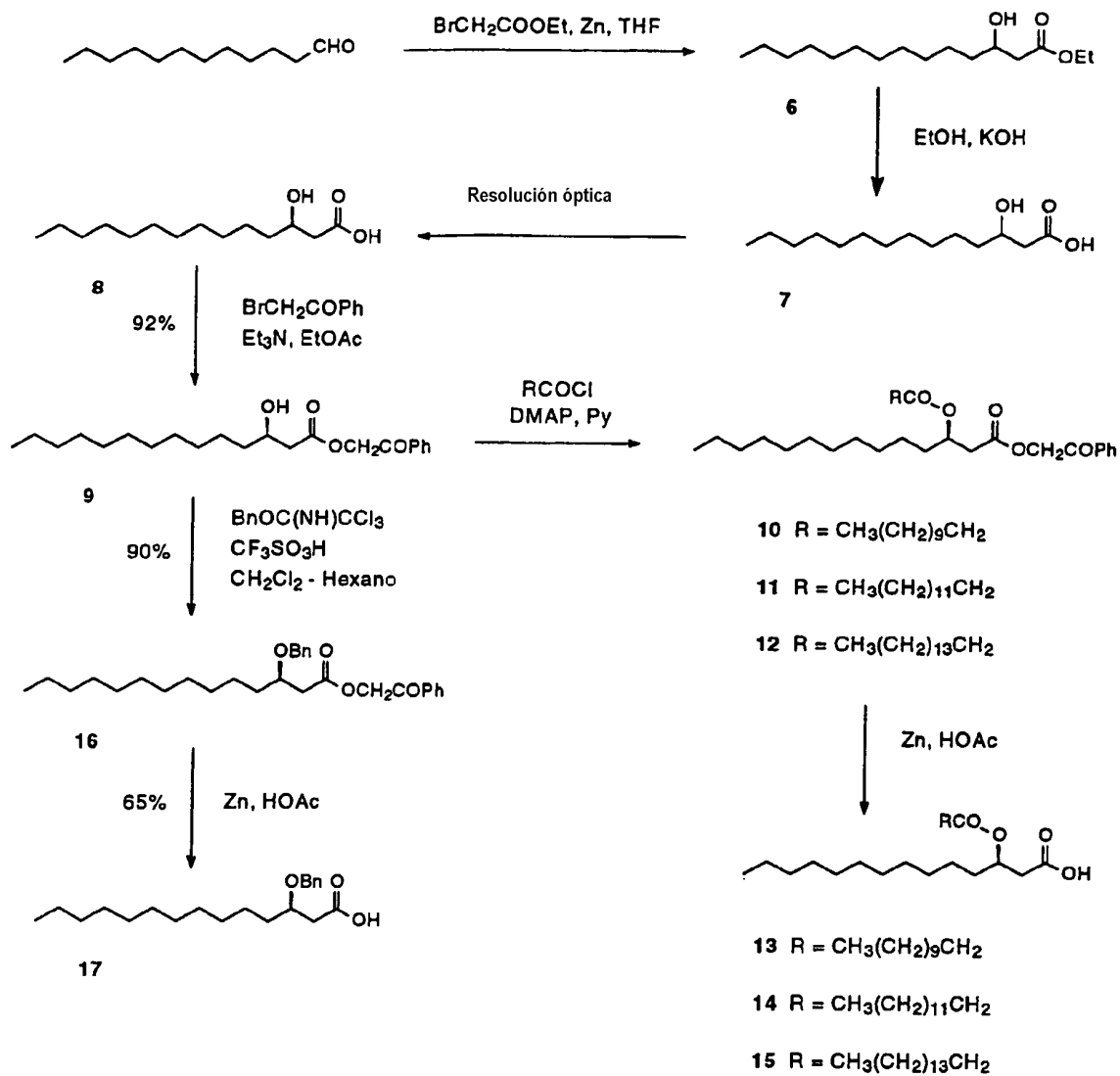


FIG. 6 Síntesis de lípidos

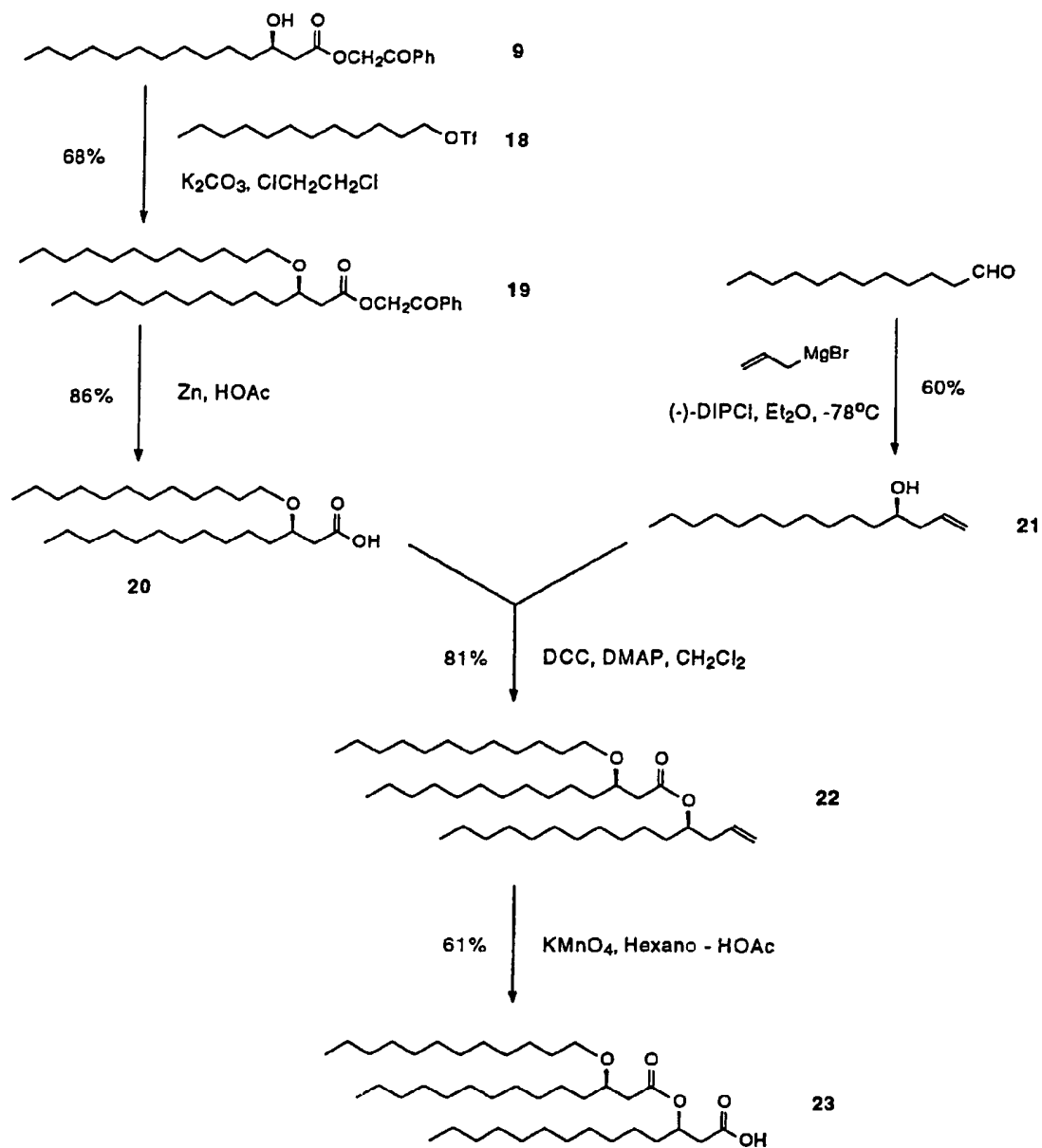


FIG. 7 Síntesis de tri-lípido 23

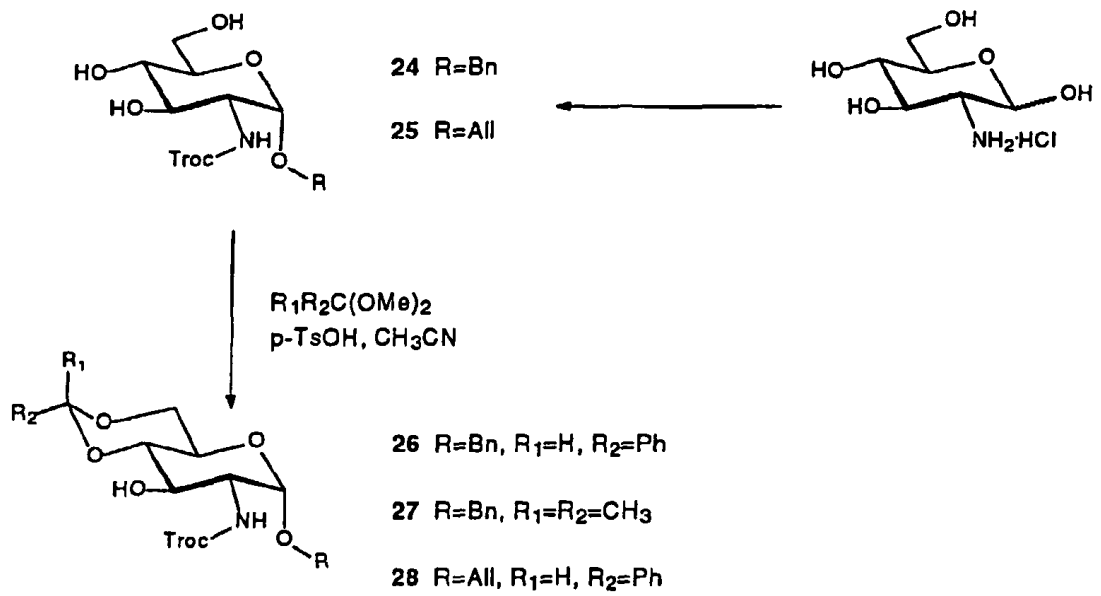


FIG. 8 Síntesis de derivados de glucosamina

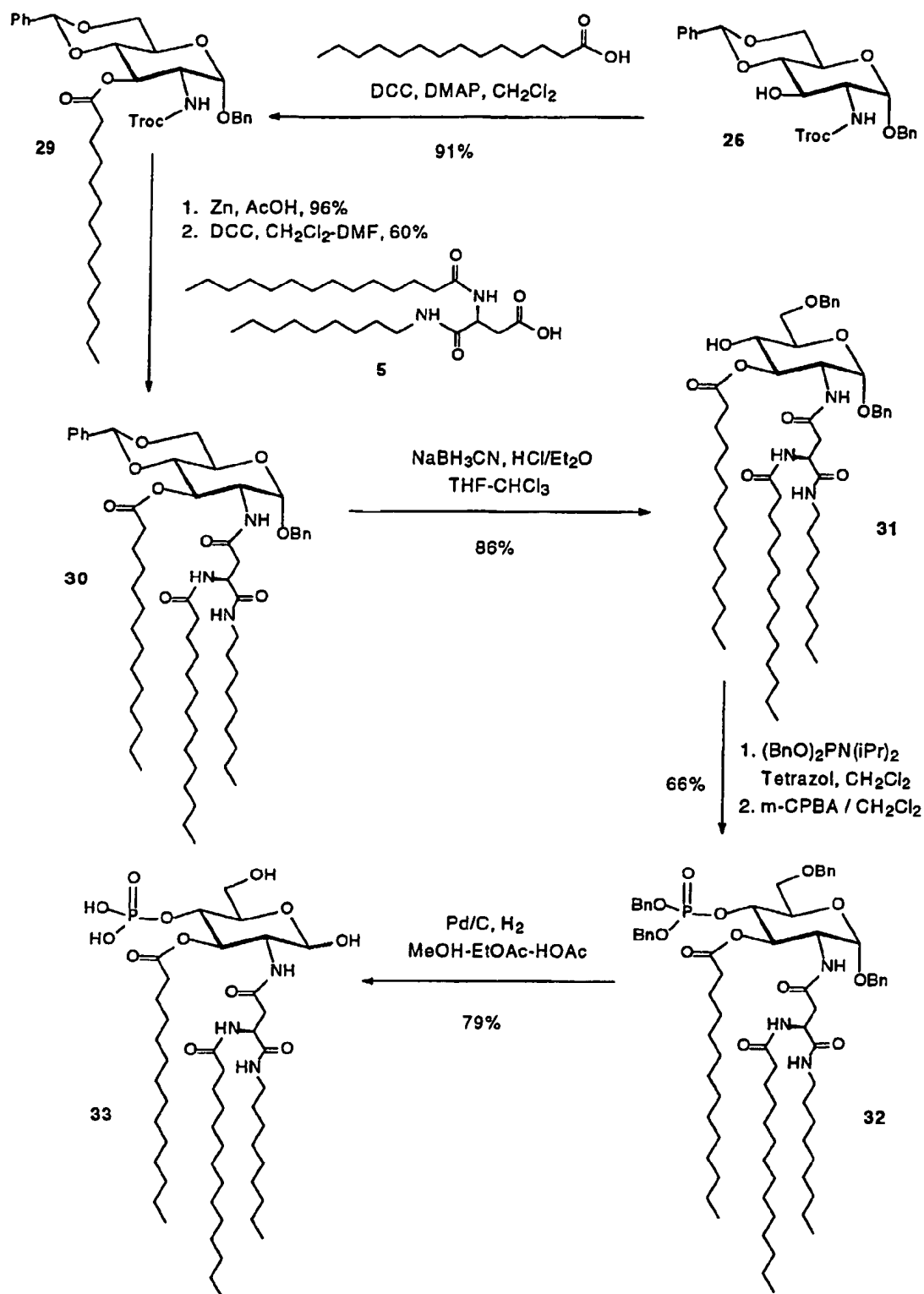


FIG. 9 Síntesis del compuesto 33

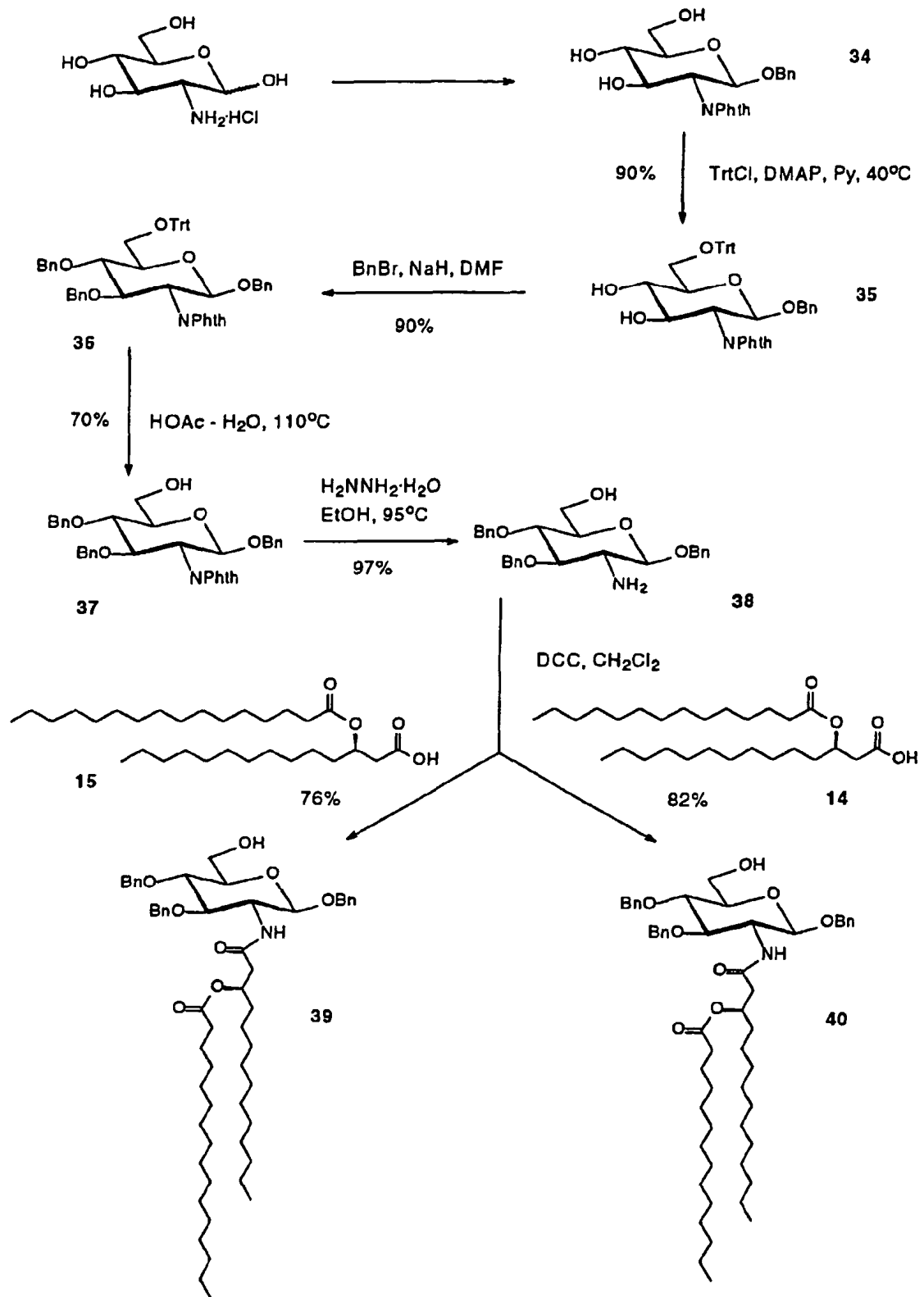


FIG. 10 Síntesis de aceptores de glucosilación

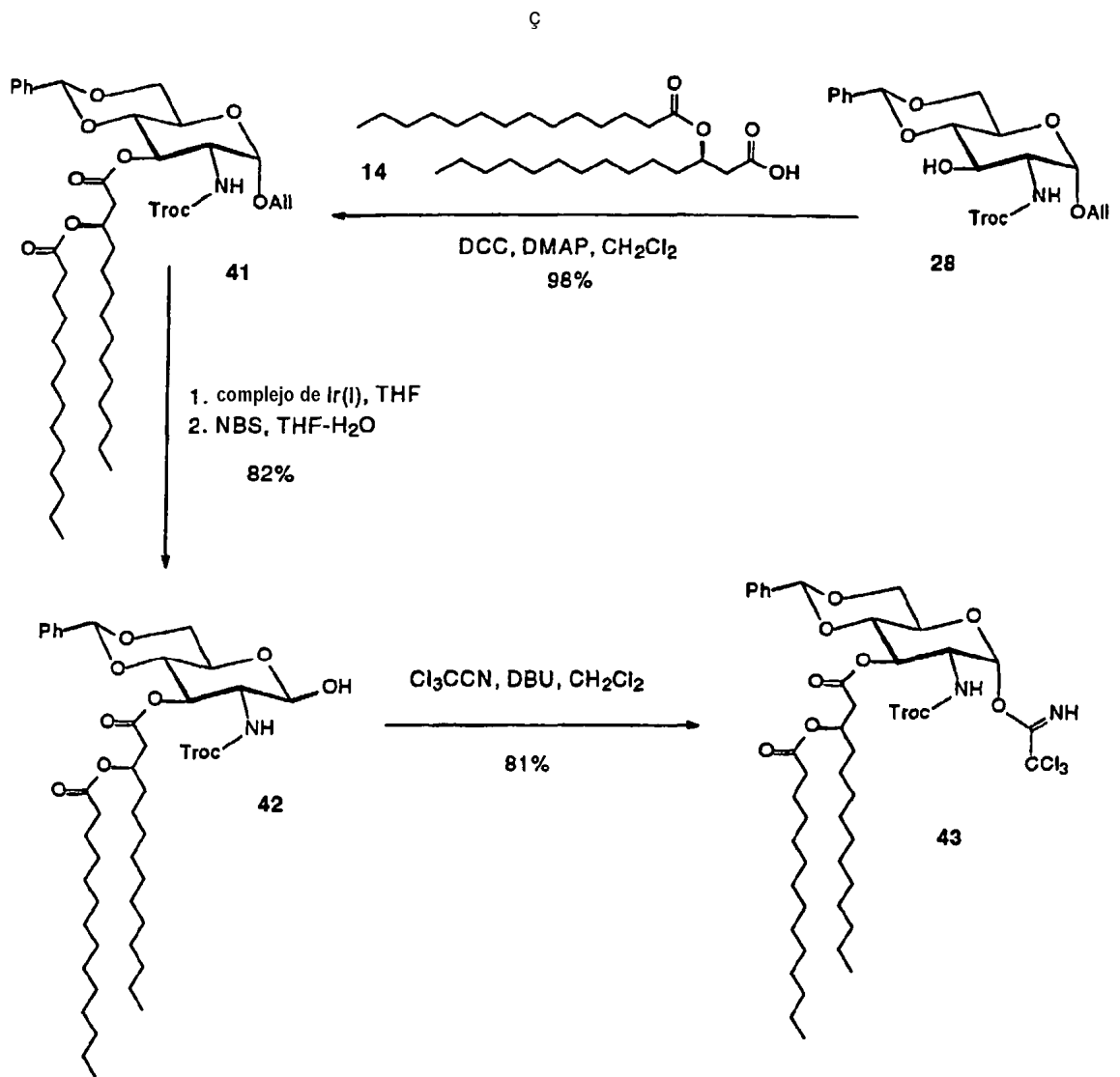


FIG. 11 Síntesis del donante de glucosilación 43

