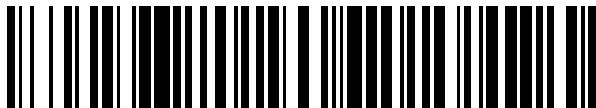




OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 551 599**

⑮ Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2013 E 13710422 (0)**

⑰ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2827899**

④ Título: **Vacunas de polisacárido antígeno-glicolípido conjugado**

⑩ Prioridad:

**19.03.2012 WO PCT/EP2012/054848
26.05.2012 WO PCT/EP2012/002277**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2015

⑬ Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(50.0%)
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE y
UNIVERSITÄTSSPITAL BASEL (50.0%)**

⑭ Inventor/es:

**SEEBERGER, PETER H.;
STALLFORTH, PIERRE;
DE LIBERO, GENNARO y
CAVALLARI, MARCO**

⑮ Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 551 599 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

Vacunas de polisacárido antígeno-glicolípido conjugado

[0001] La presente invención se refiere al campo de la sintetización y evaluación biológica de una nueva clase de vacunas basadas en carbohidratos. Las nuevas vacunas consisten en una estructura multi-modular que permite la aplicación de la vacuna a toda una variedad de patógenos. Este método permite la preparación de vacunas contra todos los patógenos que expresan antígenos de carbohidrato inmunogénicas. Como no se requiere la conjugación de hidratos de carbono a proteínas antigenicas de la vacuna conjugada es particularmente estable al calor. No se requiere refrigeración, un inconveniente principal de las vacunas a base de proteínas.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] La alta prevalencia de muchas enfermedades infecciosas, como la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) y la creciente resistencia a los antibióticos de los patógenos relacionados requiere de un desarrollo urgente de vacunas protectoras. Especialmente dado que las vacunas existentes presentan importantes inconvenientes tales como la inmunogenicidad variable y la falta de desarrollo de la memoria inmunológica.

[0003] Las vacunas han consistido tradicionalmente de patógenos vivos atenuados, organismos inactivados enteros o toxinas inactivadas. En muchos casos, estos enfoques han tenido éxito en la inducción de la protección inmune basado en las respuestas mediadas de anticuerpos. Sin embargo, ciertos patógenos, por ejemplo, VIH, VHC, la tuberculosis y la malaria, requieren de la inducción de la inmunidad mediada por células (CMI). Vacunas no vivas en general han demostrado ser ineficaces en la producción de CMI. Además, aunque las vacunas vivas pueden inducir CMI, algunas vacunas vivas atenuadas pueden dar lugar enfermedades en sujetos inmunodeprimidos. En contraste con las vacunas de más edad que se basa típicamente en patógenos vivos atenuados inactivados o no replicantes, las vacunas modernas se componen de antígenos de subunidades sintéticos, recombinantes, o altamente purificados. Las vacunas de subunidades están diseñadas para incluir sólo los antígenos necesarios para la inmunización protectora y se cree que son más seguras que las vacunas inactivadas enteras o atenuadas vivas. Sin embargo, la pureza de los antígenos de subunidades y la ausencia de los componentes inmunomoduladores auto-potenciadores con adyuvante asociados con las vacunas atenuadas o muertas a menudo resultan en una inmunogenicidad más débil.

[0004] La inmunogenicidad de un antígeno relativamente débil puede ser mejorada por la administración simultánea o más generalmente en conjunción del antígeno con un "adyuvante", por lo general una sustancia que no es inmunogénica cuando se administra solo, pero evocará, aumentará y / o prolongará una respuesta inmune a un antígeno. En ausencia de adyuvante, la ausencia de respuesta inmune pueden ocurrir, o, peor aún, el huésped podría llegar a desarrollar una tolerancia al antígeno.

Los adyuvantes se pueden encontrar en un grupo de compuestos estructuralmente heterogéneos (Gupta et al, 1993, Vaccine, 11: 293 a 306). Ejemplos clásicamente reconocidos de adyuvantes incluyen emulsiones de aceite (por ejemplo, adyuvante de Freund), saponinas, aluminio o sales de calcio (por ejemplo, alumbre), tensioactivos de polímero de bloque no iónicos, lipopolisacáridos (LPS), micobacterias, toxoide tetánico, y muchos más. En teoría, cada molécula o sustancia que es capaz de favorecer o amplificar una situación particular en la cascada de eventos inmunológicos, en última instancia conduce a una respuesta inmunológica más pronunciada se puede definir como un adyuvante.

[0005] A galactosylceramide (α -GalCer) es un glicolípido, más específicamente un glicosilceramida, aislado originalmente de esponjas marinas de Okinawa (Natori et al, Tetrahedron, 50: 2771 a 2784, 1994), o su análogo sintético KRN7000 [(2S, 3S, 4R) -1-O- (α -D-galactopiranosil) -2- (N-hexacosanoilamino) -1,3,4-octadecanetriol], que puede obtenerse a partir Pharmaceutical Research Laboratories, Kirin Brewery (Gumna, Japón) o sintetizarse como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Kobayashi et al, 1995, Oncol Res, 7: 529 a 534; Kawano et al, 1997, Science, 278: 1626 a 9; Burdin et al., 1998. , J. Immunol, 161: 3271; Kitamura et al, 1999, J. Exp Med, 189: 1,121; patente de EE.UU. nº 5.936.076).

Se demostró que el α -GalCer puede estimular actividad de asesino natural (NK) y la producción de citoquinas por las células asesinas naturales T (NKT) y exhibe una potente actividad antitumoral in vivo (Kawano et al., 1998, Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU., 95: 5690). Después de la ingesta por célula presentadora de antígeno (APC), que está representado por células dendríticas (DC) y similares, α -galactosylceramide se presenta en la membrana celular por una proteína similar a CD1d complejo mayor de histocompatible (MHC) de clase I molécula. Las células NKT son activados por reconocimiento usando TCR (receptor de células T) del complejo así presentado de la proteína-CD1d y α -galactosylceramide, lo que desencadena diversas reacciones inmunes. Se ha demostrado también que las Células T Asesinas Naturales Invariantes inducen a la activación de las células B, la mejora de la proliferación de células B y la producción de anticuerpos (Galli et al, Vaccine, 2.003, 21: 2148- S2154; Gall et al, J Exp Med 2003, 197: 1051-1057).

Estos estudios abren la posibilidad de que a-GalCer puede desempeñar un papel igualmente importante en la reducción no sólo la inmunidad innata mediada por las células NKT, sino también la inmunidad adaptativa mediada por las células B, células T colaboradoras (Th) y células T citotóxicas (Tc). Recientemente, se ha demostrado que α -

GalCer actúa como un adyuvante para una variedad de antígenos de proteínas y antígenos de sacáridos co-administrados (documento WO03 / 0098 12).

5 [0006] El documento WO 2006/127685 A2 divulga vacunas que comprenden un adyuvante de glucosilceramida y un antígeno polisacárido acoplado a un portador, tal como una proteína portadora. Las vacunas descritas son capaces de potenciar la respuesta inmune hacia el antígeno de sacárido del conjugado.

10 10 [0007] El documento WO 2010/083728 A1 da a conocer nanopartículas que comprenden un conjugado de α -glucosilceramida y un polímero. Dichas nanopartículas no causan anergia del sistema inmunológico y por lo tanto, se pueden utilizar varias veces para tratar la enfermedad a largo plazo, tales como el cáncer y las enfermedades virales crónicas.

15 15 [0008] El desarrollo exhibe hasta ahora el uso simultáneo de la vacuna y un adyuvante que produce la inmunogenicidad deseada. Un inconveniente importante de las vacunas a base de proteínas, donde se requiere una conjugación de hidratos de carbono a proteínas antigenicas, es que la vacuna es particularmente inestable al calor y se requiere una refrigeración de la vacuna. Por otra parte el uso de al menos dos componentes para lograr una vacunación suficiente es también un inconveniente significativo, ya que el procedimiento de administración es bastante compleja, por ejemplo, el punto en el tiempo donde se administra el adyuvante es esencial para lograr la inmunogenicidad deseada (WO03009812).

20 **Descripción de la invención**

25 [0009] Para cumplir con estos requisitos y superar las desventajas de las vacunas actuales de la invención presenta un nuevo tipo de vacuna conjugada, en el que el antígeno de carbohidrato se une covalentemente al adyuvante glicolípido. Protección contra una enfermedad infecciosa se proporciona por neutralización de factores de virulencia o anticuerpos opsonizantes. Los anticuerpos (Abs.) Tienen que ser dirigido contra el antígeno carbohidrato del patógeno, por ejemplo, a partir de cápsulas compuestas por polisacáridos o glicoproteínas virales. Por lo tanto, una vacuna ideal eficiente tiene que inducir a una alta afinidad y anticuerpos anti-carbohidrato de fijación de complementos. Esto se cumple por los conjugados de la presente invención.

30 [0010] Los nuevos derivados de hidratos de carbono conjugadas-glicolípido según la presente invención están representados por la siguiente fórmula general (I). Se encontró sorprendentemente que una vacuna extraordinariamente potente y estable puede derivarse cuando un antígeno polisacárido está unido a través de un enlazador y un resto de carbohidrato a un resto ceramida. Así, la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula general (I)



(I)

40 Representando

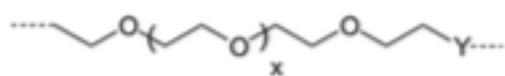
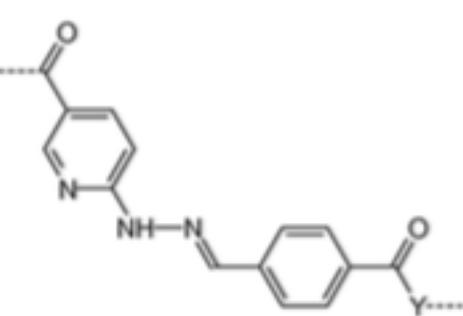
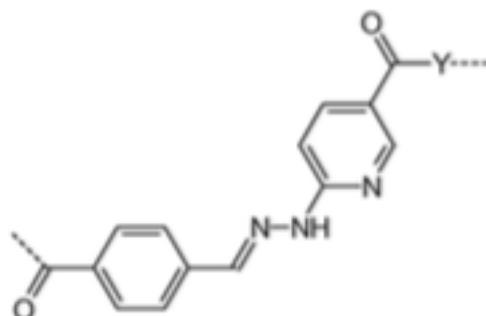
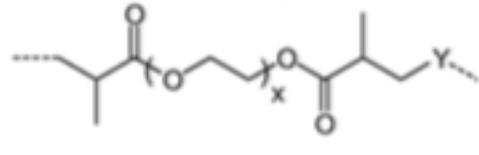
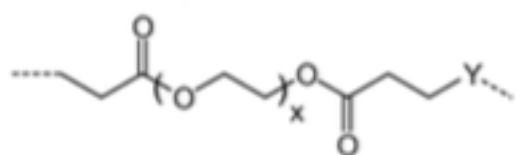
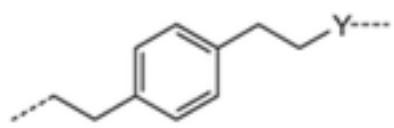
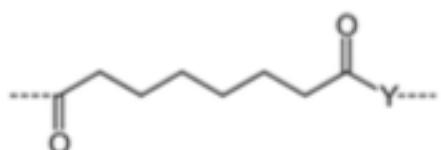
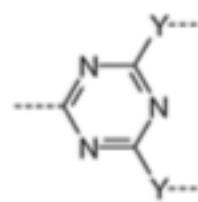
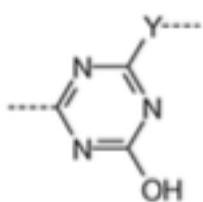
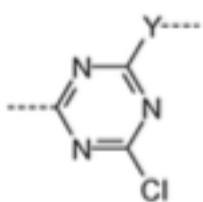
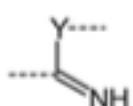
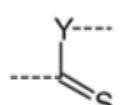
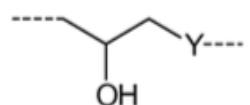
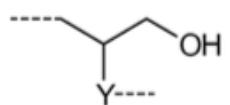
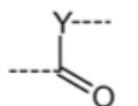
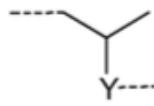
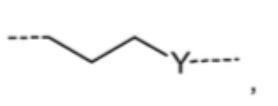
45 **A** un antígeno de hidratos de carbono de 1 a 10.000 monómeros de hidratos de carbono y el antígeno de hidratos de carbono pertenece a la clase de polisacáridos, en el que los monómeros de hidratos de carbono del antígeno de hidratos de carbono están opcionalmente modificados para llevar a amida, carbonato, carbamato, carbonilo, tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, tioéster, éter, epoxi, hidroxialquilo, alquilenilo, fenileno, alquenilo, imino, imida, isourea, tiocarbamato, tiourea y / o restos de urea,

50 **p** es el número de residuos **-L-CH-CA** que están unidos a los hidratos de carbono antígeno **A**, y
p es un número entero que se define de la siguiente manera:

p is 1 or 2		if u is 1
p is 1, 2, 3 or 4		if u is 2
p is 1, 2, 3, 4, 5 or 6		if u is 3
p is 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8		if u is 4
$1 \leq p \leq 10$	if	$5 \leq u \leq 10$
$2 \leq p \leq 50$	if	$11 \leq u \leq 100$
$20 \leq p \leq 200$	if	$101 \leq u \leq 1000$
$50 \leq p \leq 400$	if	$1001 \leq u \leq 10000$

65 **u** es el número de monómeros de carbohidrato del antígeno carbohidrato **A**
L representa $-L^1-L^2-$, $-L^2-$, $-L^2-L^3$ o $-L^1-L^2-L^3$;

L^1 representa uno de los siguientes residuos:



siendo x el número entero de 1 a 60;

Y representa un enlace, -NH-, -O-, -S-;

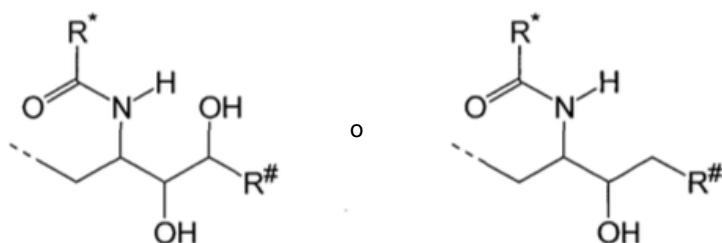
L² representa -CH²-, -C²H⁴-, -C³H⁶-, -C⁴H⁸-, -C⁵H¹⁰-, -C⁶H¹²-, -C⁷H¹⁴-, -C⁸H¹⁶-, -C⁹H¹⁸-, -C¹⁰H²⁰-, -CH (CH³) -, -C [(CH³)²] -, -CH²-CH (CH³) -, -CH (CH³) -CH²-, -CH (CH³) -C²H⁴-, -CH²-CH (CH³) -CH²-, -C²H⁴-CH (CH³) -, -CH²-C [(CH³)²] -, -C [(CH³)²] -CH²-, -CH (CH³) -CH (CH³) -, -C [(C₂H₅) (CH³)] -, -CH (C₃H₇) -, - (CH₂-CH₂-O) n-CH₂-CH₂-, -CO-CH₂-, -CO-C₂H₄-, -CO-C₃H₆-, -CO-C₄H₈-, -CO-C₅H₁₀-, -CO-C₆H₁₂-, -CO-C₇H₁₄-, -CO-C₈H₁₆-, -CO-C₉H₁₈-, -CO-C₁₀H₂₀-, -CO-CH (CH³) -, -CO-C [(CH³)²] -, -CO-CH²-CH (CH³) -, -CO-CH (CH³) -CH²-, -CO-CH (CH³) -C₂H₄-, -CO-CH²-CH (CH³) -CH²-, -CO-C₂H₄-CH (CH³) -, -CO-CH²-C [(CH³)²] -, -CO-C [(CH³)²] -CH²-, -CO-CH (CH³) -CH (CH³) -, -CO-C [(C₂H₅) (CH³)] -, -CO-CH (C₃H₇) -, -CO- (CH₂-CH₂-O) n-CH₂-CH₂-

n representa un número entero de 1 a 60;

L³ representa -CO-, -O-CO-, -NH-CO-, -NH (C = NH) -, -SO₂-, -O-SO₂-; **CH** representa un monosacárido, un disacárido o un trisacárido;

CA representa

15



25

R* y **R#** representan independientemente el uno del otro un residuo de carbono lineal o ramificado o cíclico, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado que consta de 1 a 30 átomos de carbono; y tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos

30

Antígeno

[0011] A representa un antígeno de carbohidrato que consta de 1 a 10.000 monómeros de hidratos de carbono.