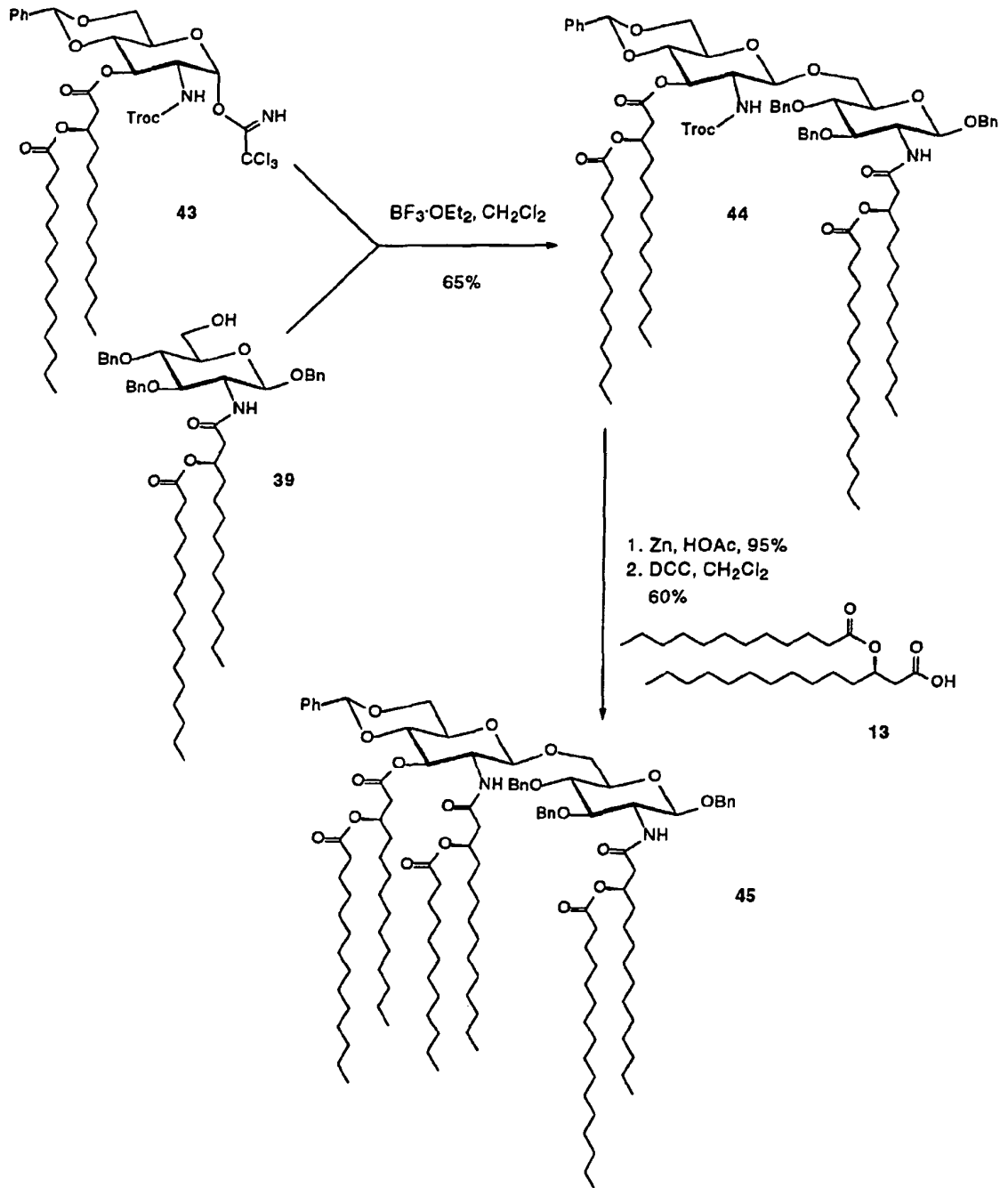


FIG. 12 Síntesis de disacárido 45

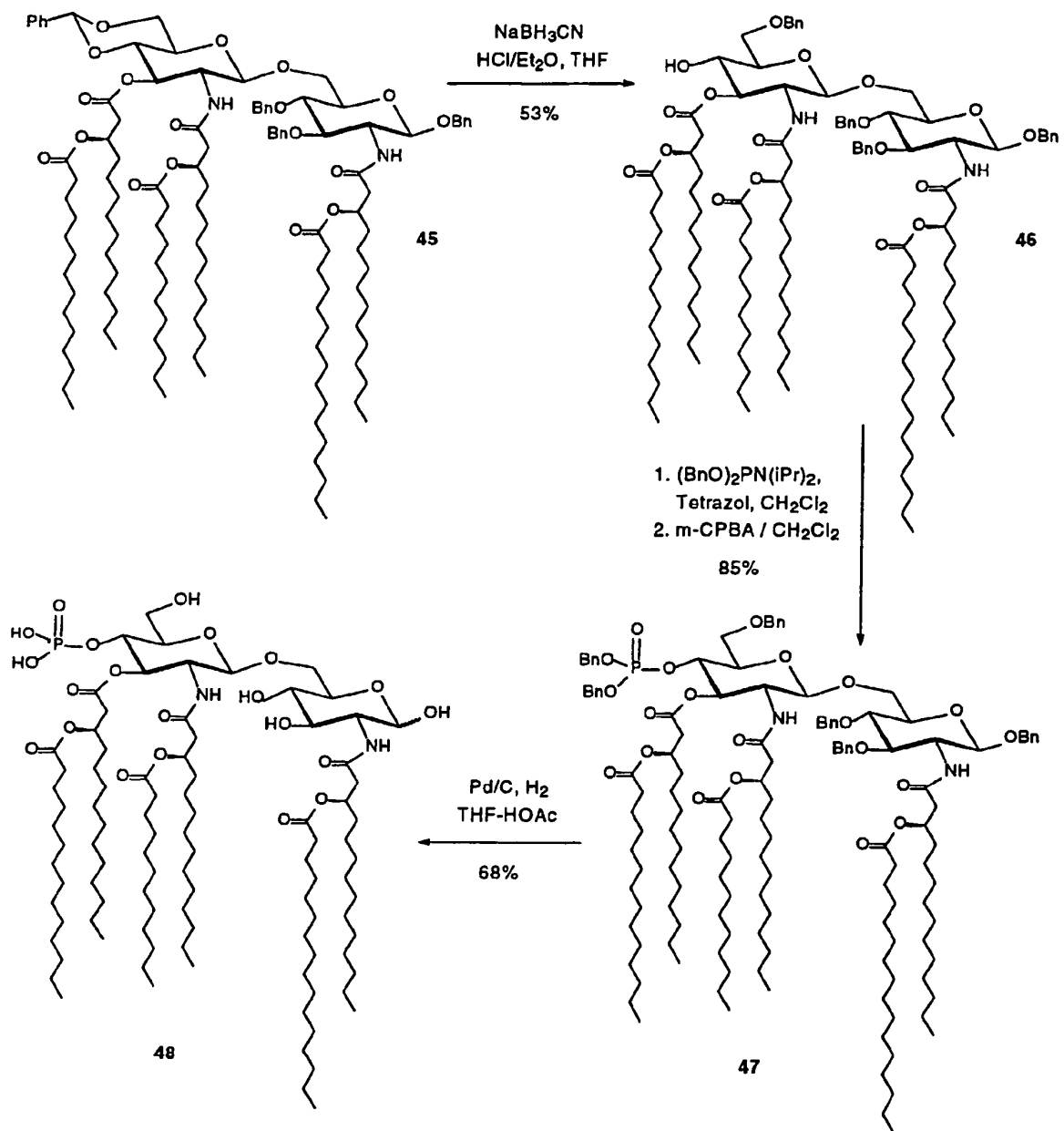


FIG. 13 Síntesis del compuesto 48

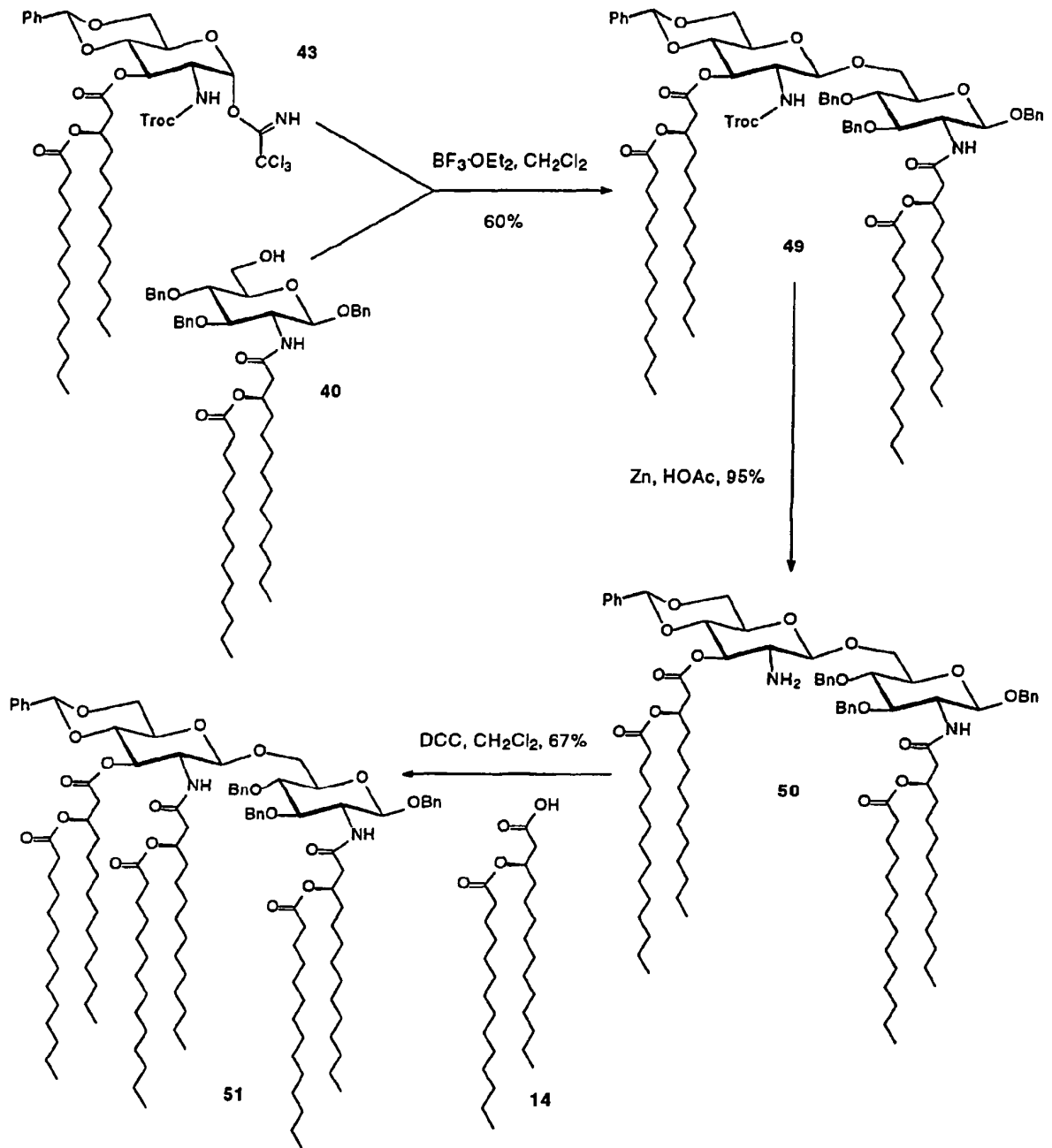


FIG. 14 Síntesis de disacárido 51

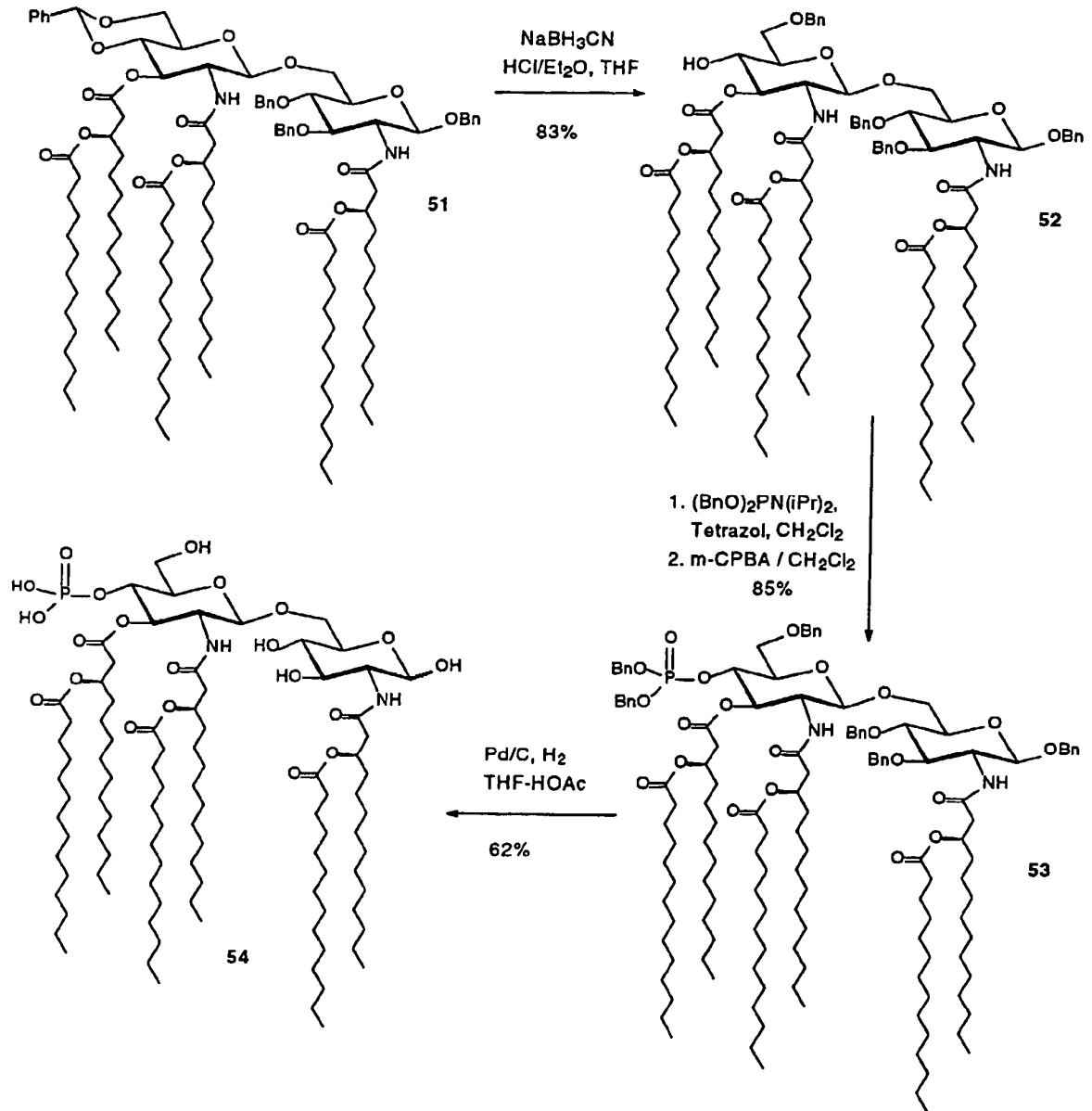


FIG. 15 Síntesis del compuesto 54

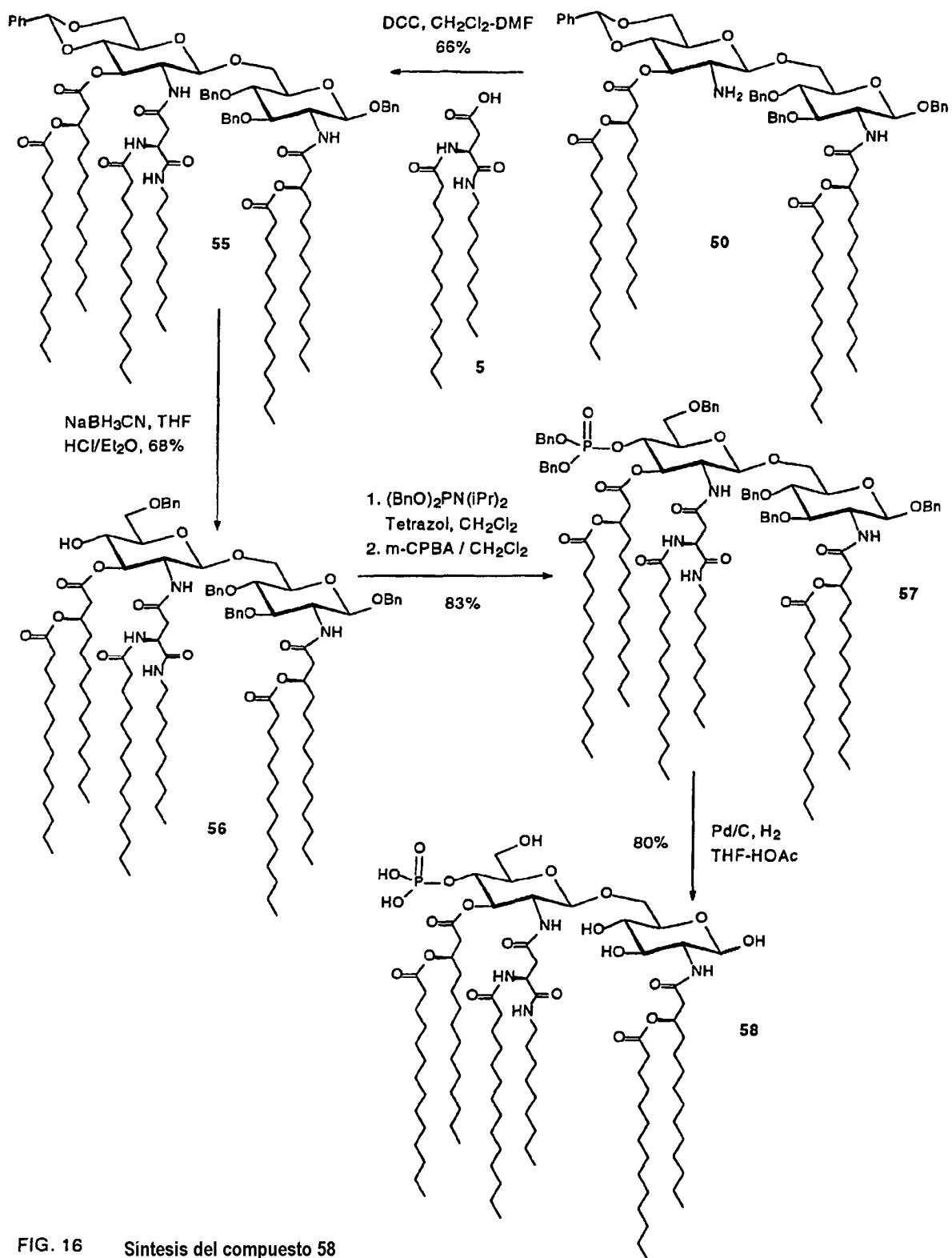


FIG. 16 Síntesis del compuesto 58

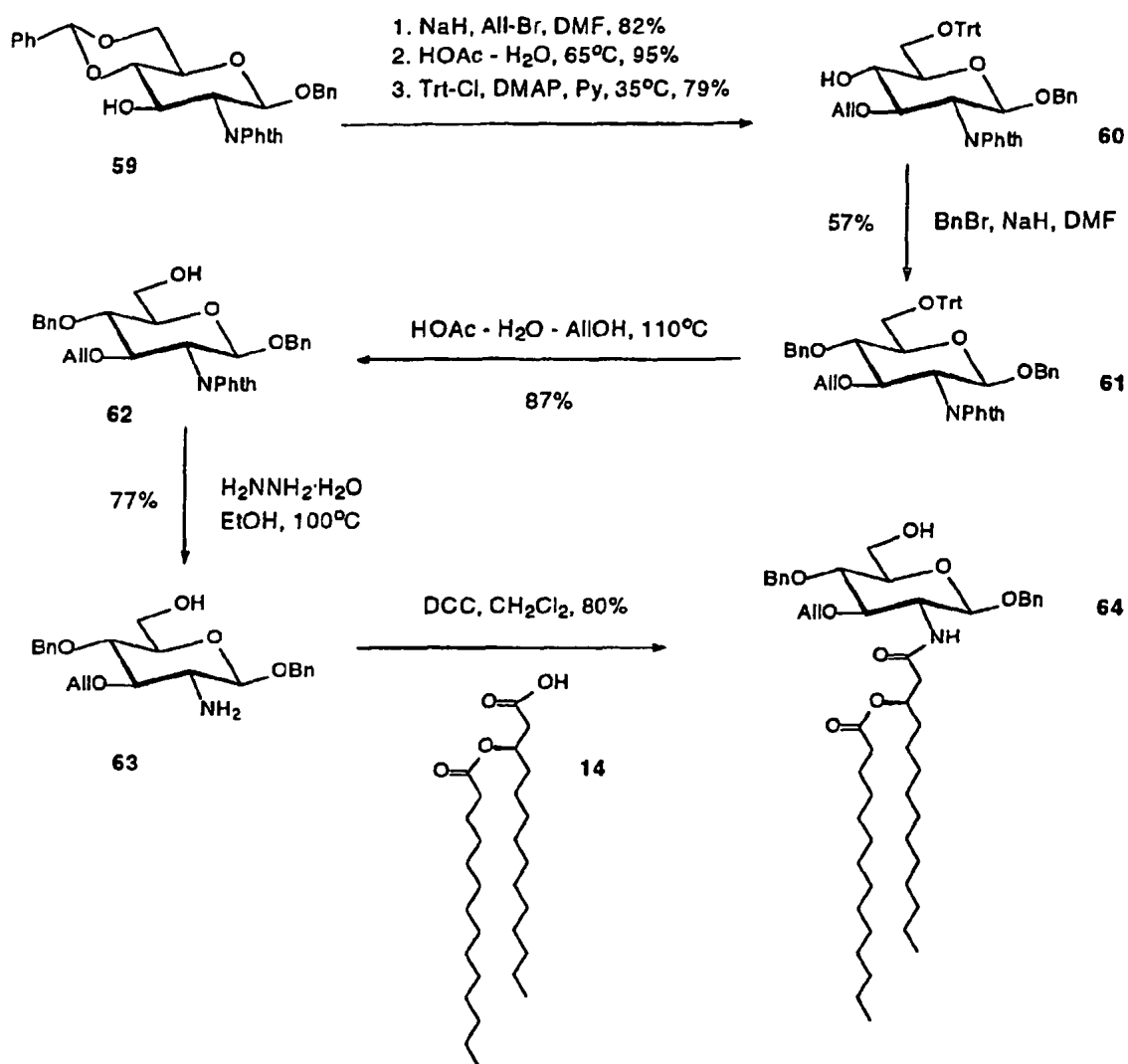


FIG. 17 Síntesis del aceptor de glucosilación 64

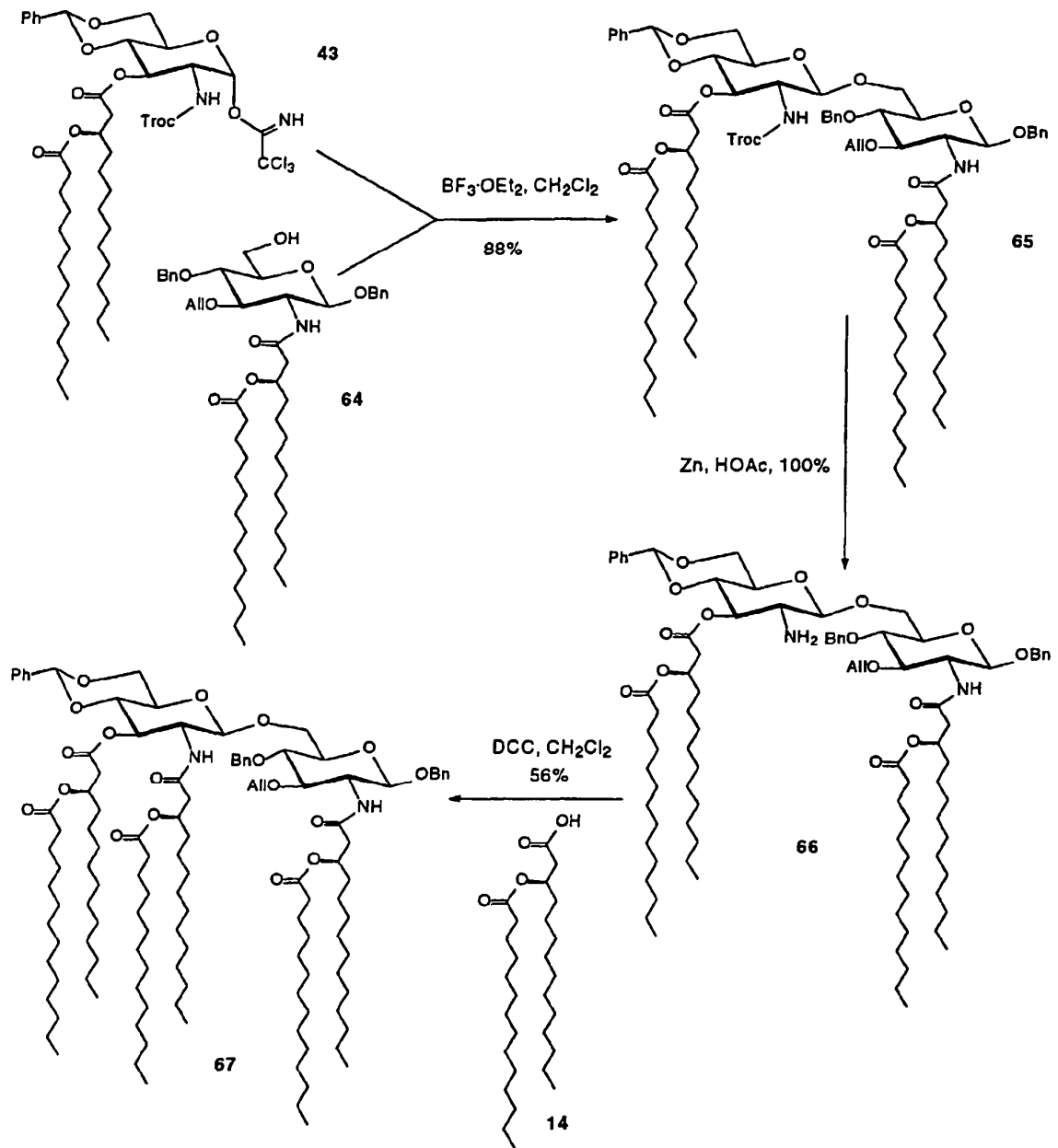