35

[0012] El término "antígeno" del modo usado aquí se refiere a una sustancia que provoca después de la introducción en el organismo de seres humanos y animales, una respuesta inmune específica. Esto se manifiesta tanto en la formación de anticuerpos (respuesta humoral) y el desarrollo de la inmunidad mediada por células (respuesta inmune celular) o una tolerancia inmune específica. Dependiendo de si se requiere de la formación de la respuesta inmune que implica linfocitos T (células T), se llama timo-dependiente o independiente de antígeno. Un requisito previo para una respuesta inmune (por la inmunogenicidad del antígeno) es que el antígeno es reconocido como extraño por el organismo, que tiene un peso molecular de al menos 1000 y que pertenece a la clase de proteínas o polisacáridos, desoxirribonucleico rara ácidos o lípidos. Estructuras más complejas tales como bacterias, virus, o eritrocitos (antígenos particulados) son generalmente antígenos más eficaces. A nivel molecular, un antígeno se caracteriza por su capacidad de ser "unido" en el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

45

[0013] Las sustancias extrañas que no estimulan una respuesta inmune por sí mismos, sino por la unión a macromoléculas inmunogénicas química, se denominan haptos. Para la eficacia de antígenos inmunogénicos la vía de administración (dosis única o múltiple, la dosis por vía intradérmica o por vía intravenosa, con o sin adyuvante) es determinante. Los ataques repetidos por los mismos antígenos aceleran la respuesta inmune y puede dar lugar, en el peor de los casos, a una hipersensibilidad específica (alergia, en la que los antígenos a menudo se llaman alérgenos). En la presencia de grandes cantidades de antígeno o cantidades persistentes crónicas de antígeno, la formación de complejos inmunes solubles puede ocurrir, lo cual puede causar la anafilaxia.

55

[0014] Un inmunógeno es un tipo específico de antígeno. Un inmunógeno es una sustancia que es capaz de provocar una respuesta inmune adaptativa si se inyecta solo. Un inmunógeno es capaz de inducir una respuesta inmune, mientras que un antígeno es capaz de combinarse los productos de una respuesta inmune una vez que se realizan. La inmunogenicidad es la capacidad de inducir una respuesta inmune humoral y / o mediada por células.

60

[0015] El término "antígeno" puede ser descrito resumidamente como una sustancia, que pertenece a la clase de proteínas o polisacáridos, en general, componiéndose de piezas (abrigos, cápsulas, paredes celulares, flagelos, fimbrias, y toxinas) de bacterias, virus, y otros microorganismos, y también ácidos desoxirribonucleico o lípidos poco comunes, moléculas más pequeñas o iones (haptos), que son reconocidas como extrañas por el organismo de los seres humanos y animales y que pueden provocar después de la introducción en el organismo de los seres humanos y los animales, una respuesta inmune específica, que de lugar un / o una respuesta humoral y celular inmune, lo que conduce a la formación de anticuerpos (respuesta humoral) y / o el desarrollo de la inmunidad mediada por células (respuesta celular), en el que los anticuerpos mencionados pueden conducir a una unión

específica del antígeno.

5 **[0016]** Específicamente, el término "antígeno" puede ser descrito como una sustancia, que es reconocido como extraño por el organismo de los seres humanos y animales y que puede provocar después de la introducción en el organismo de los seres humanos y los animales, una respuesta inmune específica, que comprende un humoral y / o una respuesta inmune celular.

10 **[0017]** Preferiblemente, A representa un aislado, un semi-sintético o un antígeno carbohidrato sintético. El antígeno carbohidrato aislado consta de 1 a 10.000 monómeros de hidratos de carbono, preferiblemente de 10 a 5.000 monómeros de hidratos de carbono, y más preferiblemente de 20 a 3.000. El antígeno de hidratos de carbono semi-sintético consta preferiblemente de 1 a 1.000 monómeros carbohidratos, más preferiblemente del 5 al 900 y aún más preferiblemente de 10 a 800 monómeros de hidratos de carbono y el antígeno carbohidrato sintético consta preferiblemente de 1 a 1.000 monómeros de hidratos de carbono, más preferiblemente de 5 a 900 y aún más preferiblemente de 10 a 800 monómeros de hidratos de carbono.

15 **[0018]** Los antígenos y, especialmente, los antígenos aislados son normalmente mezclas de antígenos que tienen una cierta gama de monómeros de hidratos de carbono por lo que el término "antígeno que consta de 500 monómeros de hidratos de carbono" se refiere a una mezcla de antígenos que tienen en promedio el número de 500 monómeros de hidratos de carbono. Dicha mezcla puede contener 10% de los antígenos con 450 a 470 monómeros de hidratos de carbono, 10% de los antígenos con 530 a 550 monómeros de hidratos de carbono, 20% de los antígenos con 471 a 490 monómeros de hidratos de carbono, 20% de los antígenos con 510 a 529 monómeros de hidratos de carbono y 40% de los antígenos con un número de 491 a 509 monómeros de carbohidratos.

20 **[0019]** Preferiblemente, los monómeros de hidratos de carbono pertenecen a heptosas, hexosas, pentosas, tetrosas o ácidos siálicos, en el que los monómeros de hidratos de carbono están conectados entre sí a través enlaces α/β glicosídicos que pertenecen al grupo que consiste en 1,2; 1,3; 1,4; 15; 16; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; o 2,6 enlaces glucosídicos. Además, los monómeros de hidratos de carbono pueden ser más específicamente derivados de peptidoglycanes tales como ácido N-acetilmurámico, N-acetil-D-glucosamina o N-acetil-D-glucosamina.

25 **[0020]** Algunos de los grupos de hidroxilos (-OH) de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno A pueden, independientemente el uno del otro estar opcionalmente sustituidos por los siguientes sustituyentes -CH₃, -C₂H₅, -SO₃H, -SO₃-, -CH₂-COOH, -CH₂-COO-, -C₂H₄-COOH, -C₂H₄-COO- o algunos de los grupos hidroxilos (-OH) de los monómeros de hidratos de carbono pueden ser reemplazados por los siguientes restos:
30 -H, -O-CH₃, -O-SO₃H, -O-SO₃-, -CH₃, -NH₂, -NH-CO-CH₃, -O-CH₂-COOH, -O-CH₂-COO-, -O-C₂H₄-COOH, -O-
35 C₂H₄-COO-, -NH-SO₃H, -NH-SO₃-,

40

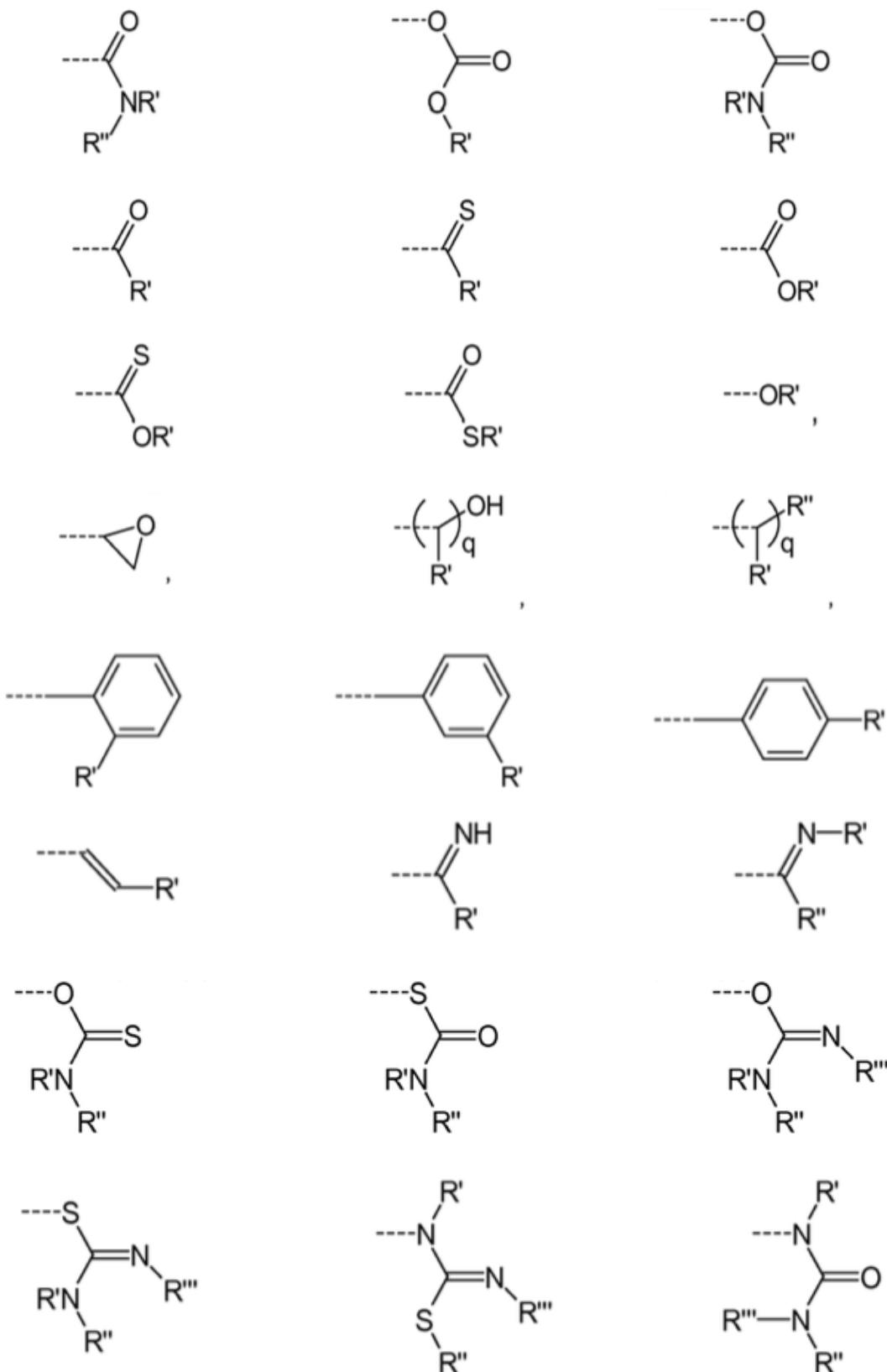
45

50

55

60

65



Siendo

5 q un número entero de 1 a 4, y
 R', R "y R", independientemente entre sí, representan uno de los residuos siguientes: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -

ciclo-C3H5, -CH (CH3) 2, -C (CH3) 3, -C4H9, Ph, -CH2-Ph, -CH2-OCH3, -C2H4-OCH3, -C3H6-OCH3, -CH2-OC2H5, -C2H4-OC2H5, -C3H6-OC2H5, -CH2-OC3H7, -C2H4-OC3H7, -C3H6-OC3H7, -CH2-O-ciclo-C3H5, -C2H4-O-ciclo-C3H5, -C3H6-O-ci- clo-C3H5, -CH2-OCH (CH3) 2, -C2H4-OCH (CH3) 2, -C3H6-OCH (CH3) 2, -CH2-OC (CH3) 3, -C2H4-OC (CH3) 3, -C3H6-OC (CH3) 3, -CH2-OC4H9, -C2H4-OC4H9, -C3H6-OC4H9, -CH2-OPh, -C2H4-OPh, -C3H6-OPh, -CH2-OCH2-Ph, -C2H4-OCH2-Ph, -C3H6-OCH2-Ph.

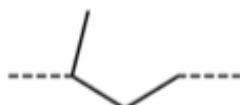
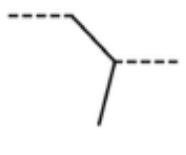
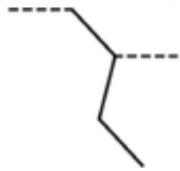
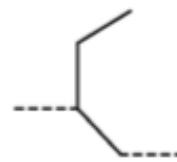
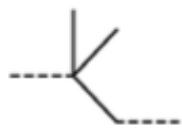
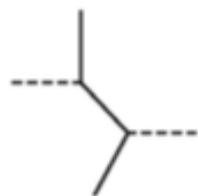
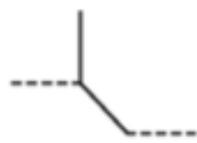
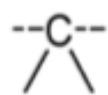
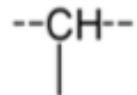
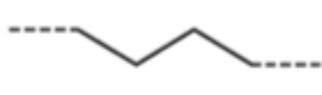
Estos grupos son sustitutos de origen natural que pueden estar presentes en los antígenos de hidratos de carbono.

[0021] Los monómeros de carbohidratos del antígeno de hidratos de carbono, por tanto, pueden ser opcionalmente modificados o pueden ser modificados para llevar amida, carbonato, carbamato, carbonilo, tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, tioéster, éter, epoxi, hidroxialquilo, alquilenilo, fenileno, alquenilo, imino, imida, isourea, tiocarbamato, tiourea y / o restos de urea.

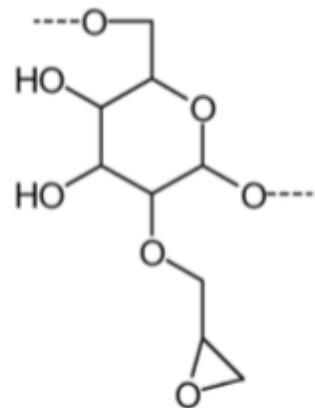
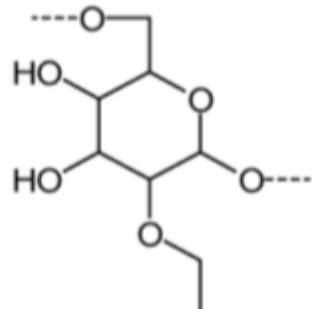
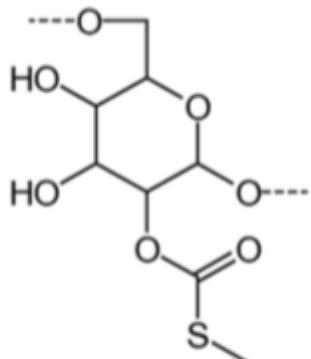
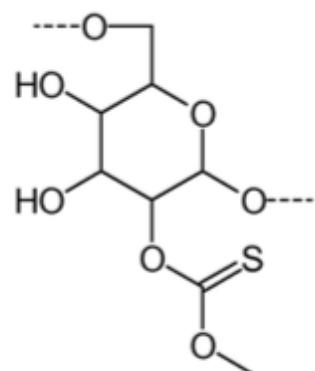
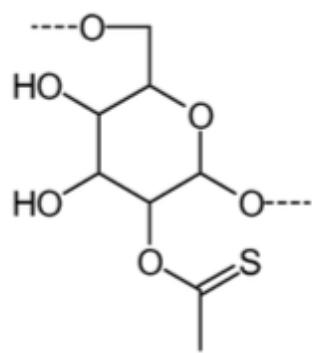
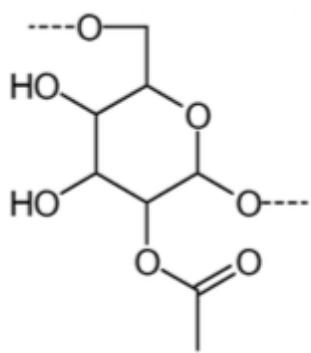
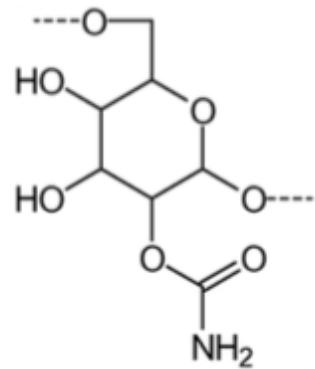
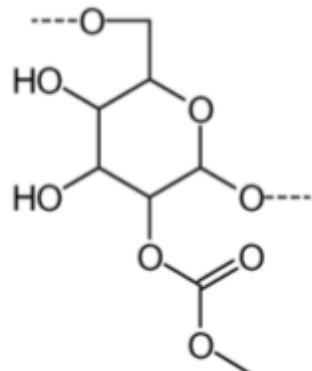
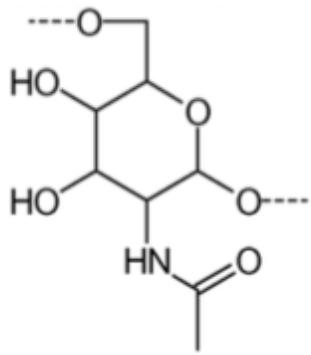
[0022] El término "hidroxialquilo" se refiere preferentemente a residuos de hidroxialquilo de C1-C4 lineales o ramificados que consisten en un total de 1 a 4 átomos de carbono, incluyendo los átomos de carbono de las ramas en donde uno de los átomos de hidrógeno está sustituido por un grupo hidroxilo tales como -CH₂OH, -C₂H₄OH, -CHOHCH₃, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CHOHCH₃, -CHOHCH₂CH₃, -cyclo- C₃H₄OH, -COH (CH₃)₂, -CH (CH₃)CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CHOHCH₃, -CH₂CH₂CHOHCH₂CH₃, -CHOHCH₂CH₂CH₃, - C (CH₃)₂CH₂OH, -CHOH-CH (CH₃)₂, -CH (CH₃) - CHOCH₃, -CCH₃OH-C₂H₅, -CH₂-C (CH₃)₂OH.

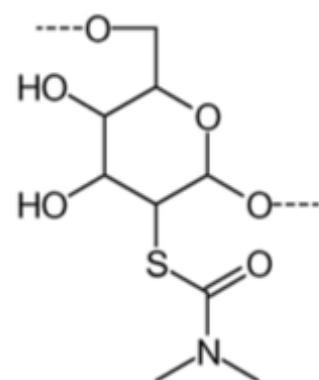
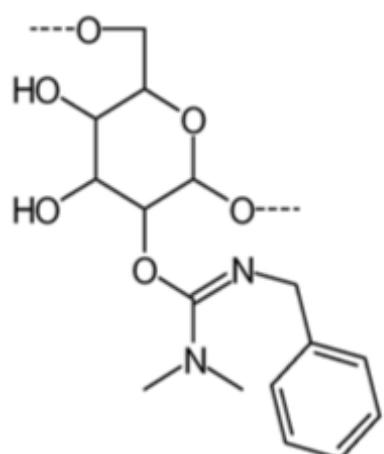
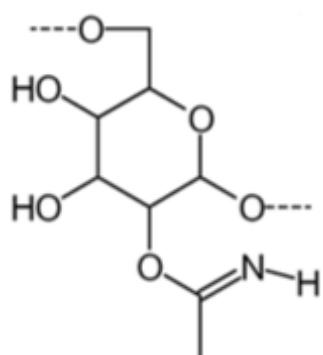
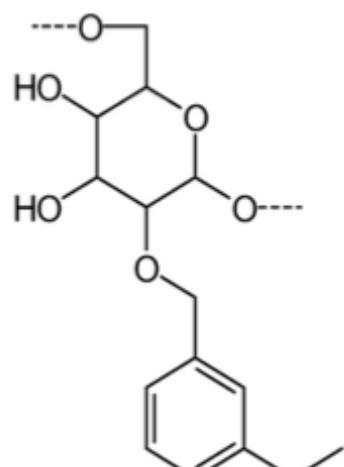
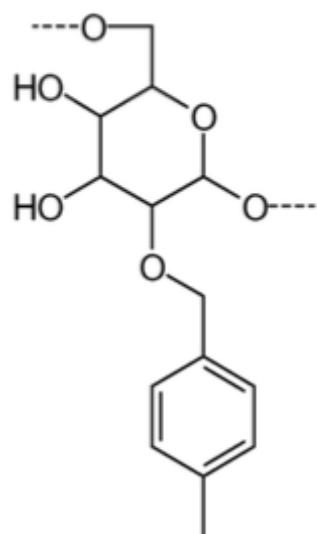
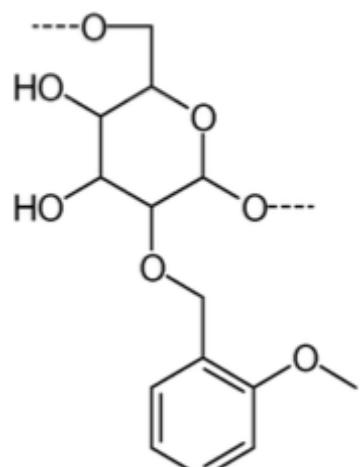
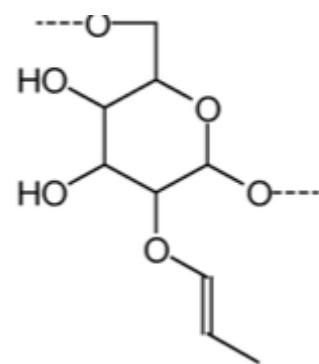
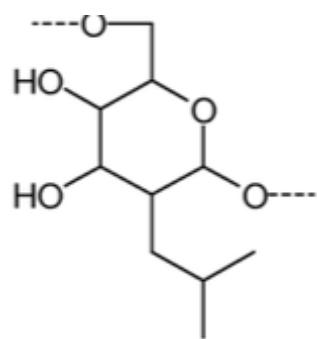
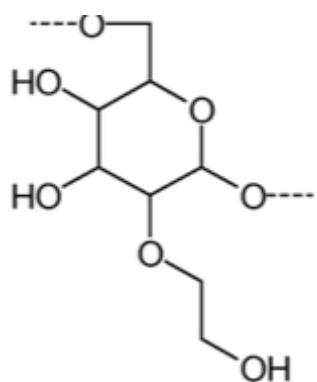
5 C3H7, -C2H4-CH = CH-C4H9, -C5H10-C (CH3) = CH2, -C4H8-CH (CH3) -CH = CH2, -C3H6-CH (CH3) -CH2- CH = CH2, -C2H4-CH (CH3) -C2H4-CH = CH2, -C4H8-CH = C (CH3) 2, -C4H8-C (CH3) = CH-CH3, -C3H6-CH (CH3) -CH = CH-CH3, -C2H4-CH (CH3) -CH2-CH = CH-CH3, -C3H6-CH = CH-CH (CH3) 2, -C3H6-CH = C (CH3) -C2H5, -C3H6-C (CH3) = CH-C2H5, -C2H4-CH (CH3) -CH = CH-C2H5, -C2H4-CH = CH-CH2-CH (CH3) 2, -C2H4-CH = CH-CH (CH3) -C2H5 , -C2H4-CH = C (CH3) -C3H7, -C2H4-C (CH3) = CH-C3H7, -C3H6-CH (CH3) -C (CH3) = CH2, -C2H4-CH (CH3) -CH2- C (CH3) = CH2, -C2H4-CH (CH3) -CH (CH3) -CH = CH2, -C3H6-C (CH3) 2-CH = CH2, -C2H4-C (CH3) 2-CH2-CH = CH2, -C3H6-C (CH3) = C (CH3) 2, -C2H4-CH (CH3) -CH = C (CH3) 2, -C2H4-C (CH3) 2-CH = CH-CH3, -C2H4- CH (CH3) -C (CH3) = CH-CH3, -C2H4-CH = C (CH3) -CH (CH3) 2, -C2H4-C (CH3) 2-C (CH3) = CH2, -C2H4-CH (C2H5) -C (CH3) = CH2, -C2H4-C (CH3) (C2H5) -CH = CH2, -C2H4-CH (CH3) -C (C2H5) = CH2, -C3H6-C (C3H7) = CH2, -C3H6-C (C2H5) = CH-CH3, -C2H4-CH (C2H5) -CH = CH-CH3, -C2H4-C (C4H9) = CH2, -C2H4-C (C3H7) = CH-CH3, -C2H4-C (C2H5) = CH-C2H5, -C2H4-C (C2H5) = C (CH3) 2, -C2H4-C [C (CH3) 3] = CH2, -C2H4-C [CH (CH3) (C2H5)] = CH2, - C2H4-C [CH2-CH (CH3) 2] = CH2, -C4H8-CH = CH-CH = CH2, -C3H6-CH = CH-CH2-CH = CH2, -C2H4-CH = CH-C2H4-CH = CH2, -C3H6-CH = CH-CH = CH-CH3, -C2H4-CH = CH-CH2-CH = CH-CH3, -C2H4-CH = CH-CH = CH-C2H5, -C3H6-CH = CH-CH = CH2, -C2H4-CH (CH3) = CH2, -C2H4-C (CH3) -CH = CH-CH = CH2 , -C2H4-CH = CH- CH2-C (CH3) = CH2, -C2H4-CH = CH-CH (CH3) -CH = CH2, -C2H4-CH = C (CH3) -CH2-CH = CH2, - C2H4-C (CH3) = CH- CH2-CH = CH2, -C2H4-C (CH3) 2, -C2H4-CH = CH-C (CH3) = CH-CH3, -C2H4-CH = C (CH3) -CH = CH-CH3, -C2H4-C (CH3) = CH-CH = CH-CH3, -C2H4-CH = C (CH3) -C (CH3) = CH2, -C2H4-C (CH3) = CH2, -C2H4-C (CH3) = C (CH3) -CH = CH2 y -C2H4-CH = CH-CH = CH-CH = CH2,

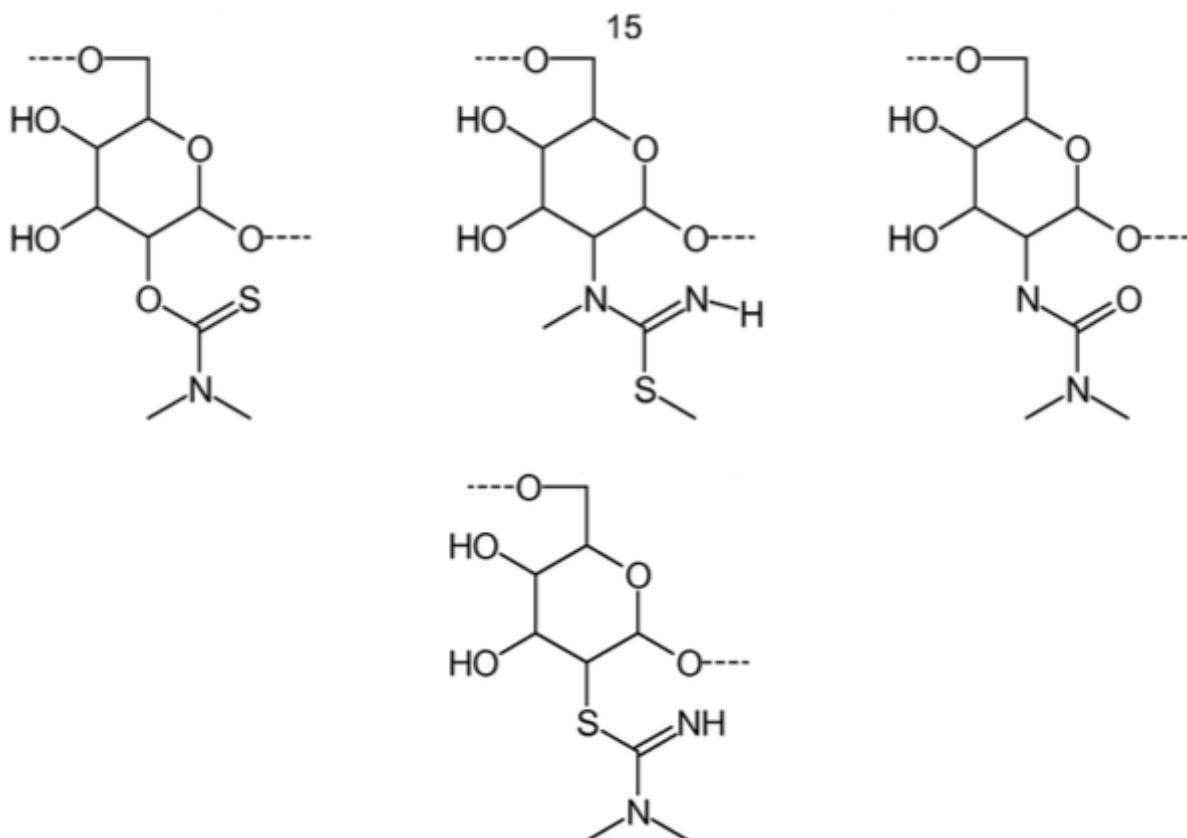
10 [0024] Tal como se utiliza aquí, el término alquilenilo se refiere a preferentemente "alquilenilo de C1-C4- lineal o ramificado", tales como --CH2--



25 [0025] Los ejemplos preferidos de grupos hidroxilos modificados de monómeros de hidratos de carbono del antígeno carbohidrato A son







[0026] Grupos hidroxilos modificados de monómeros de hidratos de carbono del hidrato de carbono antígeno A pueden estar formado por la activación del antígeno de hidratos de carbono con el fin de acoplar los residuos -L-CH-CA al antígeno carbohidrato. Dado que no todos los grupos activados del antígeno carbohidrato se acoplan después

5 a uno de los residuos -L-CH-CA, los grupos activados del antígeno de hidratos de carbono que permanecen no se convierten a un enlazador de antígeno (AL) de ligamiento. Tales grupos convertidos pero no activadas del antígeno carbohidrato normalmente se hidrolizan durante el preparatorio del complejo A [L-CH-CA] p y permanecen en el antígeno carbohidrato A como amida, carbonato, carbamato, carbonilo, tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, tioéster, éter, epoxi, hidroxialquilo, alquilenilo, fenileno, alquenilo, imino, imida, isourea, tiocarbamato, tiourea y / o restos de urea.

10 **[0027]** Eso significa que, en caso de que el hidrato de carbono antígeno A se activa para formar el enlace covalente a los residuos de L-CH-CA, el antígeno aislado o sintetizado originalmente se modifica para soportar tales amida, carbonato, carbamato, carbonilo, tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, tioéster, éter, epoxi, hidroxialquilo, alquilenilo, fenileno, alquenilo, imino, imida, isourea, tiocarbamato, tiourea y / o restos de urea.

15 **[0028]** Sólo en caso de que el residuo L-CH-CA se activa en el L-terminal para formar el enlace covalente al antígeno carbohidrato A, los grupos funcionales del antígeno carbohidrato A que no están vinculados a los residuos -L-CH-CA permanecen inalteradas.

20 **[0029]** En general, el antígeno de carbohidrato consiste en una pluralidad de monómeros de hidratos de carbono, en el que cada monómero de hidratos de carbono tiene, además, más de una funcionalidad que podría ser utilizado para una unión covalente del residuo -L-CH-CA, por tanto, más de un residuo -L-CH-CA y, en general un mayor número de residuos de -L-CH-CA pueden unirse a un antígeno carbohidrato de A. Es evidente para una persona experimentada que cuántos más residuos de -L-CH-CA se pueden unir a un antígeno carbohidrato, cuántos más monómeros carbohidrato se encuentran en dicho antígeno carbohidrato. Por ejemplo, un antígeno de carbohidrato que consta de 2 ($u = 2$) monómeros de carbohidrato puede soportar 1, 2, 3 o 4 residuos -L-CH-CA, mientras que un antígeno de carbohidrato que consiste en 50 ($u = 50$) monómeros de hidratos de carbono puede soportar entre 2 y 50 residuos -L-CH-CA, y un antígeno de hidratos de carbono que consiste en 3.000 ($u = 3,000$) monómeros de hidratos de carbono puede tener entre 50 y 400 residuos -L-CH-CA.