FIG. 18 Síntesis de disacárido 67

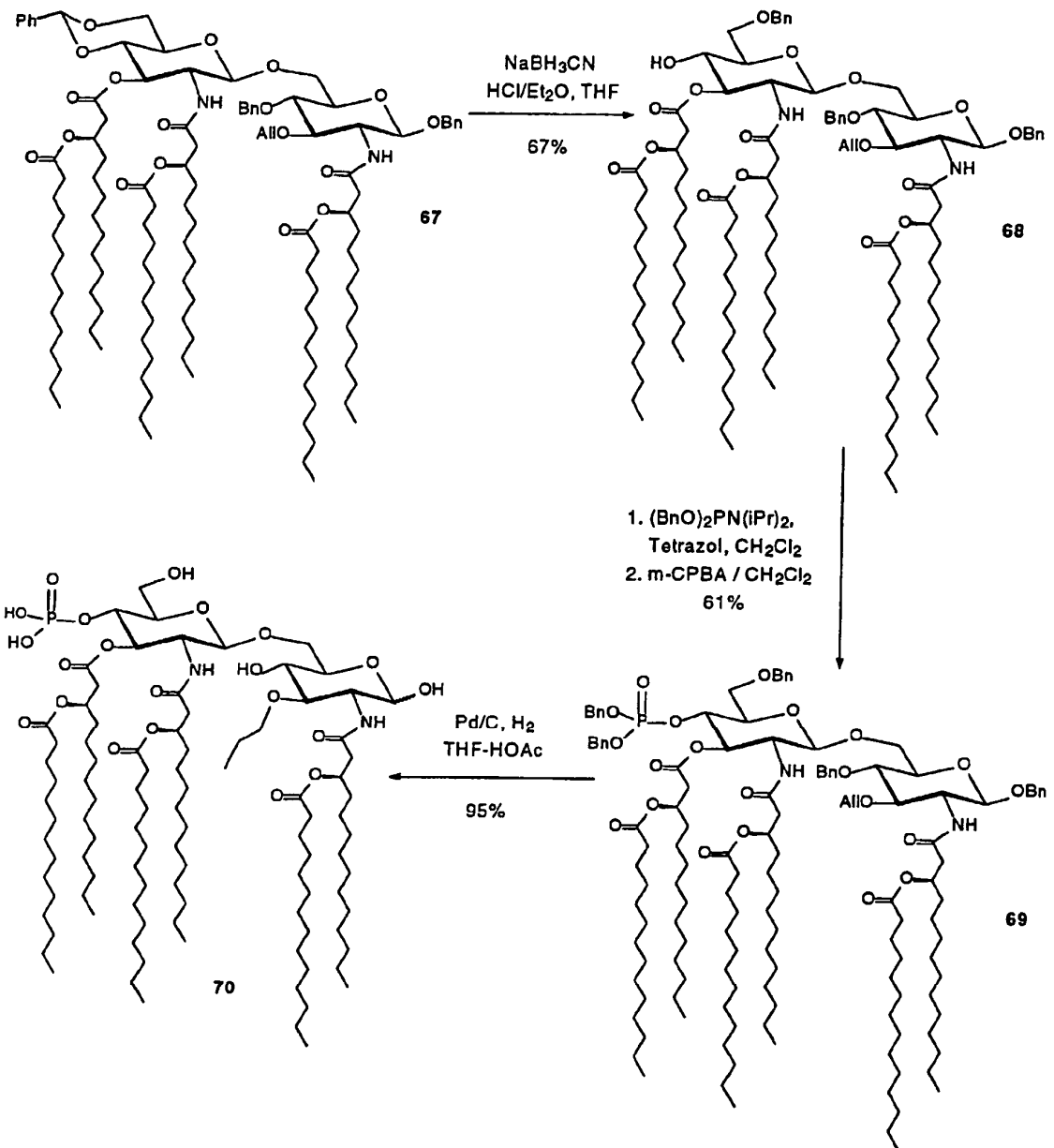


FIG. 19 Síntesis del compuesto 70

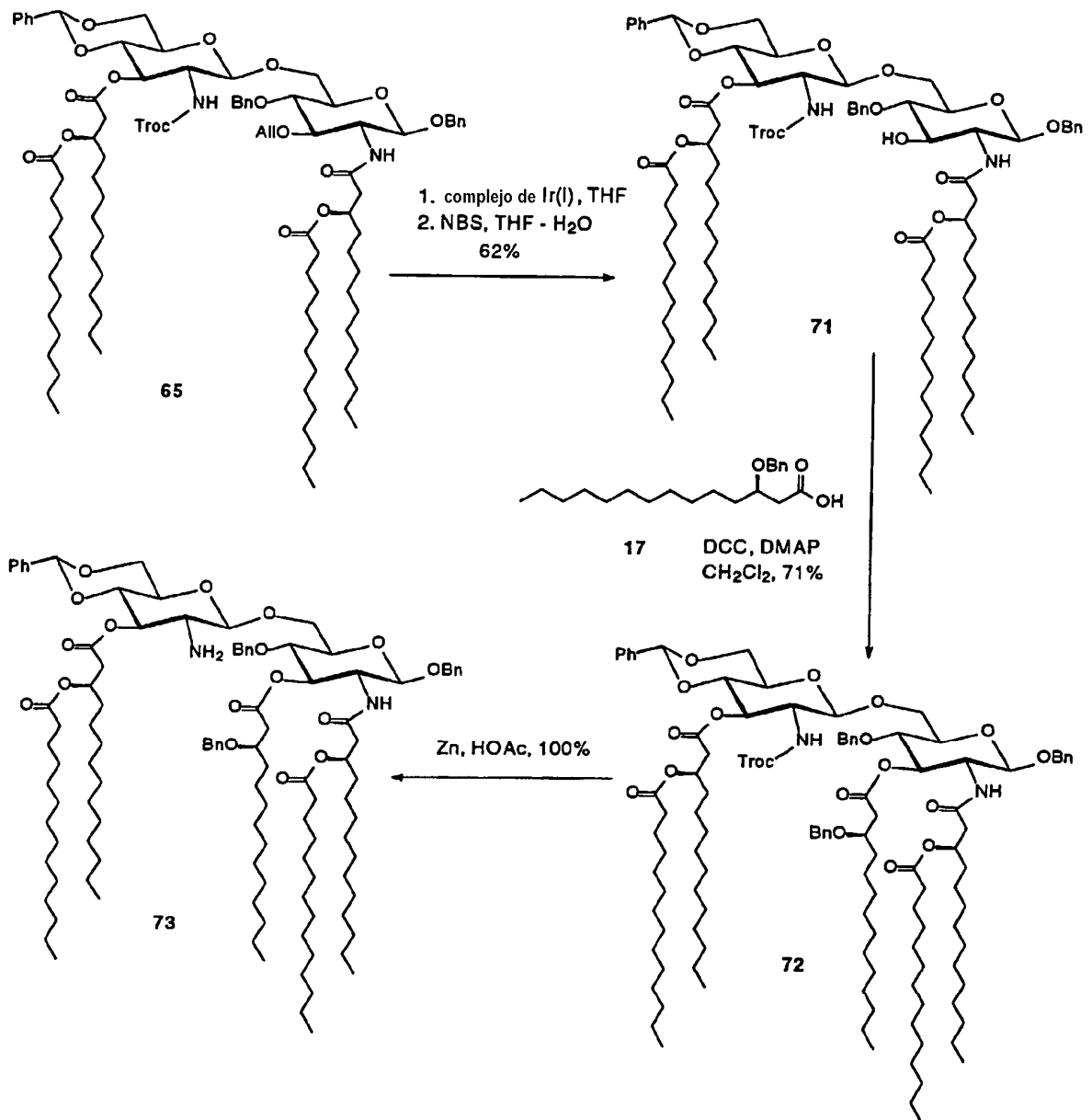


FIG. 20 Síntesis de la amina 73

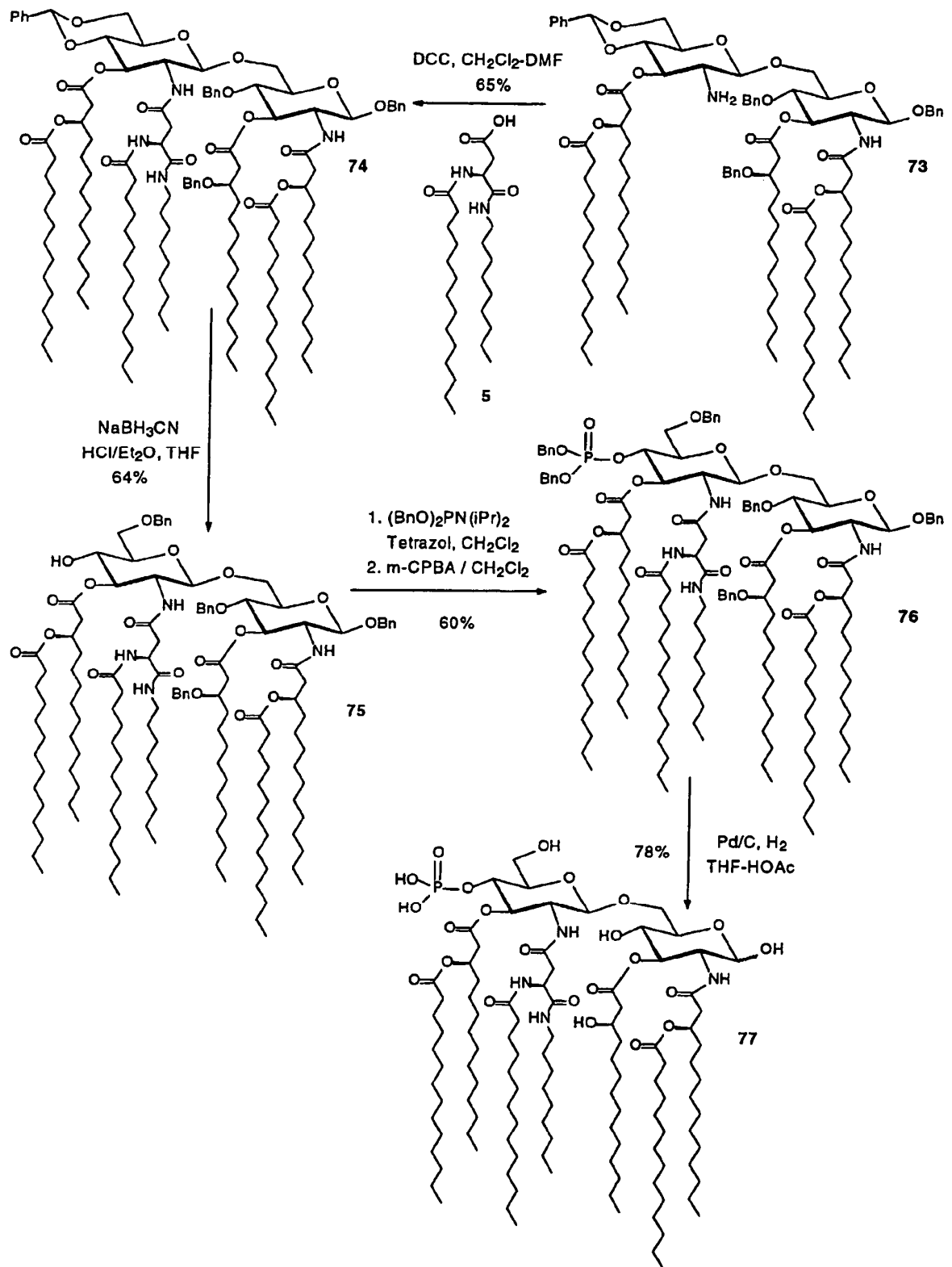


FIG. 21 Síntesis del compuesto 77

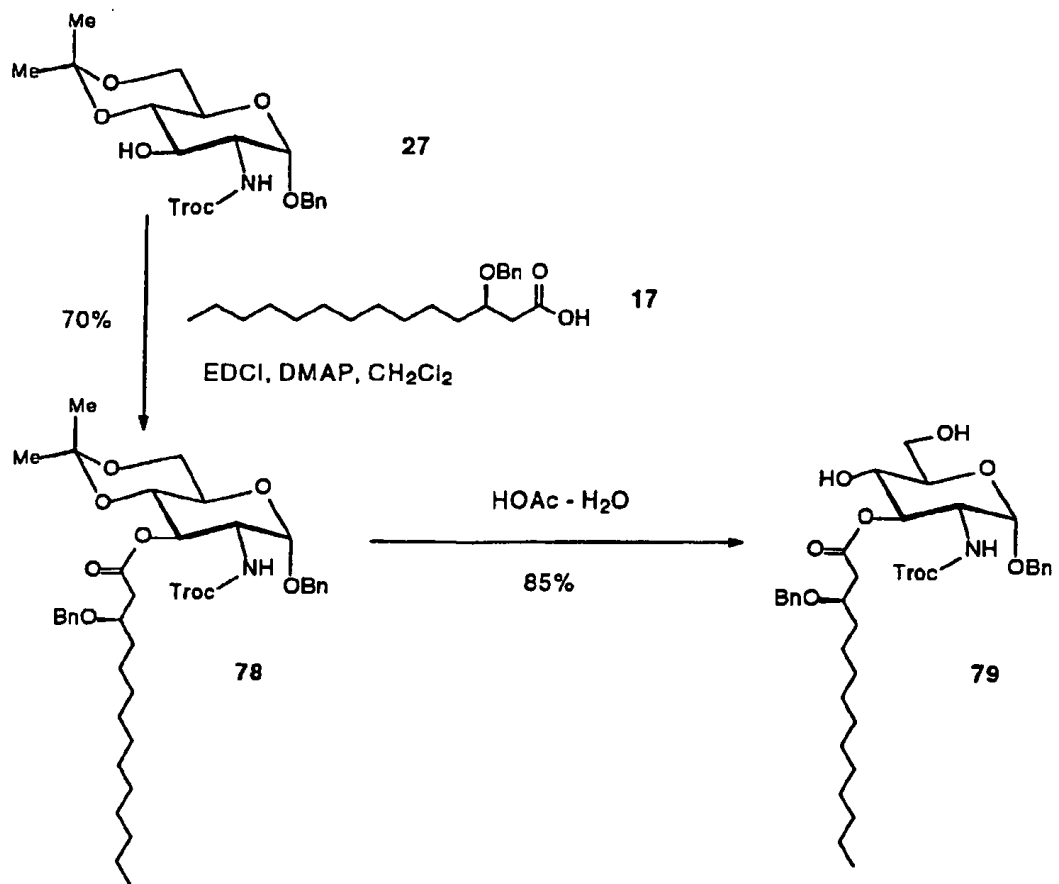


FIG. 22 Síntesis del aceptor de glucosilación 79

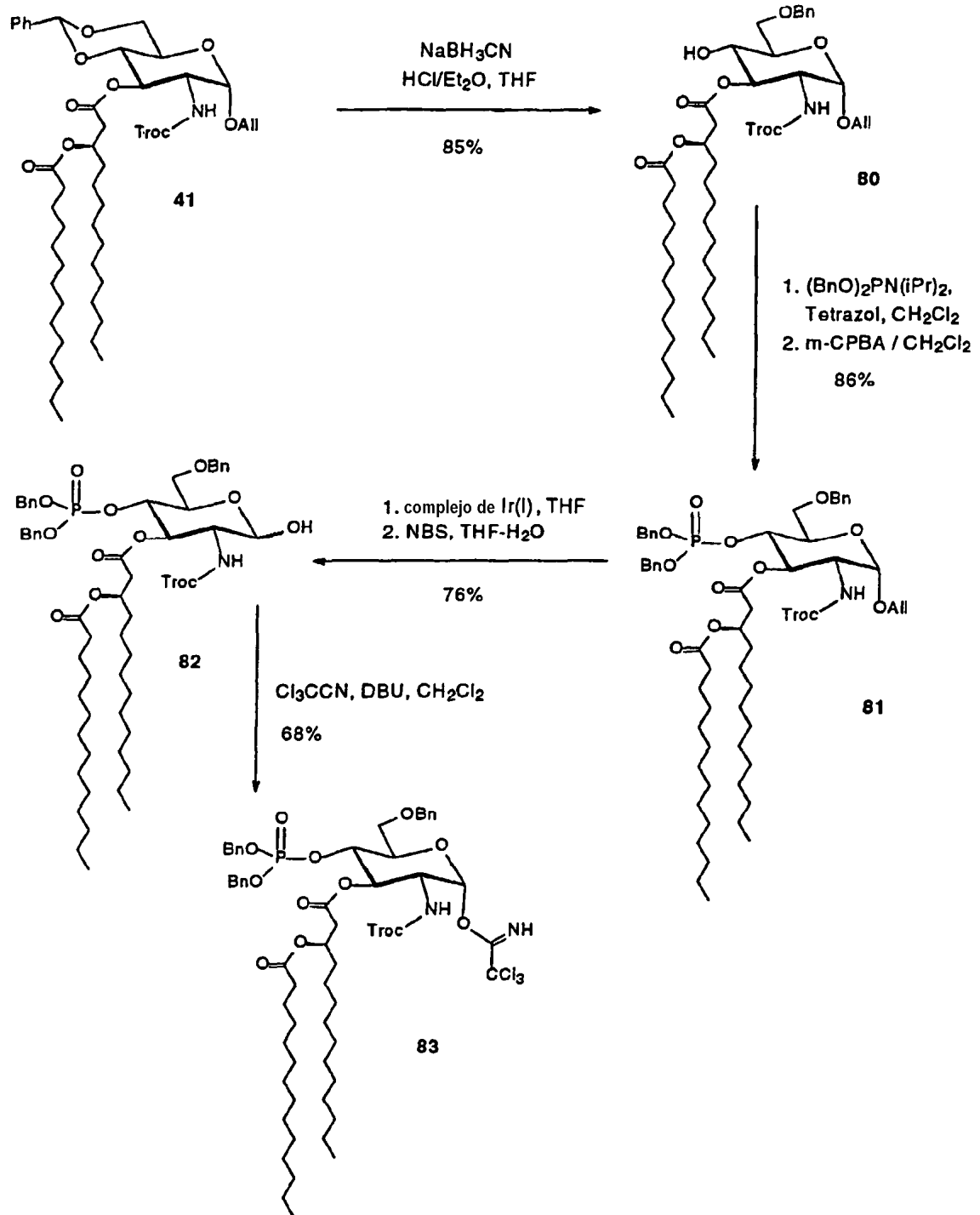


FIG. 23 Síntesis del donante de glucosilación 83

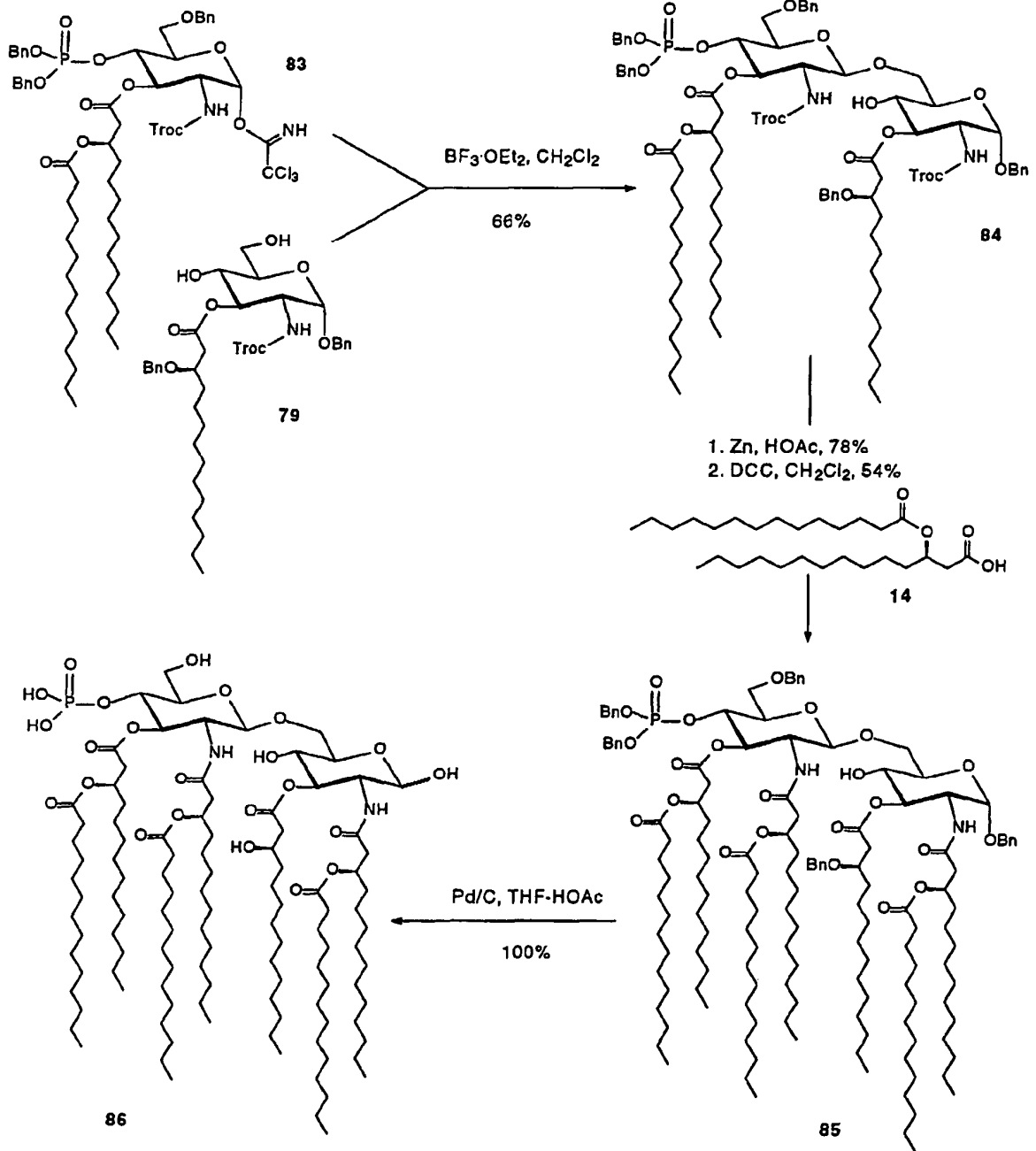