25 **[0030]** El modo de enlace está representado por el número entero p. p es el número de residuos -L-CH-CA, que se une al antígeno carbohidrato A.

30 p representa un número entero de 1 a ($\Phi * u$), donde Φ representa los números enteros siguientes: $\Phi = 2$ (si u es 1 a 4 1); $\Phi = 1$ (si u es 5 a 10); $\Phi = 0,5$ (si u es de 11 a 100); $\Phi = 0,2$ (si u es 101 a 1000); $\Phi = 0,04$ (si u es 1001-10000); donde u es el número de monómeros de hidratos de carbono del antígeno carbohidrato A.

[0031] En otra realización preferida de la invención, p es un número entero y se define como sigue:

siendo u el número de monómeros de hidratos de carbono del antígeno carbohidrato A.

15 [0032] En una realización preferida de esta invención p es un número entero comprendido en el intervalo de $0,02u \leq p \leq (0,7u + 3)$ con la condición de que $p \geq 1$, en el que u es un número entero de 1 a 10000, que representa el número total de monómeros de hidratos de carbono dentro del antígeno de carbohidrato A.

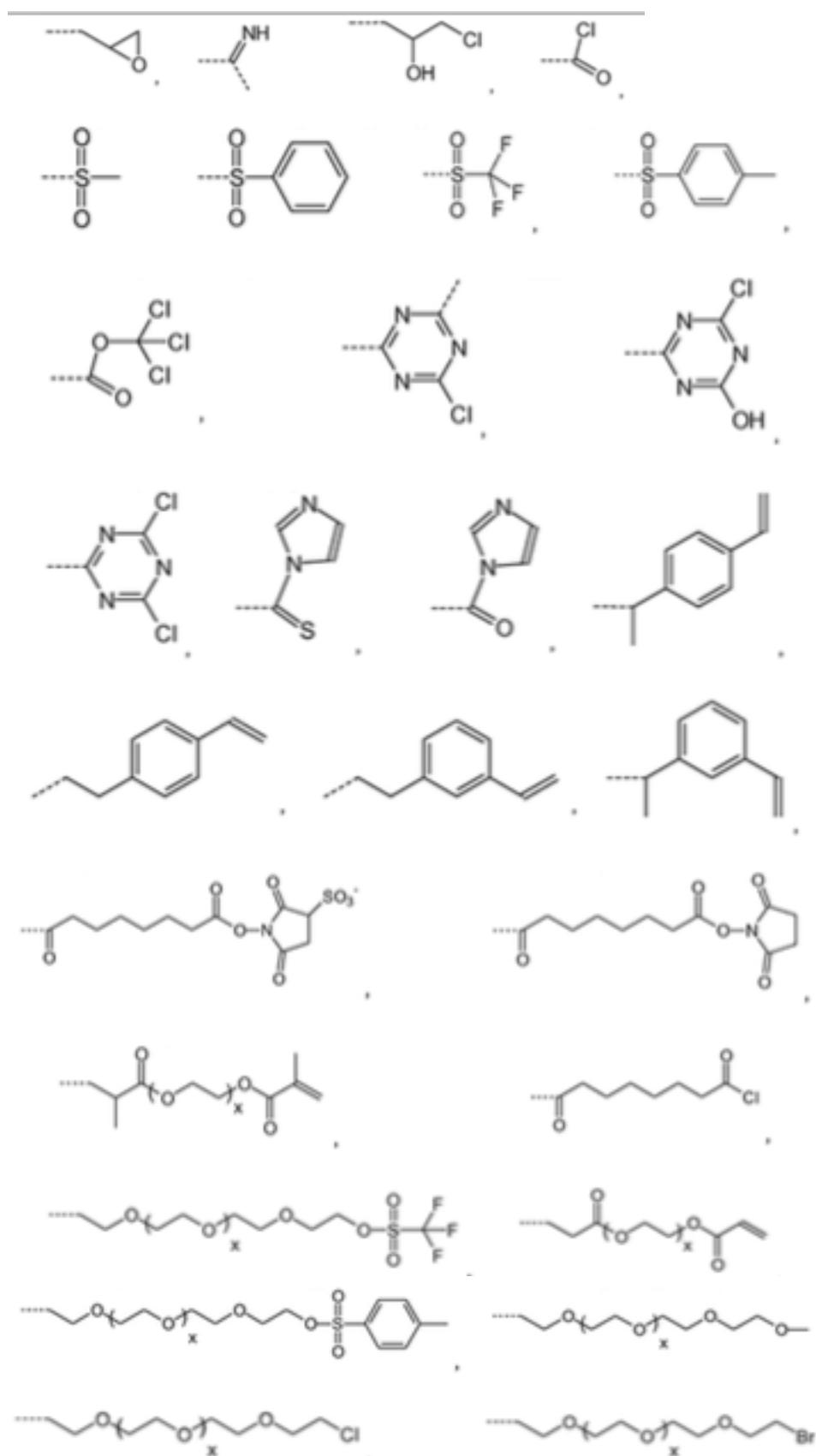
[0033] Con el fin de conectar el enlazador L o, respectivamente, el resto -L-CH-CA al antígeno de hidratos de carbono, dos modos son posibles. Por un lado el antígeno podría ser activado y luego reaccionado con el enlazador L o el resto -L-CH-CA o, por otra parte, el enlazador L podría ser activado y luego reaccionado con el antígeno.

[0034] En caso de que el enlazador L se activa con el fin de formar un enlace covalente con el antígeno carbohidrato, el número p de restos -L-CH-CA presente en el antígeno carbohidrato depende de los equivalentes molares de los restos -L-CH-CA en lo que se refiere al número de monómeros u carbohidrato presentes en el antígeno carbohidrato. Por lo tanto, si $u = 100$, es decir, el antígeno de carbohidrato A consta de 100 monómeros de hidratos de carbono, un equivalente molar de la fracción -L-CH-CA, significa que cada antígeno de hidratos de carbono tiene un único resto -L-CH-CA, mientras que 50 equivalentes molares de los restos -L-CH-CA significa que en promedio cada segundo monómero carbohidrato del antígeno carbohidrato A tiene un resto -L-CH-CA, mientras que 200 equivalentes molares significa que, en promedio, cada monómero carbohidrato del antígeno carbohidrato A tiene dos restos -L-CH-CA.

En caso de que el hidrato de carbono antígeno A se activa y no el enlazador L, el antígeno carbohidrato comprende normalmente un mayor número de grupos activados que teóricamente pueden todos formar un enlace covalente con el enlazador L o respectivamente con el resto -L-CH-CA. Generalmente, no todos los grupos activados de la antígeno carbohidrato A se hacen reaccionar con el enlazador L o respectivamente con el resto -L-CH-CA, por lo tanto varios grupos activados permanecen en el antígeno carbohidrato después de la reacción con el enlazador L o respectivamente con el resto -L-CH-CA. Estos grupos activados restantes normalmente reaccionan durante el tratamiento del producto de reacción del antígeno de hidratos de carbono activado con el enlazador L o respectivamente con el resto -L-CH-CA. Así, durante estos estudios diagnósticos, estos grupos restantes activados del antígeno carbohidrato A son, por ejemplo, hidrolizados, oxidados, isomerizados, ciclizados y / o reticulados. Durante el trabajo y especialmente durante el tratamiento acuoso estos grupos activados restantes se convierten, por ejemplo, a amida, carbonato, carbamato, carbonilo, tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, tioéster, éter, epoxi, hidroxialquilo, alquilenilo, fenileno, alquenilo, imino, imida, isourea, tiocarbamato, tiourea y / o restos de urea.

45 **[0035]** Los grupos activados que se pueden convertir en la amida, carbonato, carbamato, carbonilo, tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, tioéster, éter, epoxi, hidroxialquilo, alquíleno, feníleno, alquenilo, imino, imida, isourea, 50 tiocarbamato, restos de tiourea y urea son, por ejemplo, ciano, cloro, bromo, yodo, azido, grupos imino, grupos vinilo, estirilo y alilo, anhídridos, oxiranos, cianatos, tiocianatos, isocianatos, isotiocianatos, triazinas y especialmente 1,3,5 triazinas, imidazoles, éteres metoxi, así como grupos sulfonilo tales como para-toluenosulfonilo (TS), anesulfonyl trifluorometh- (TF-, CF₃SO₂-), bencenosulfonilo (C₆H₅SO₂-) o de metanosulfonilo (Ms-).

[0036] A continuación, se dan ejemplos más específicos para este tipo de grupos activados. El método de activación que comprende la modificación de los grupos funcionales de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno de hidratos de carbono puede conducir a la formación de restos activados que están unidos covalentemente a heteroátomos (N, O, S) de las funcionalidades del antígeno carbohidrato, en donde los restos activados pertenecen preferentemente al siguiente grupo que comprende o que consiste en: -N3, -CN, -CH2-CH = CH2, -CH = CH2, -OCH3, -Cl, -Br, -I, -OCN, -NCO, -SCN, -NCS, -CO-O-CO-CH3, -CO-O-CO-C2H5,



siendo x un número entero de 1 a 60.

5

[0037] Por lo tanto, la modificación de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno carbohidrato también implica que los monómeros de carbohidratos comprenden o contienen amida, carbonato, carbamato, carbonilo,

5 tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, tioéster, éter, epoxi, hidroxialquilo, alquilenilo, fenileno, alquenilo, imino, imida, isourea, tiocarbamato, tiourea y / o urea restos. Eso significa, que la modificación de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno carbohidrato A implica que los grupos funcionales de los monómeros de hidratos de carbono se modifican para amida, carbonato, carbamato, carbonilo, tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, tioéster, éter, epoxi, hidroxialquilo , alquilenilo, fenileno, alquenilo, imino, imida, isourea, tiocarbamato, tiourea y / o restos de urea.

10 [0038] Por lo tanto, la modificación optativa de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno de hidratos de carbono puede ser el resultado de un método de activación que comprende la reacción de las funcionalidades de hidratos de carbono con el agente de un activación o varios agentes de activación y en el que el agente de activación o los agentes de activación puede formar especialmente después de la hidrólisis, oxidación, isomerización, ciclación y / o reticulación de amida, carbonato, carbamato, carbonilo, tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, tioéster, éter, epoxi, hidroxialquilo, alquilenilo, fenileno, alquenilo, imino, imida, isourea, bamate thiocar-, tiourea y / o restos de urea.

15 [0039] El agente o agentes de activación mencionados se pueden utilizar para el acoplamiento del antígeno carbohidrato a la enlazador L o respectivamente a los residuos **-L-CH-CA** y pertenecen preferiblemente al grupo que comprende:

20 bromuro de alilo, cloruro de alilo, bis-NHS-ésteres como bis [sulfosuccinimidil] suberato, bromuro de cianógeno, 1,4-divinil éter cyclohexan- edimethanol, 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), N, N '- (1,2-dihidroxietileno) bisacrilamida, zene divinylben-, epiclorhidrina (ECH), etileno-glicol-di (met) acrilatos, diacrilatos, etilenglicol-N-hidroxisuccinimida (NHS), N- (1-hidroxi-2,2-dimetoxietil) acrilamida, metilenbisacrilamidas , 4,4'-metilenbis (cianato cyclohexyliso-), 1,4-phenylenediacryloylchloride, fosgeno, difosgeno, trifosgeno, polietileno-glicol-di (met) acrilato de ylates, polietileno-glicol-diacrilatos, tetraetilenglicol dimetil éter, 1, 1'-thiocarbonyldiimidazol (TCDI), thi- ophosgene, 2,4,6-triclorotriazina (TCT).

25 [0040] En caso de que el hidrato de carbono antígeno A se activa, el método de activación conduce a una conversión de las funcionalidades de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno carbohidrato en especies activadas que reaccionan con los residuos **-L-CH- CA** en un paso posterior.

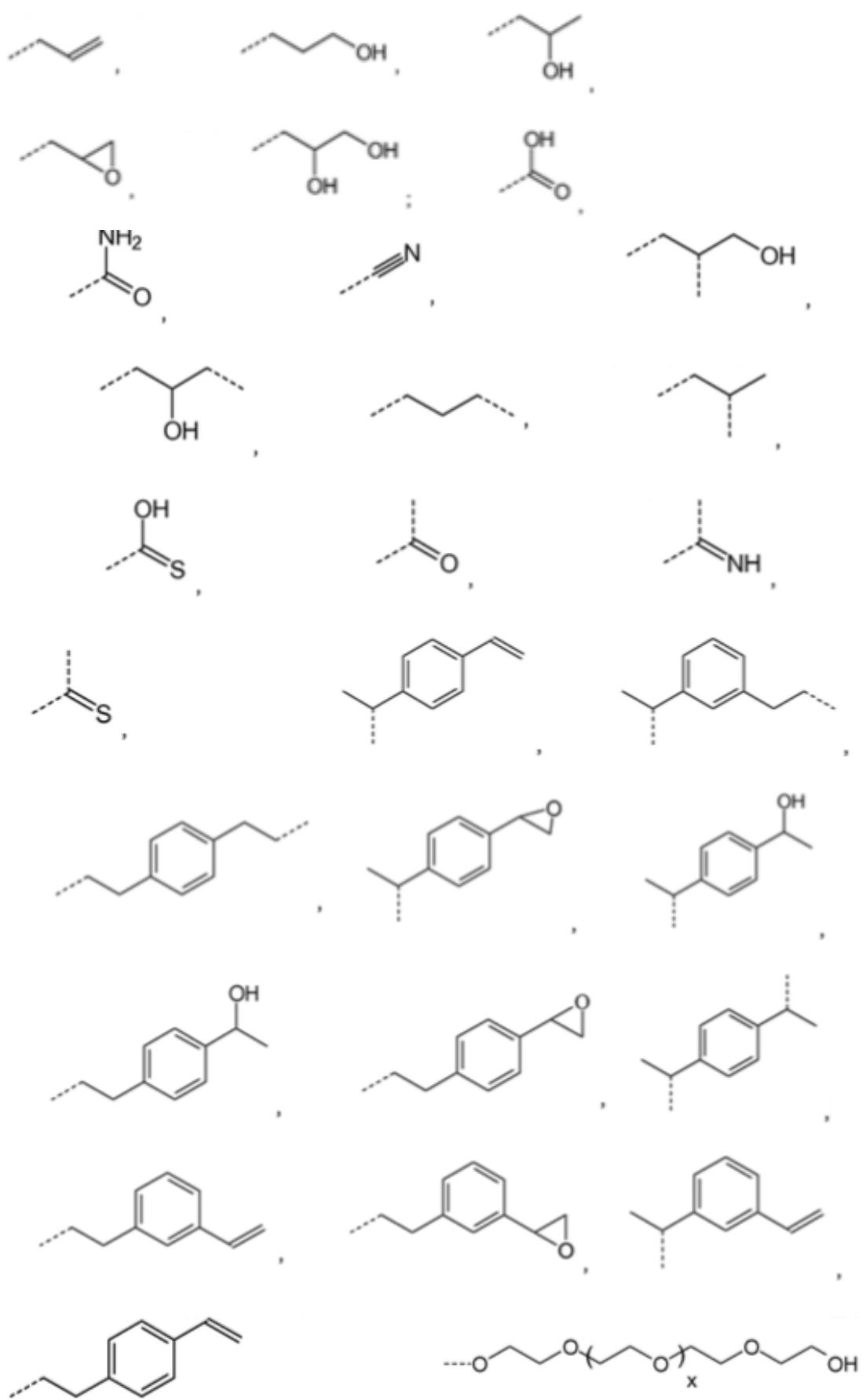
30 [0041] No todos los grupos activados del antígeno carbohidrato A reaccionan con los residuos **-L-CH-CA** y pueden, por tanto, hidrolizar, oxidar, isomerizar, ciclar o reticular con otros restos de azúcar del antígeno de carbohidratos durante el estudio diagnóstico para formar residuos hidrolizados, oxidados, isomerizados, ciclados o reticulados. Estos residuos hidrolizados, oxidados, isomerizados, ciclizados o reticulados se derivan del agente de activación en 35 sí y su química debido a la hidrólisis, oxidación, isomerización, ciclización o reacciones de reticulación. Los residuos oxidados, isomerizados, hidrolizados, ciclados o reticulados se unen covalentemente a cualquier heteroátomo (N, O, S) de las funcionalidades de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno de hidratos de carbono, y pertenecen preferiblemente al grupo que comprende o que consiste en:

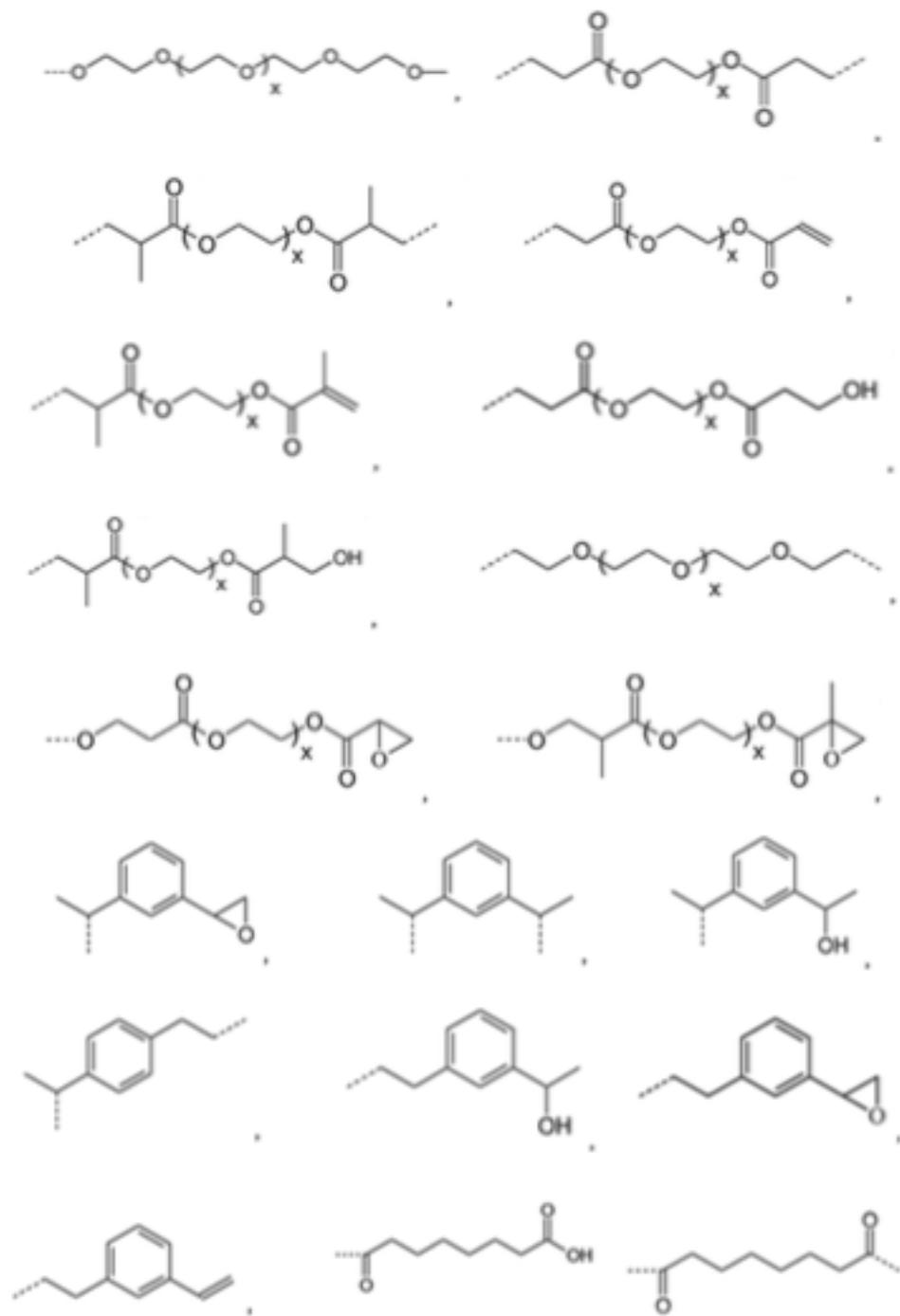
40

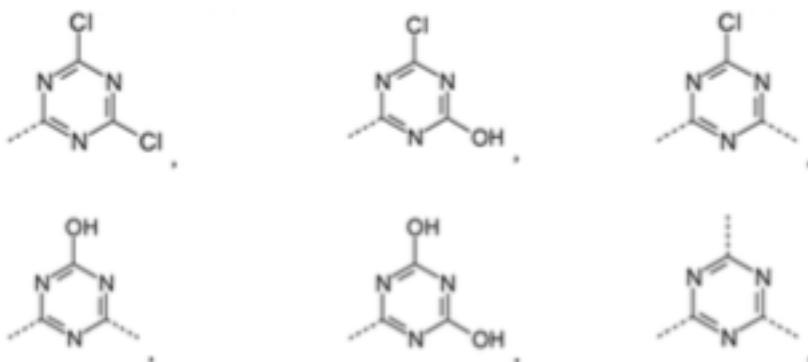
45

50

55





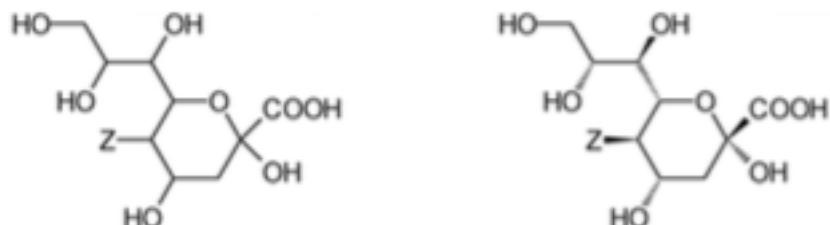


siendo x un número entero de 1 a 60.

5 [0042] La modificación de las funcionalidades de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno de hidratos de carbono comprende la reacción de las funcionalidades de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno de hidratos de carbono con el agente de activación o agentes de activación y / o con el reticulador activado L o respectivamente el reticulador activado L en -L-CH-CA o cuando los monómeros de carbohidrato del antígeno carbohidrato con el reticulador no activado para formar un enlace covalente entre el heteroátomo (N, O, S) de la funcionalidad del monómero de hidratos de carbono o el hidrato de carbono modificado monómero y el agente de activación y / o con el enlazador activado o no activado L. La formación de este enlace covalente se acompaña de la escisión de un NH, OH o SH enlace y la pérdida de un átomo H. Posibles reacciones para la formación de este enlace covalente pertenecen al grupo que comprende la sustitución nucleofílica, esterificación, eterificación, amidación, acilación.

10 15 [0043] Los monómeros de carbohidratos del carbohidrato antígeno A pertenecen preferentemente a hexosas, pentosas, tetrosas o ácidos siálicos.

[0044] En una realización preferida de la invención, los ácidos siálicos pertenecen al grupo de derivativos sustituidos Nor O de ácido neuramínico de la siguiente fórmula:



20 representando Z -NH₂, -NHAc, o -OH.

[0045] En el caso que un monómero de ácido tal siálico de hidratos de carbono está presente en el antígeno carbohidrato A, la vinculación con el monómero de hidratos de carbono posterior se logra a través de un enlace glucosídico (y la sustitución del correspondiente átomo de hidrógeno en el grupo hidroxilo glucosídico) y / o a través de la vinculación de otro monómero de hidratos de carbono a uno de los grupos hidroxilo del ácido siálico por la sustitución del átomo de hidrógeno correspondiente en este grupo hidroxilo.

[0046] En una realización preferida, el monómero de hidratos de carbono en ácido siálico se representa dentro del edificio bloques A de la siguiente manera:

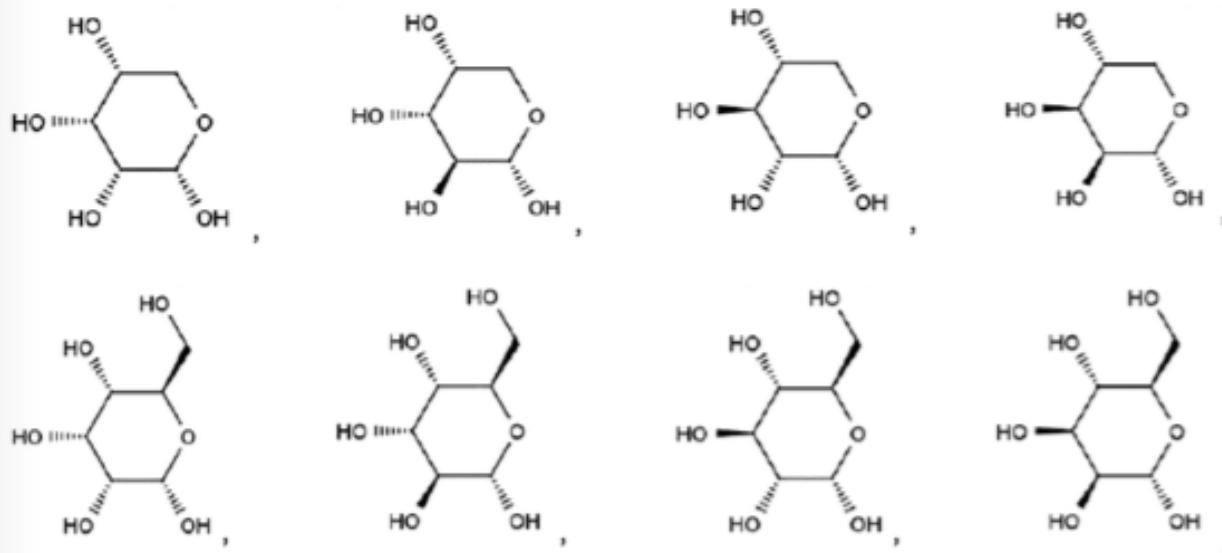


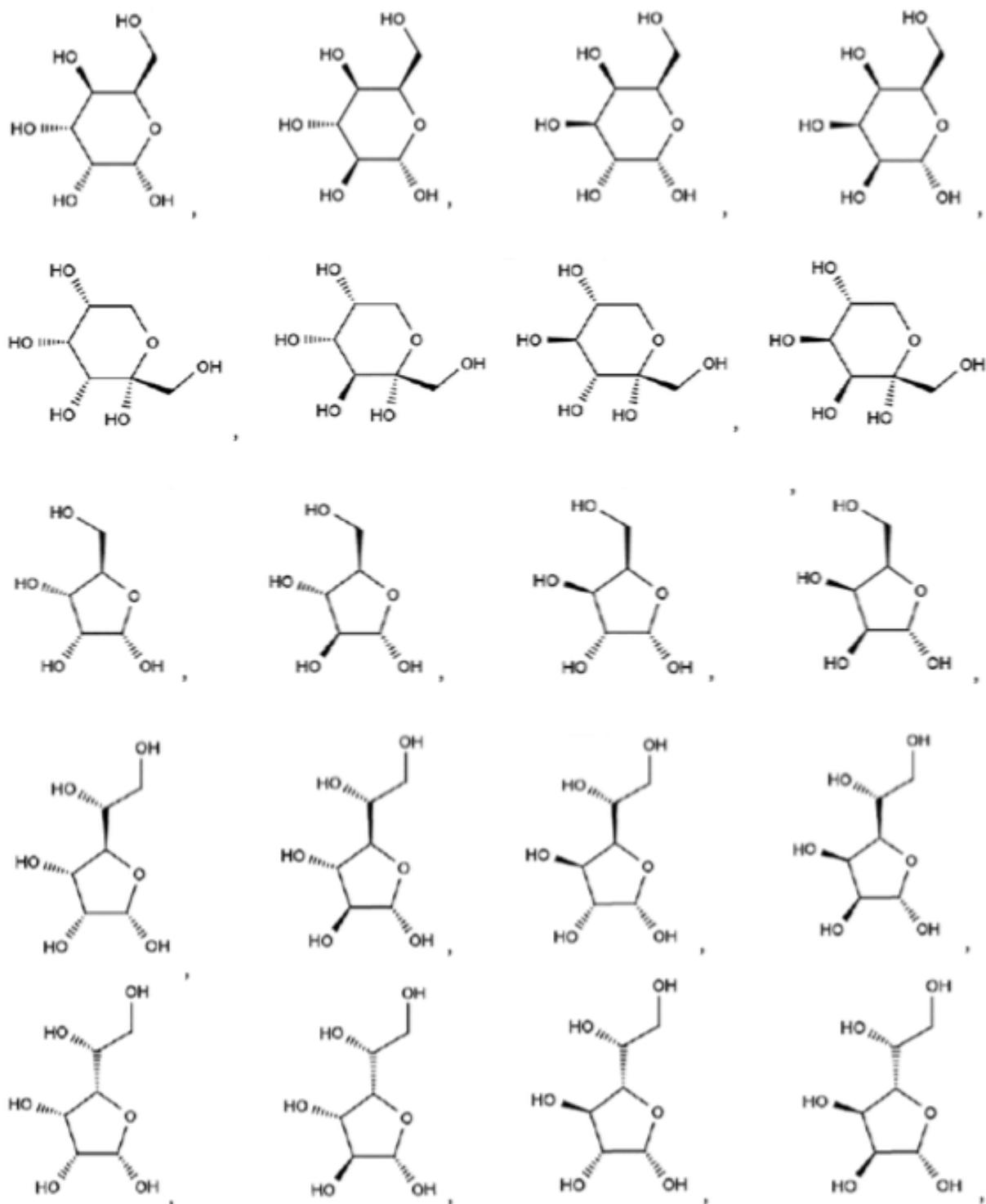
representa Z -NH₂, -NHAc, o -OH.