FIG. 24 Síntesis del compuesto 86

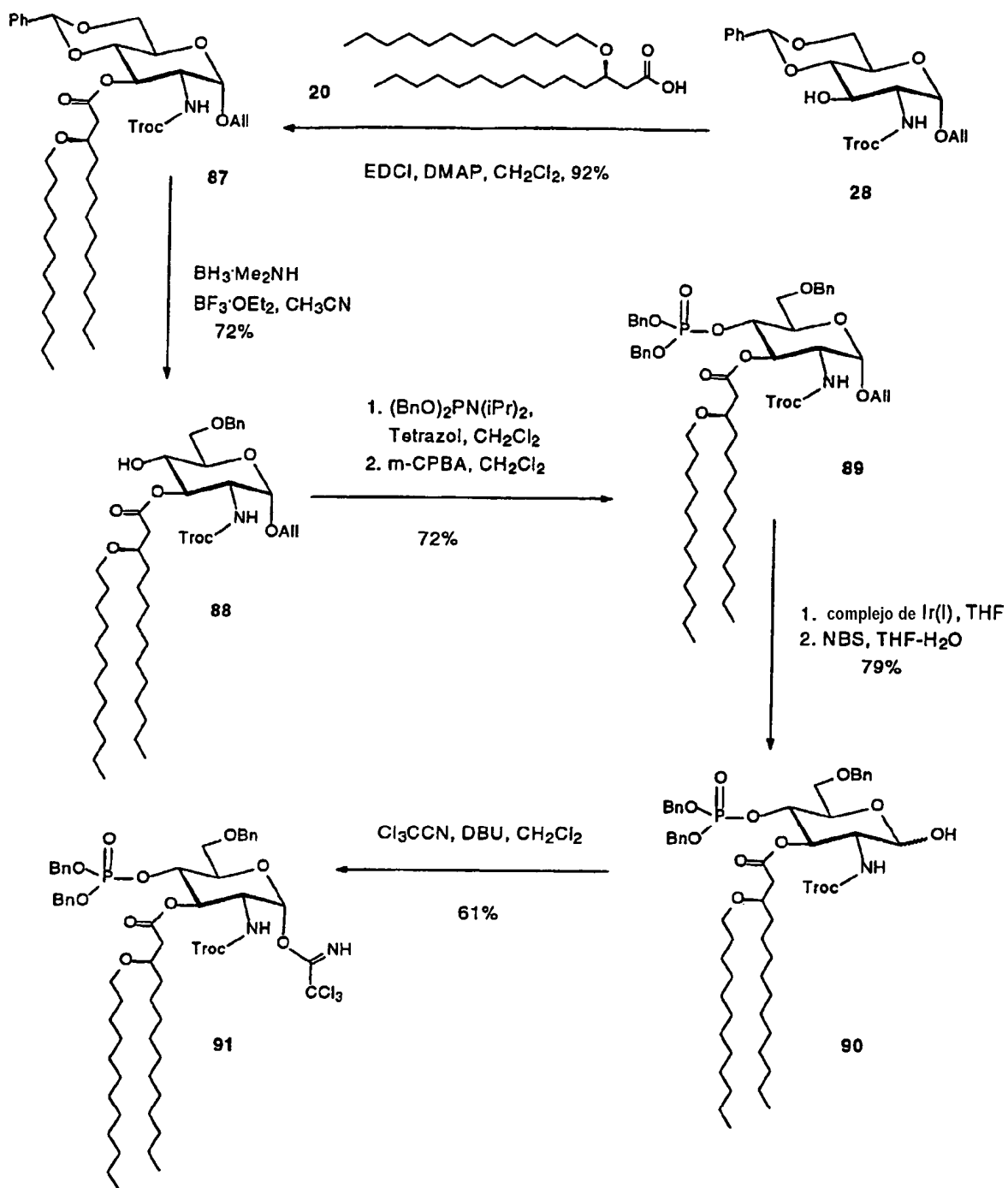


FIG. 25 Síntesis del donante de glucosilación 91

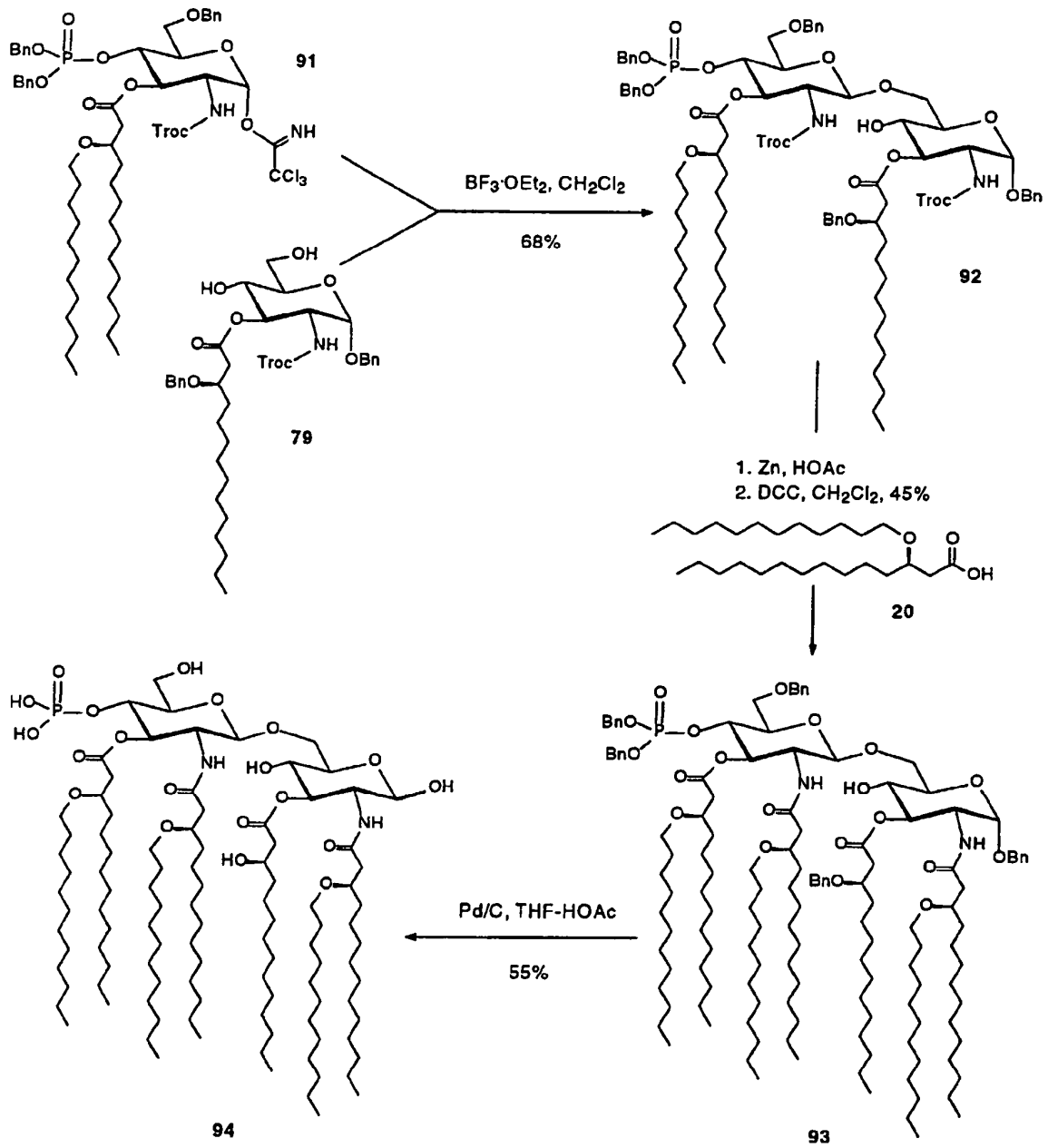


FIG. 26 Síntesis del compuesto 94

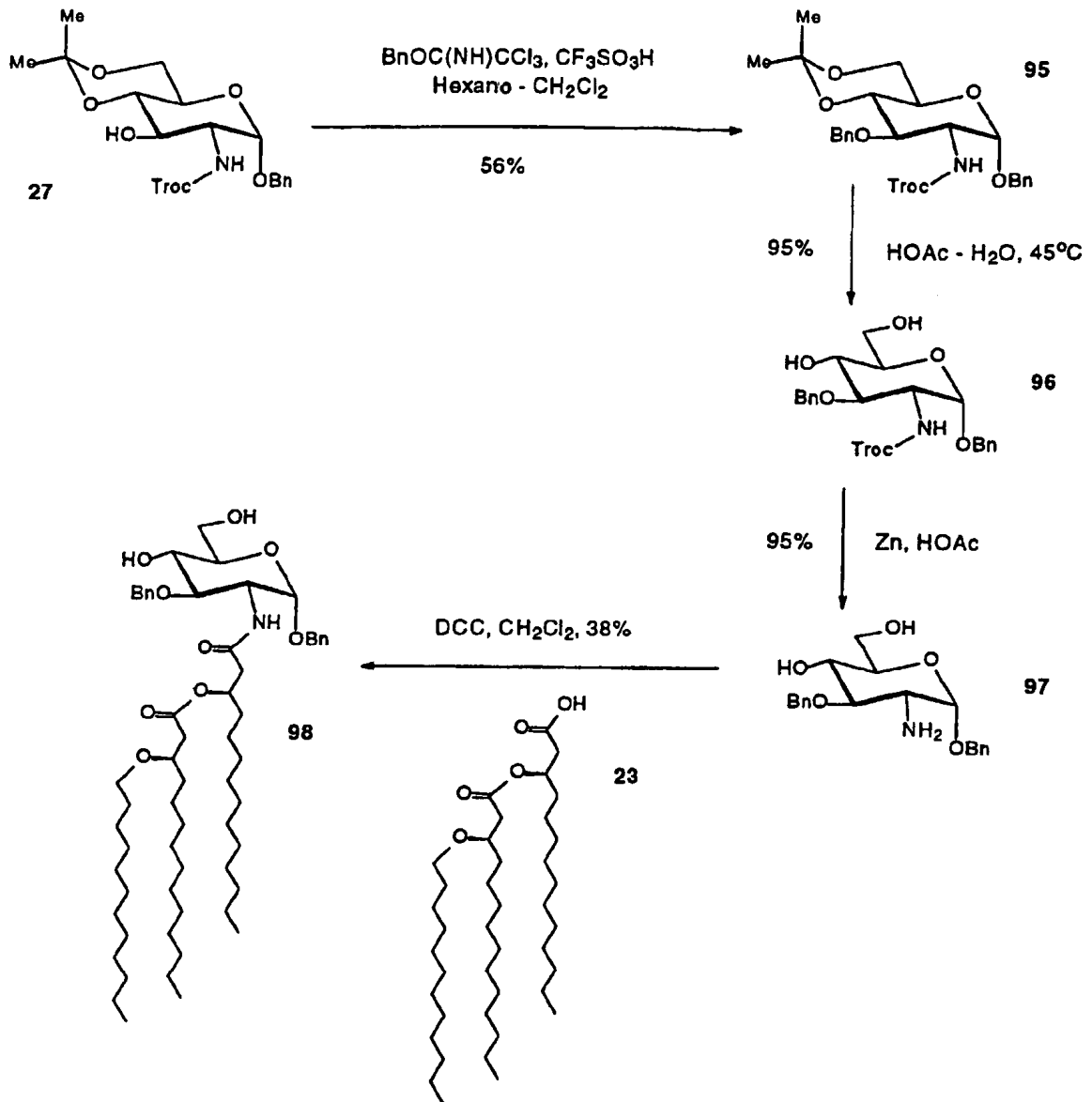


FIG. 27 Síntesis del aceptor de glucosilación 98

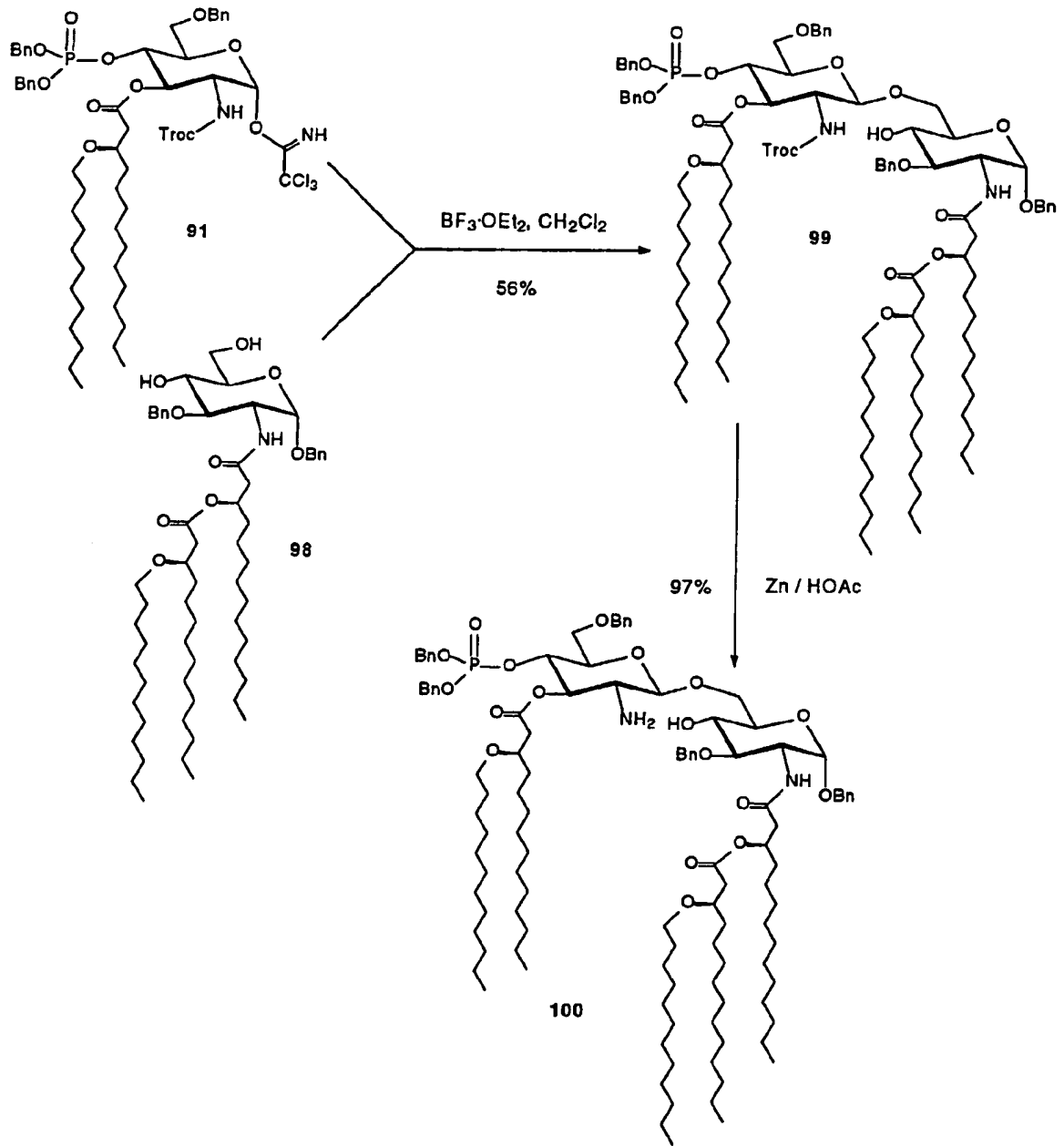


FIG. 28 Síntesis de la amina 100

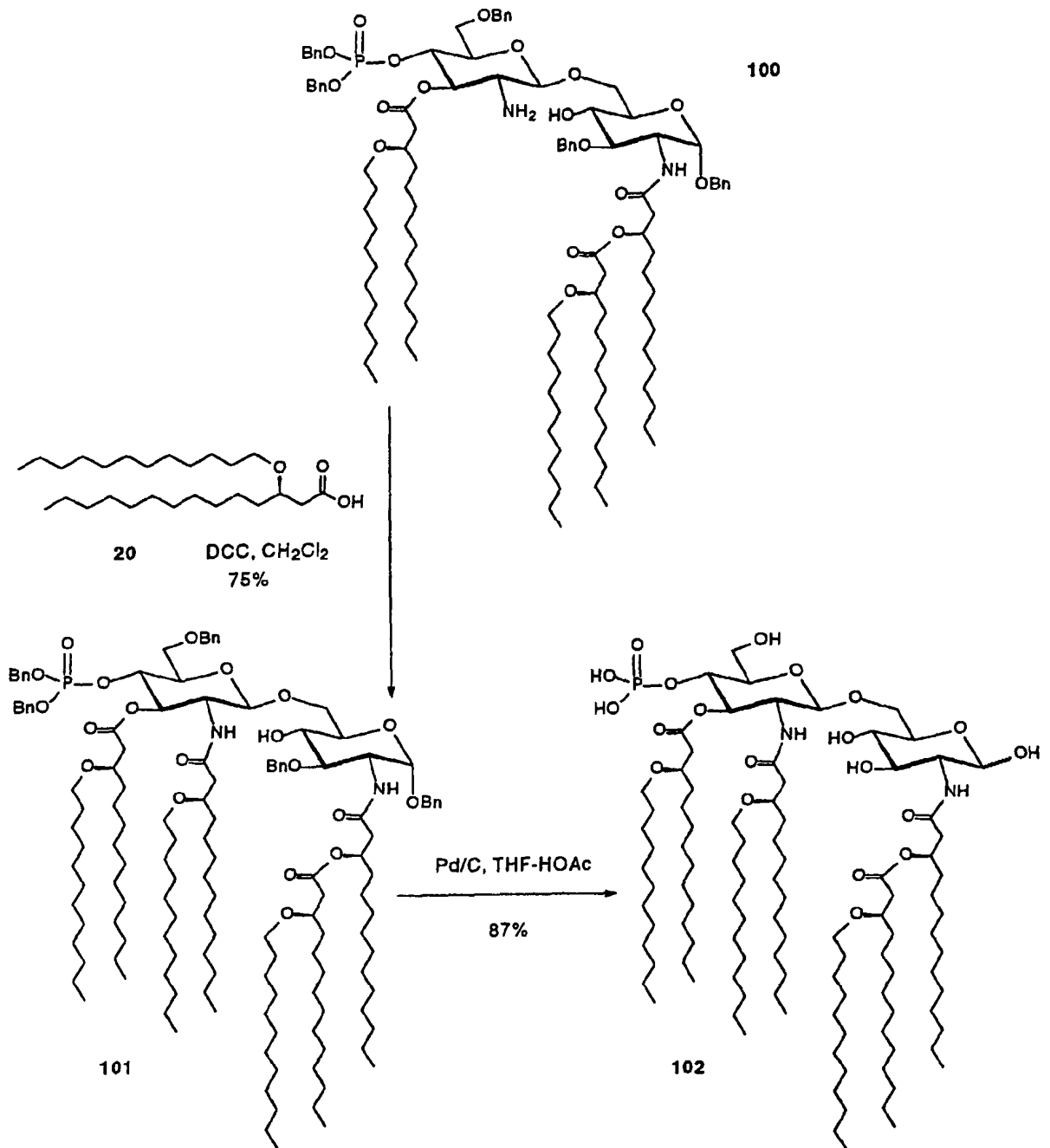


FIG. 29 Síntesis del compuesto 102

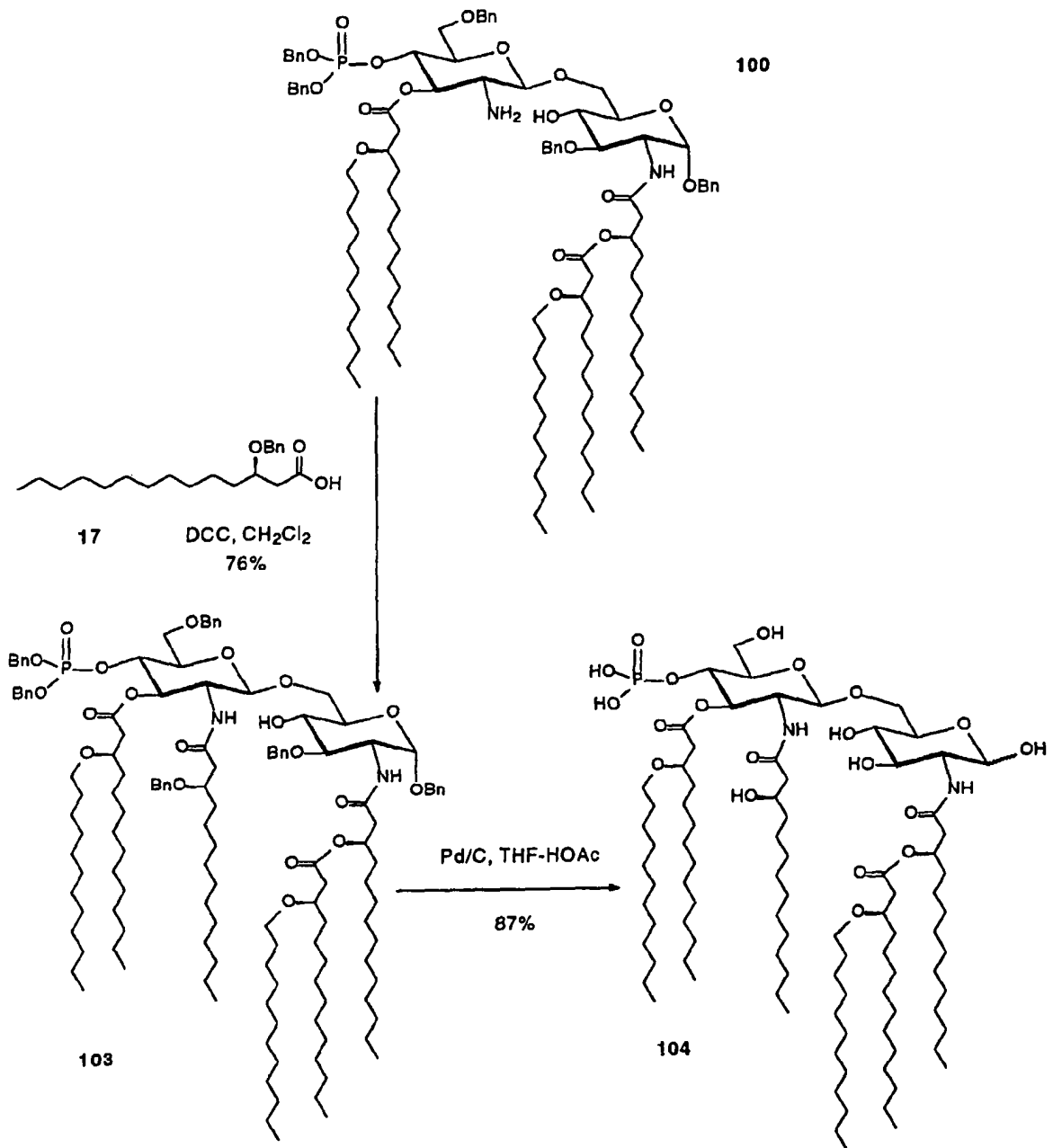