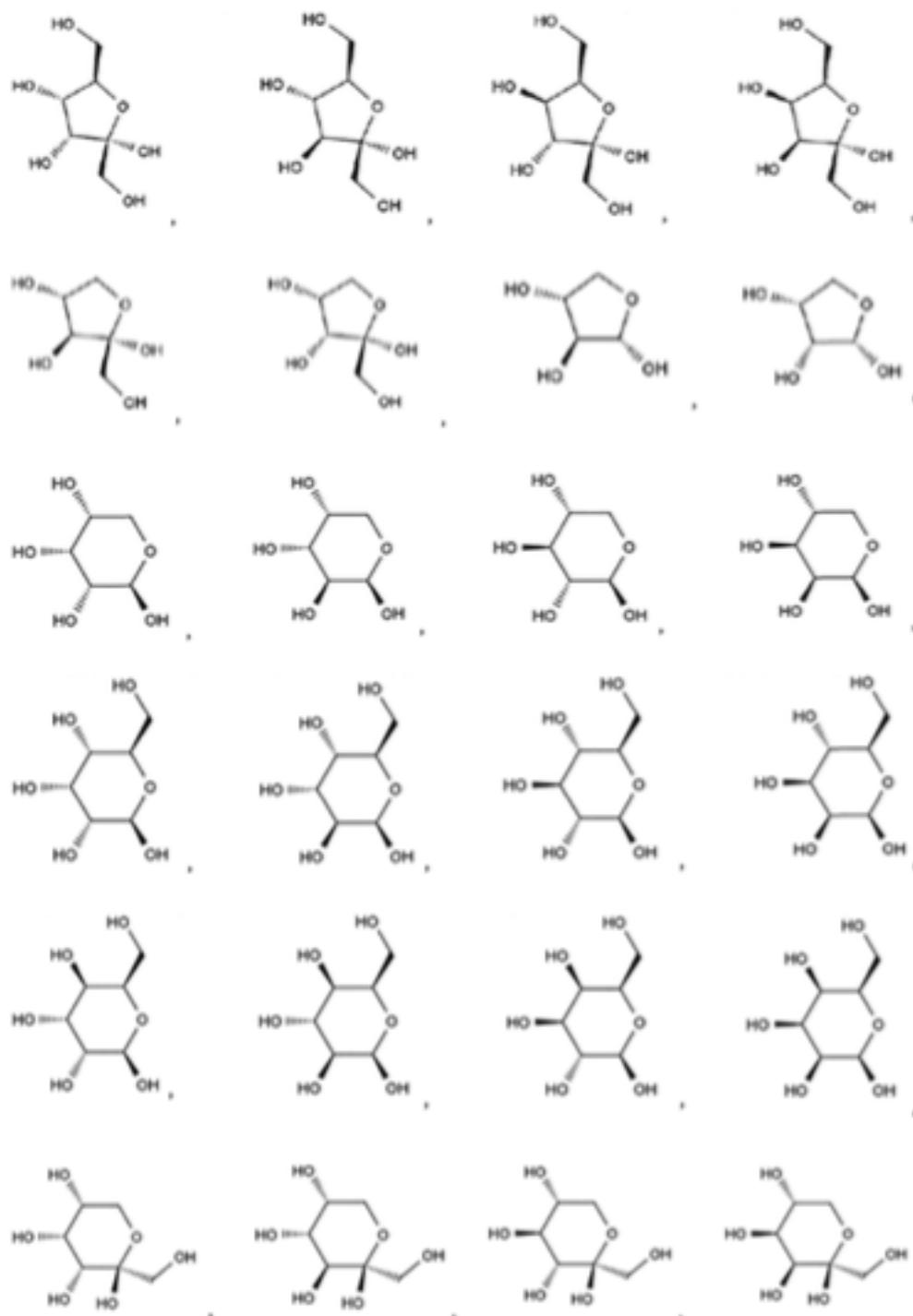
[0047] En una realización preferida de la invención, los monómeros de hidratos de carbono utilizados de la A-resto pertenecen a los siguientes grupos de α - y β -D / L-hidratos de carbono que comprende o consiste de:

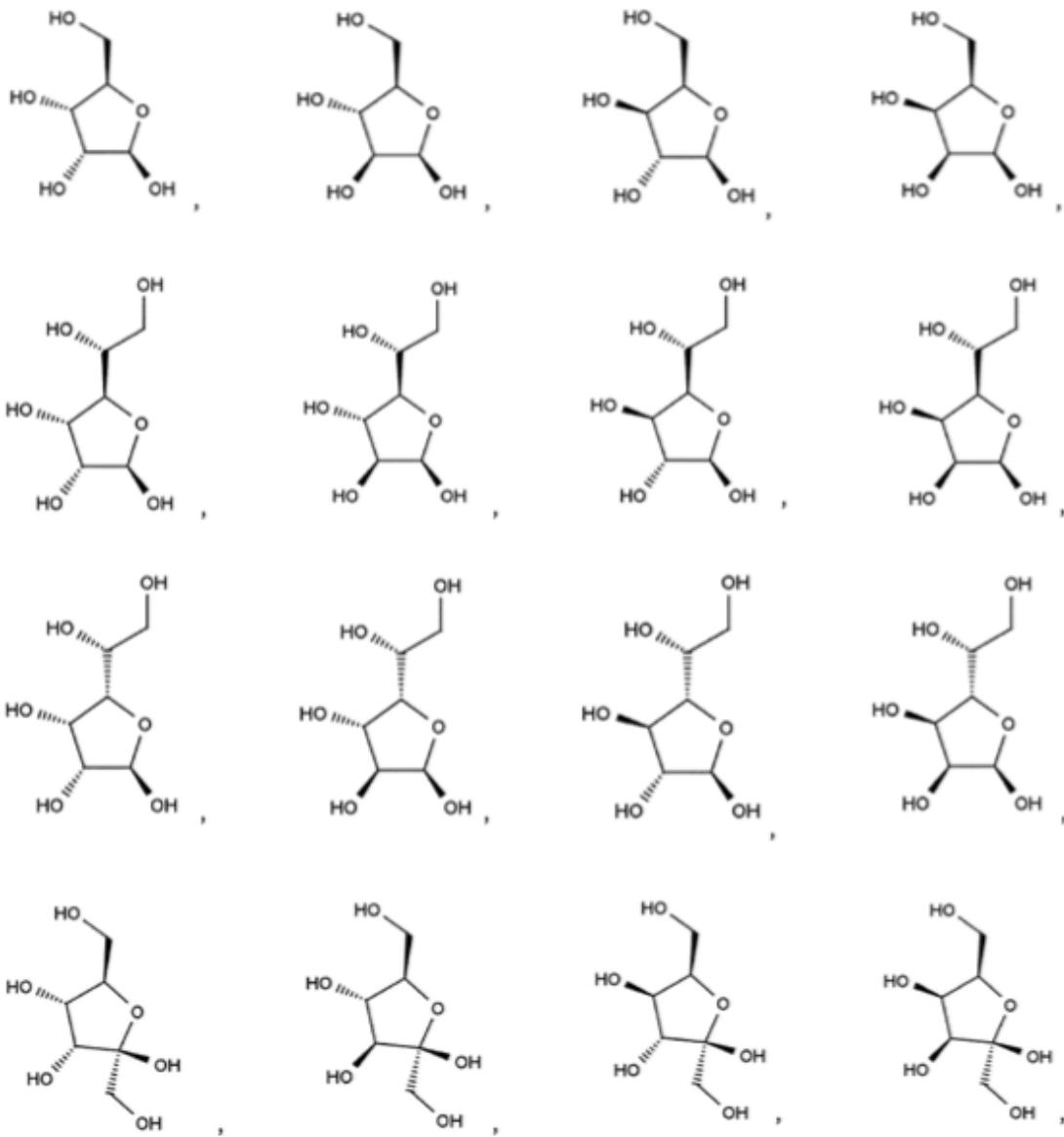
5 α -D-ribopyranose, α -D-arabinopiranosa, α -D-xilopiranosa, α -D-lyxopyranose, α -D-allopyranose, ose α -D-altropyran-,
 α -D-glucopiranosa, α -D-mannpyranose, α -D-glucopiranosa, α -D-idopyranose, α -D-galactopiranosa, talopiranosa α -D-,
 α -D-psicopyranose, α -D-fructopiranosa, α -D-sorbopiranosa, α -D-tagatopyranose, α -D-ribofuranose, ose, α -D-
10 arabinofuranosa, α -D-xilofuranosa, α -D-lyxofuranose, α -D-Allofuranose, α -D-Altropuranose, α -D-glucofuranosa, α -D-
 α -D-manofuranosa, α -D-gulofuranose, α -D-idofuranose, α -D-galactofuranosa, α -D-talofuranose, psicofuranose α -D-, α -D-
15 fructofuranosa, α -D-sorbofuranosa, α -D-tagatofuranose, α -D-xylulofuranose, α -D-ribulofuranose, ose, α -D-
 α -D-threofuranose, α -D-ramnopiranosa, α -D-erythrofuranose, α -D-glucosamina, D- α -ácido glucopiranurónico, β -D-
20 ribopyranose, β -D-arabinopiranosa, β -D-xilopiranosa, β -D-lyxopyranose, β -D-allopyranose, β -D-altropyranose, β -D-
 β -D-glucopiranosa, β -D-mannpyranose, β -D-glucopiranosa, β -D-idopyranose, β -D-galactopiranosa, β -D-talopyranose,
25 β -D-psicopyranose, β -D-fructopiranosa, β -D-sorbopiranosa, β -D-tagatopyranose, β -D-ribulofuranose, β -D-
 β -arabinofuranosa, β -D-xilofuranosa, β -D-lyxofuranose, β -D-ramnopiranosa, β -D-allofuranose, β -D-altropuranose, β -
30 D-glucofuranosa, β -D-manofuranosa, β -D-gulofuranose, β -D-idofuranose, β -D-galactofuranosa, β -D-talofuranosa,
 β -D-psicofuranose, β -D-fructofuranosa, β -D-sorbofuranosa, β -D-tagatofuranose, β -D-xylulofuranose, β -
 β -D-ribulofuranose, β -D-threofuranose, β -D-erythrofuranose, β -D-glucosamina, D- β -glucopiranurónico ácido, α -L-
 α -L-ribopyranose, α -L-arabinopiranosa, α -L-xilopiranosa, α -L-lyxopyranose, α -L-allopyranose, α -L-altropyranose, α -
 α -L-glucopiranosa, α -L-mannpyranose, α -L-glucopiranosa, α -L-idopyranose, α -L-galactopiranosa, α -L-talopyranose, α -
 α -L-psicopyranose, α -L-fructopiranosa, α -L-sorbopiranosa, α -L-tagatopyranose, α -L-ramnopiranosa, α -L-ribofuranosa,
 α -L-arabinofuranosa, α -L-xilofuranosa, α -L-lyxofuranose, α -L-Allofuranose, α -L-Altropuranose, α -L-
 α -L-glucofuranosa, α -L-manofuranosa, α -L-gulofuranose, α -L-idofuranose, α -L-galactofuranosa, α -L-talofuranose,
 α -L-psicofuranose, α -L-fructofuranosa, α -L-sorbofuranosa, α -L-tagatofuranose, α -L-xylulofuranose, α -L-
 α -L-erythrofuranose, α -L-glucosamina, α -L-glucopiranurónico ácido, β -L-ribopyranose, arabinopiranosa β -L-, β -L-
 β -L-xilopiranosa, β -L-lyxopyranose, β -L-allopyranose, β -L-altropyranose, β -L-glucopiranosa, β -L-mannpyranose, β -L-
 β -L-glucopiranosa, β -L-idopyranose, β -L-galactopiranosa, β -L-talopiranosa, β -L-psicopyranose, β -L-fructopiranosa, β -
 β -L-sorbopiranosa, β -L-tagatopyranose, β -L-ribulofuranose, β -L-arabinofuranosa, β -L-lyxofuranose, β -L-
 β -L-allofuranose, β -L-altropuranose, β -L-glucofuranosa, β -L-manofuranosa, β -L-gulofuranose, β -L-idofuranose, β -L-
 β -L-galactofuranosa, β -L-talofuranose, β -L-psicofuranose, β -L-fructofuranosa, sorbofuranosa β -L-, β -L-tagatofuranose,
 β -L-xylulofuranose, β -L-ribulofuranose, β -L-threofuranose, β -L-erythrofuranose, β -L-glucosamina, ácido β -L-
 β -L-glucopiranurónico, y β -L-ramnopiranosa.

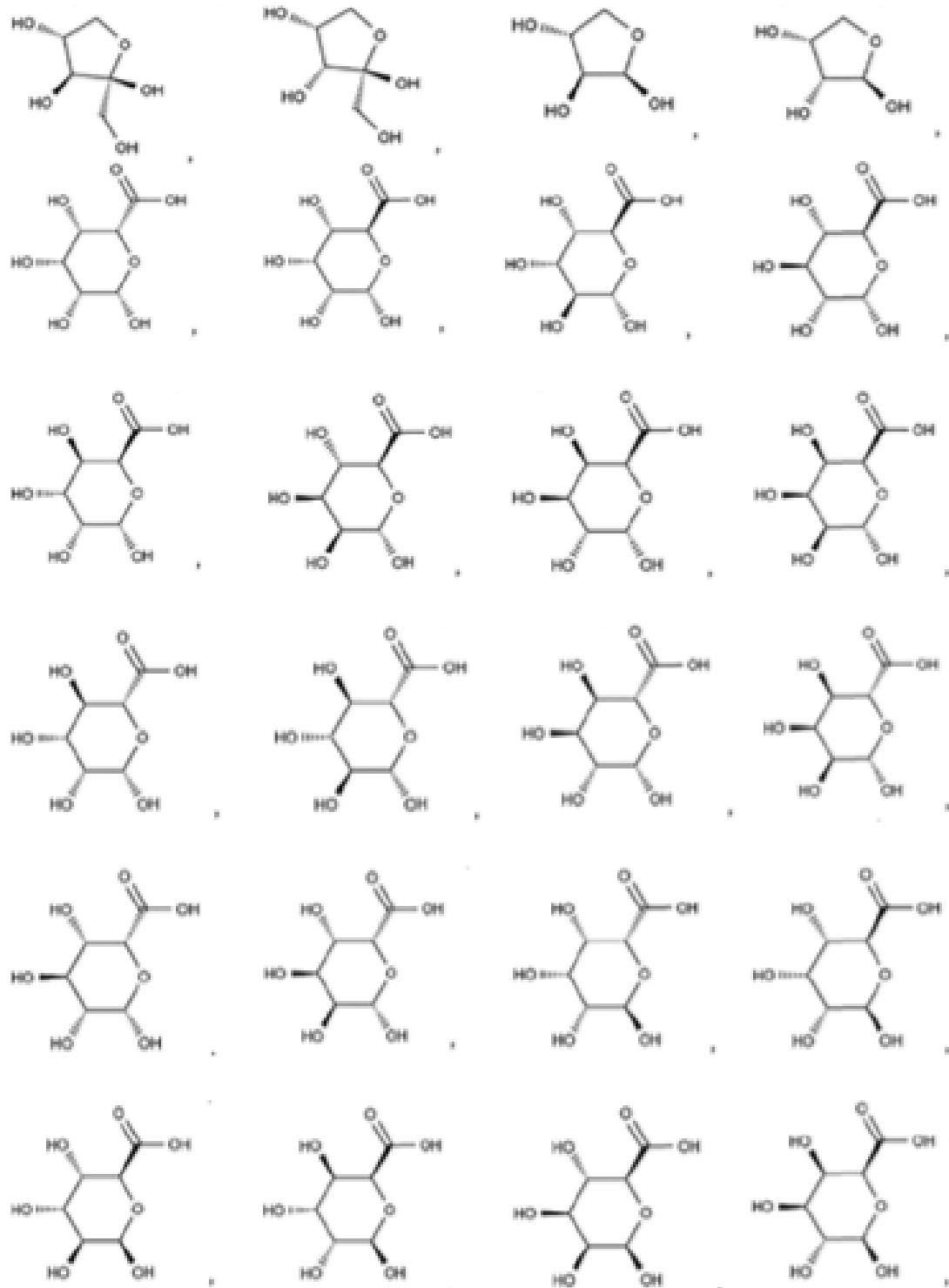
[0048] En otra realización preferida de la invención, los monómeros de hidratos de carbono del A y del resto CH se seleccionan independientemente uno de otro del grupo que comprende o que consiste en los siguientes hidratos de carbono α y β -D-:

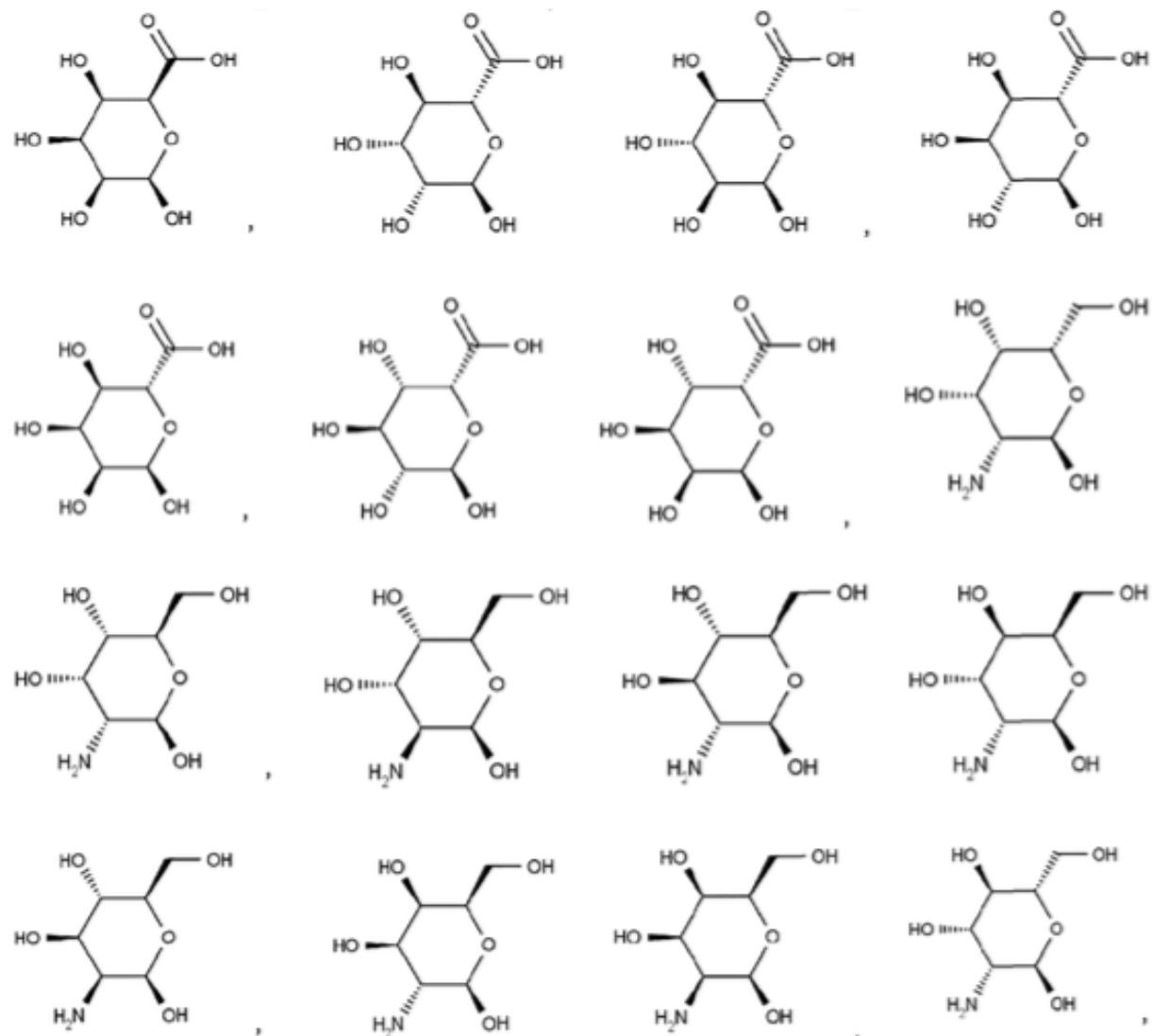


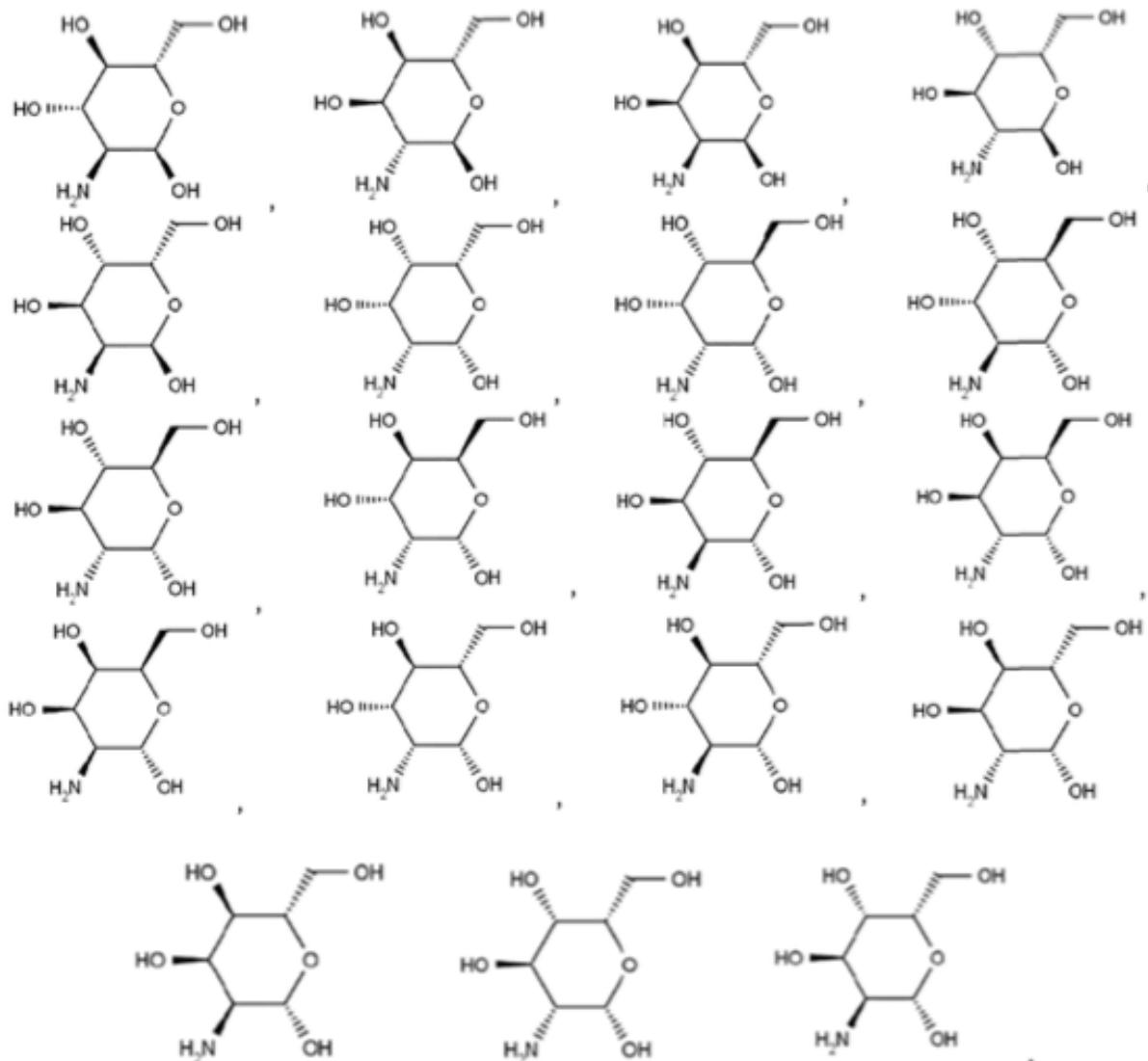












[0049] De acuerdo con la presente invención, estos monómeros de hidratos de carbono, como se definen aquí, son abundantes en un antígeno y se producen como la vinculación de bloques de construcción por desprotonación de dos átomos de hidrógeno de diferentes grupos hidroxilos y formación de un enlace con el resto de la molécula del antígeno A y para el resto L, respectivamente.

5

[0050] L representa un resto enlazador que está covalentemente unido a cualquier átomo, especialmente cualquier heteroátomo y más preferiblemente cualquier átomo de oxígeno de un antiguo grupo hidroxilo de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno carbohidrato. Además, el enlazador L se une covalentemente a cualquier heteroátomo de CH y, especialmente, cualquier átomo de oxígeno de un grupo hidroxilo de CH. Por lo tanto, la molécula enlazadora enlaza el antígeno A con el resto de carbonhydrate CH. Además, de acuerdo con la presente invención la interconexión entre el antígeno A y el resto de carbonhydrate CH se produce como se describe en el presente documento preferentemente por la activación de los monómeros de hidratos de carbono del hidrato de carbono antígeno A y / o por la activación de la molécula enlazadora. De este modo, en una realización preferida de la presente invención, no se conecta simplemente el antígeno A con el resto de carbonhydrate CH a través del enlazador L, sino que se conecta el antígeno A y el resto de carbonhydrate CH con la Ceramida CA, formando los compuestos inventivos de la fórmula general (I)

10

15

A [L-CH-CA] p (I).

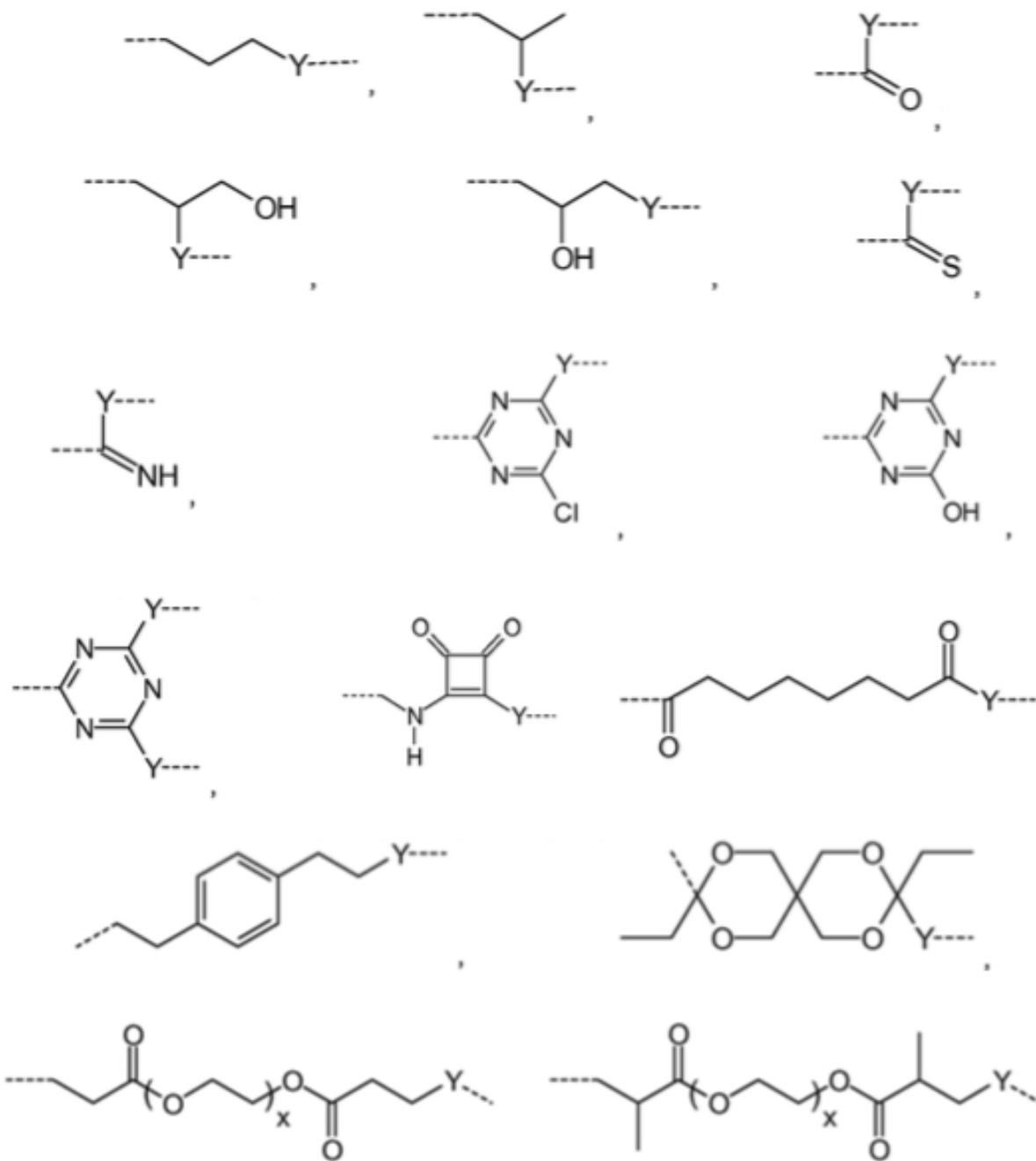
20

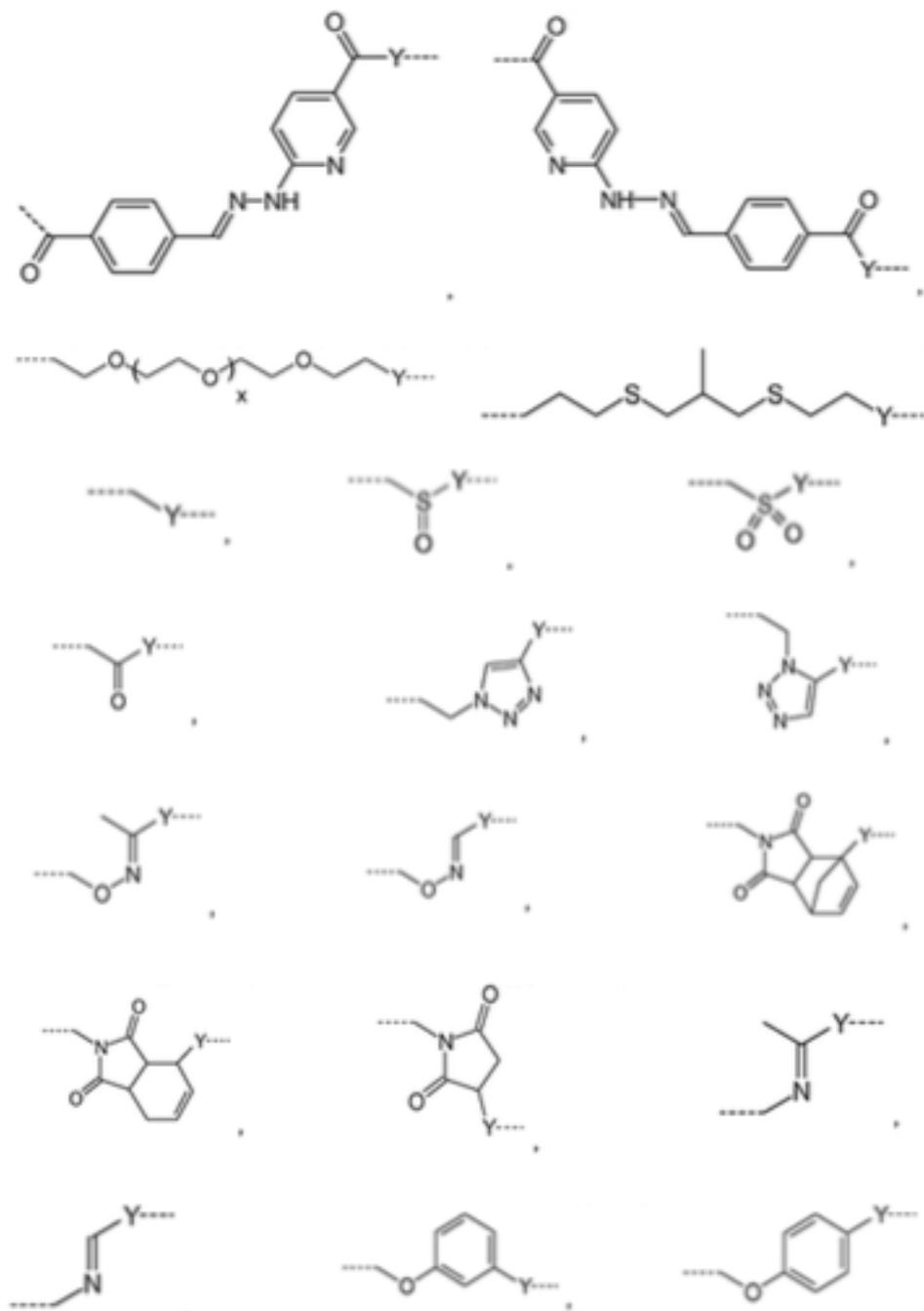
[0051] El enlazador L se puede subdividir en subunidades -L1-, -L2- y -L3- y puede estar formado por las subunidades solas o por combinaciones de los mismos. Por lo tanto, L puede representar -L1-L2-, -L2-, -L2-L3 o -L1-L2-L3. El orden preferido de conectividad en los casos anteriores con A y CH es el siguiente: A-L1-L2-CH-, A-L2-CH-, A-L2-L3-CH- o A-L1-L2-L3 CH-. Sin embargo, también es posible que los diferentes fragmentos tales como -L1-L2-,

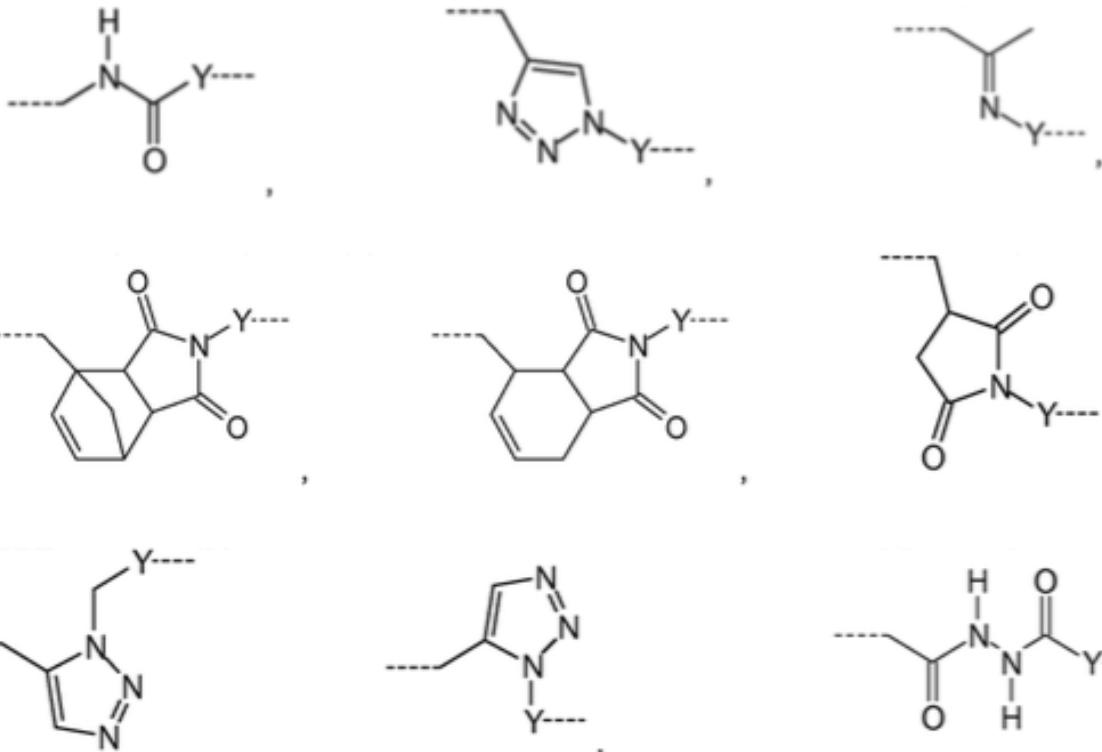
-L2-, -L2-L3, -L3-L2-L3, -L2-L3-L2- o -L1-L2-L3 - se alinean en todos los órdenes posibles, siempre y cuando la conexión entre las diferentes partes es químicamente razonable y posible.