FIG. 30 Síntesis del compuesto 104

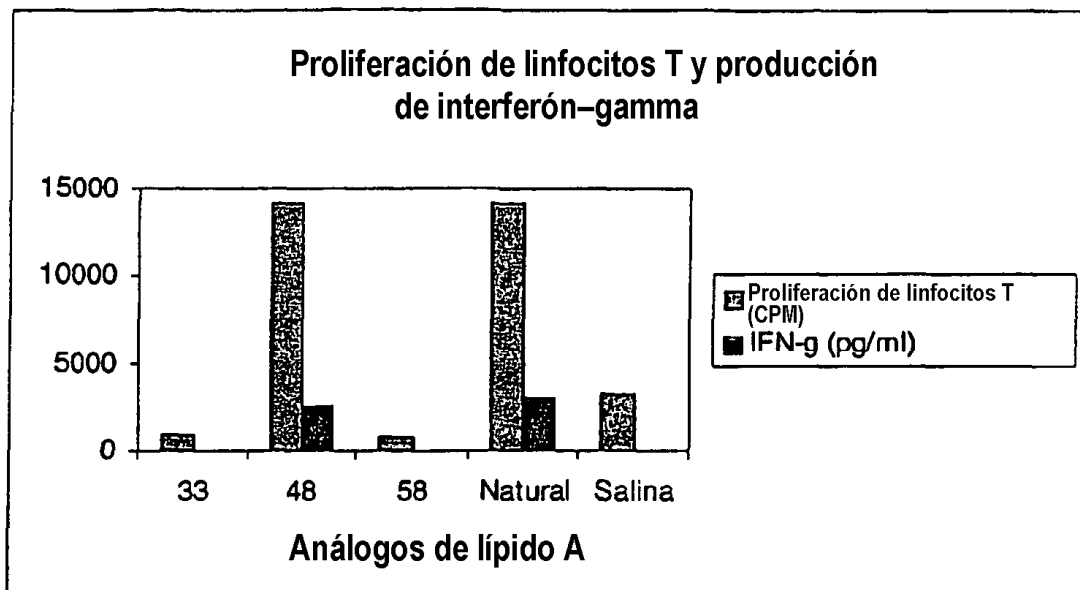


FIG. 31

Proliferación de linfocitos T (CPM, recuentos por minuto) y producción de interferón-gamma (IFN- γ , pg/ml) en ratones inmunizados con vacuna liposómica que contiene lipopéptido BP1-148 sintético a base de MUC1 con análogos de lípido A 33, 48, 58 o lípido A natural como adyuvante .

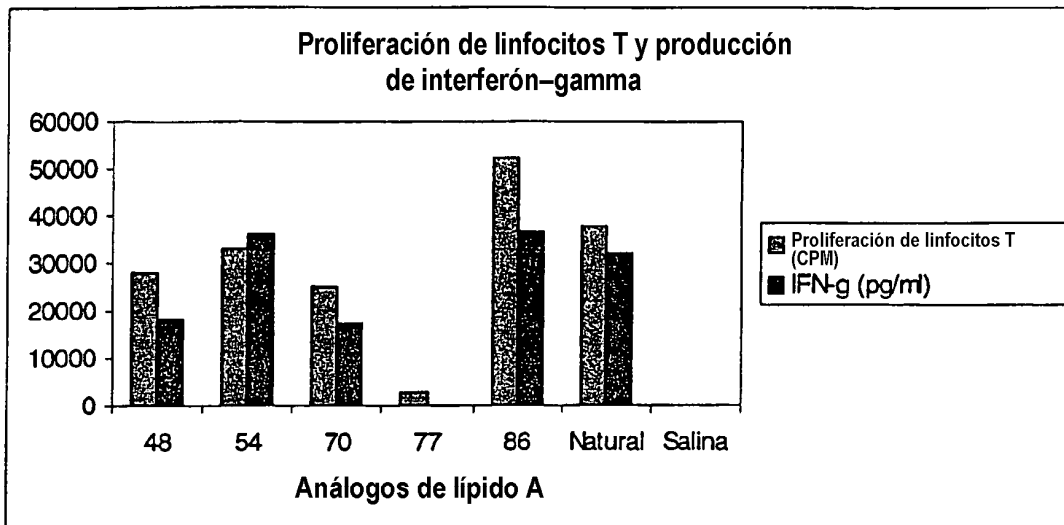


FIG. 32

Proliferación de linfocitos T (CPM, recuentos por minuto) y producción de interferón-gamma (IFN- γ , pg/ml) en ratones inmunizados con vacuna liposómica que contiene lipopéptido BP1-148 sintético a base de MUC1, con análogos 48, 54, 70, 77, 86 de lípido A o lípido A natural como adyuvante.

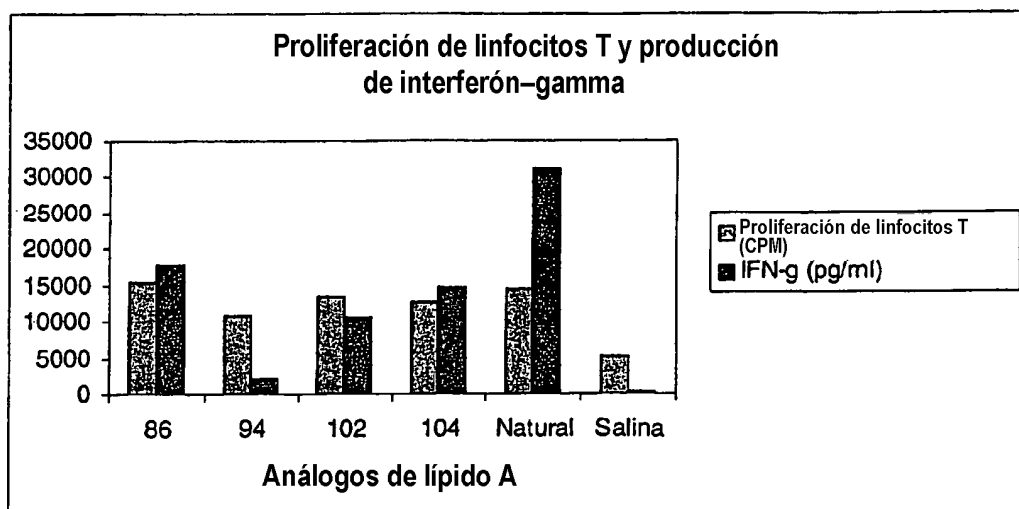
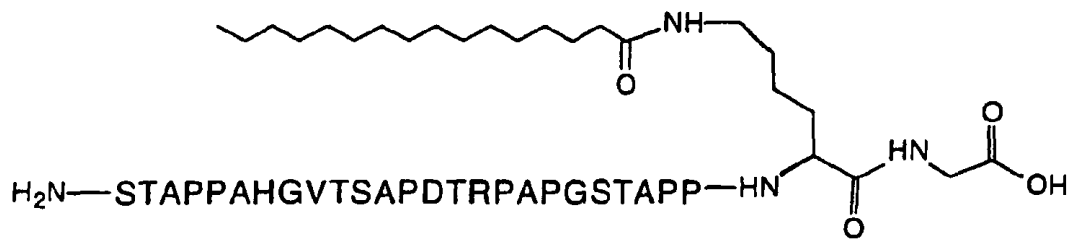


FIG. 33

Proliferación de linfocitos T (CPM, recuentos por minuto) y producción de interferón-gamma (IFN- γ , pg/ml) en ratones inmunizados con vacuna liposómica que contiene lipopéptido BP1-148 sintético a base de MUC1 con análogos de lípido A 86, 94, 102, 104 o lípido A natural como adyuvante.

H₂N-STAPPAHGVTSAPPDTRPAPGSTAPPK(Pal)G-OH



BP1-148

FIG. 34 Estructura del lipopéptido BP1-148, secuencia de 25 aminoácidos modificada procedente de la mucina MUC1 asociada al tumor (códigos de aminoácidos de una sola letra)

BP1-231 / Malaria NSP-1 (20-39):	H₂N-VTHESYQELVKKLEALEDVAVK(Pal)G-OH
BP1-232 / Malaria LS1.2 1742-1760:	H₂N-HTLETVNNISDVNDFQISKYK(Pal)G-OH
BP1-233 / HepA VP1 (75-92):	H₂N-GESRHTSDHMSIYKFMGRK(Pal)G-OH
BP1-235 / HBc Ag CTL epitopo:	H₂N-STLPETTVVRRK(Pal)G-OH
BP1-230 / TB 38 KDa antígeno (350-369):	H₂N-DQVHFQPLPPAVVKLSDALIK(Pal)G-OH
BP1-219:	H₂N-GVTSAPDT(Tn)RPAPGSTAS(Lipo)S(Lipo)L-OH
BP1-217:	H₂N-GVTSAPDTRPAPGSTAS(Lipo)S(Lipo)L-OH
BP1-223:	H₂N-GVT(Tn)S(Tn)APDTRPAPGS(Tn)T(Tn)AS(Lipo)S(Lipo)L-OH

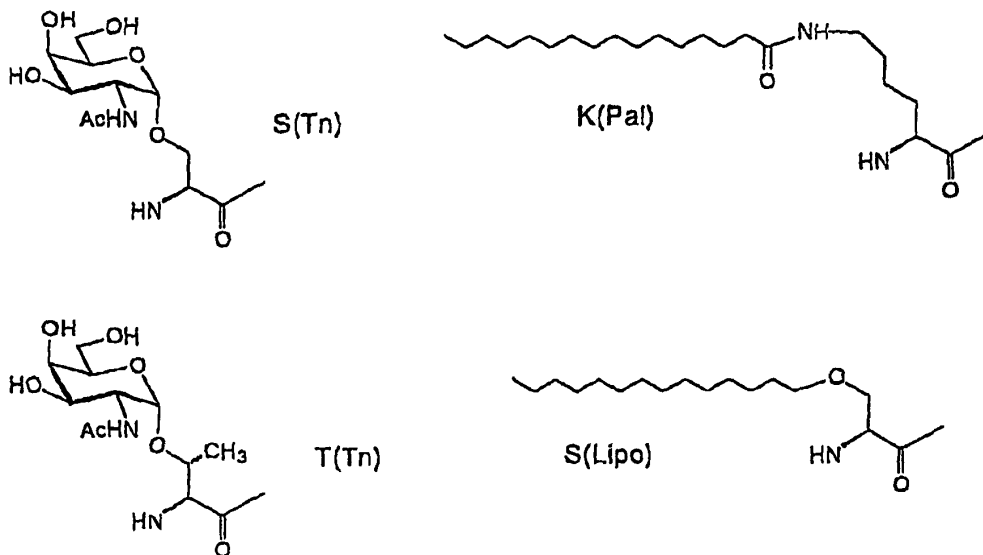


FIG. 35 Algunos ejemplos de péptidos y glucopéptidos derivados de antígenos víricos y proteína MUC1 que pueden incorporarse en formulaciones de liposomas