El enlazador L puede estar unido al resto de hidratos de carbono de tal manera que este enlace puede escindirse en la celda, por ejemplo, una célula colaboradora B, una célula colaboradora T, con el fin de liberar el fragmento A-L por 5 un lado, y el fragmento -CH-CA por el otro lado.

[0052] L puede incluir la funcionalidad o un fragmento de la funcionalidad derivada de la activación de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno carbohidrato. L está unido covalentemente preferiblemente a cualquier heteroátomo (N, O, S) de los monómeros de hidratos de carbono del antígeno carbohidrato A. L1, si está 10 presente, se une covalentemente a la subunidad enlazadora L2 preferiblemente a través del resto Y, que también podría ser un enlace químico . L1 se selecciona preferiblemente de los siguientes residuos:







x es un número entero de 1 a 60;

Y representa un enlace, -NH-, -O-, -S-, -S-S-;

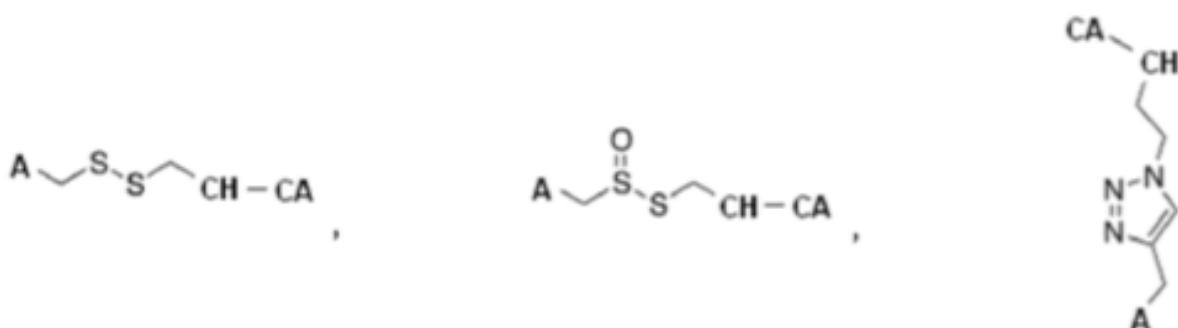
5 L2 representa -CH₂-, -C₂H₄-, -C₃H₆-, -C₄H₈-, -C₅H₁₀-, -C₆H₁₂-, -C₇H₁₄-, -C₈H₁₆-, -C₉H₁₈-, -C₁₀H₂₀-, -CH(CH₃)-, -C[(CH₃)₂]-, -CH₂-CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂-, -CH(CH₃)-C₂H₄-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, -C₂H₄-CH(CH₃)-, -CH₂-C[(CH₃)₂]-, -C[(CH₃)₂]-CH₂-, -CH(CH₃)-CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -C[(C₂H₅)(CH₃)]-, -CH(C₃H₇)-, -(CH₂-CH₂-O)n-CH₂-CH₂-, -CO-CH₂-, -CO-C₂H₄-, -CO-C₃H₆-, -CO-C₄H₈-, -CO-C₅H₁₀-, -CO-C₆H₁₂-, -CO-C₇H₁₄-, -CO-C₈H₁₆-, -CO-C₉H₁₈-, -CO-C₁₀H₂₀-, -CO-CH(CH₃)-, -CO-C[(CH₃)₂]-, -CO-CH₂-CH(CH₃)-, -CO-CH(CH₃)-CH₂-, -CO-C₂H₄-CH(CH₃)-, -CO-CH₂-C[(CH₃)₂]-, -CO-C[(CH₃)₂]-CH₂-, -CO-CH(CH₃)-CH(CH₃)-, -CO-C[(C₂H₅)(CH₃)]-, -CO-CH(C₃H₇)-, -CO-(CH₂-CH₂-O)n-CH₂-CH₂-.

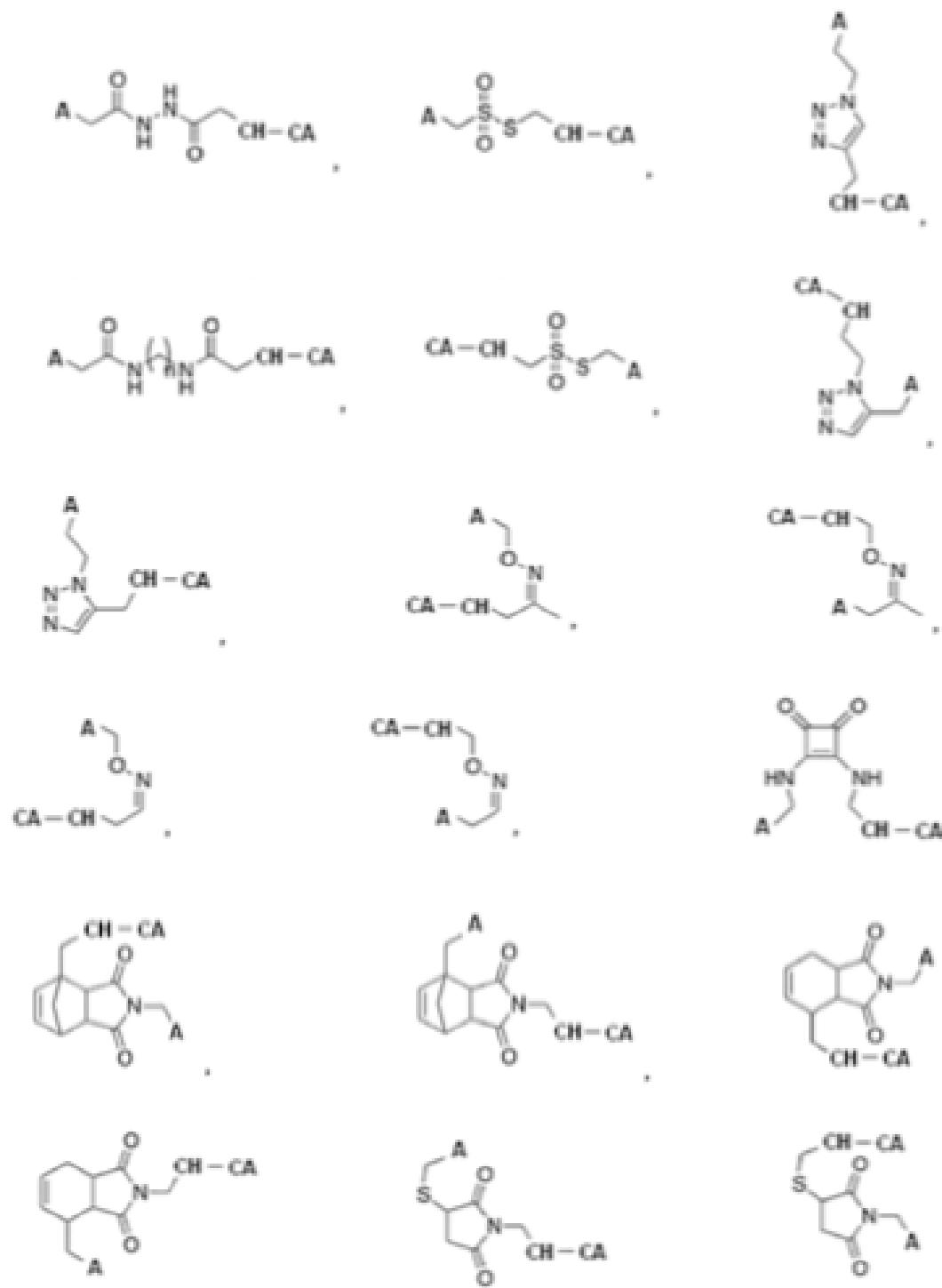
10 L2 es en caso L3 no está presente preferentemente ligado a un átomo de oxígeno de un antiguo grupo hidroxilo del CH residuos de carbohidratos.

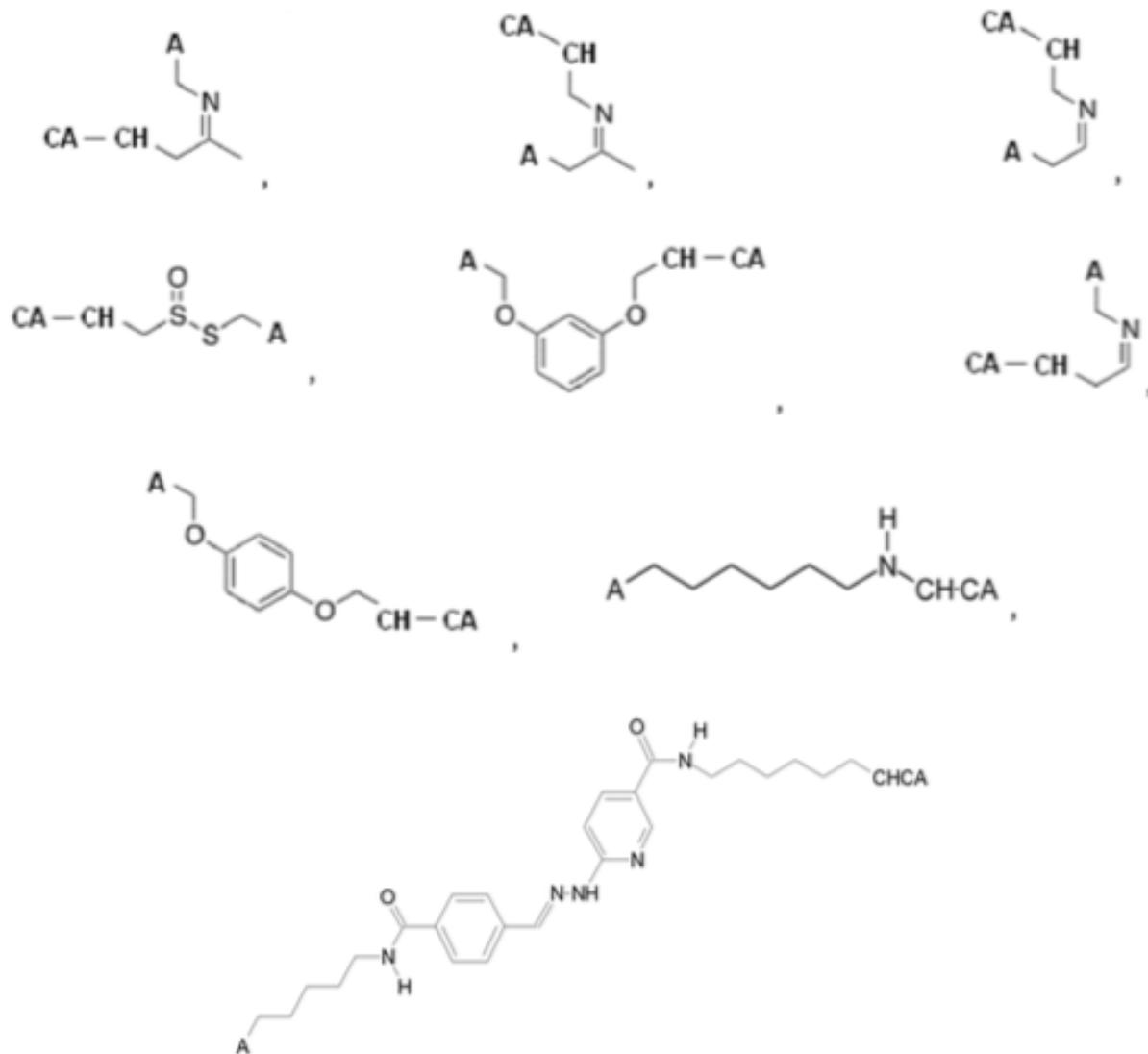
n representa un número entero de 1 a 60;

15 L3 representa -CO-, -O-CO-, -NH-CO-, -NH(C = NH)-, -SO₂-, -O-SO₂-, -NH-, -NH-CO-CH₂-. L3 si está presente es preferiblemente unido a un átomo de oxígeno de un antiguo grupo hidroxilo del residuo carbohidrato CH.

20 [0053] Los ejemplos preferidos de restos de enlazador L de la fracción de AL-CH-CA como al menos un representante de todos los restos en los compuestos de la fórmula general (I) como se define en el presente documento son







definiéndose n como se ha hecho en el presente documento, y A, CH y CA representan un antígeno, un resto de carbohidrato y un Ceramida como se define aquí.

5 [0054] La molécula enlazadora L puede ser opcionalmente sustituida además con 1 a 3 de los sustituyentes Z6, Z7, Z8. Sin embargo, es evidente para una persona experimentada que el término "puede ser sustituida" se refiere a la sustitución de un átomo de hidrógeno por uno de los sustituyentes Z6, Z7, Z8.

10 [0055] Los sustituyentes Z6, Z7 y Z8 representan independientemente el uno del otro -OH, -OCH3, -OC2H5, -OC3H7, -O-ciclo- C3H5, -OCH (CH3) 2, -OC (CH3) 3, -OC4H9 , -OPh, -OCH2-Ph, -OCPPh3, -CH2-OCH3, -C2H4- OCH3, -C3H6-OCH3, -CH2-OC2H5, -C2H4-OC2H5, -C3H6-OC2H5, -CH2-OC3H7, -C2H4- OC3H7, -C3H6-OC3H7, -CH2-O-ciclo-C3H5, -C2H4-O- ciclo-C3H5, -C3H6-O-ciclo-C3H5, -CH2-OCH (CH3) 2, -C2H4-OCH (CH3) 2, -C3H6- OCH (CH3) 2, -CH2-OC (CH3) 3, -C2H4-OC (CH3) 3, -C3H6-OC (CH3) 3, -CH2-OC4H9, -C2H4-OC4H9, -C3H6- OC4H9, -CH2-OPh, -C2H4-OPh, -C3H6-OPh, -CH2-OCH2-Ph, -C2H4-OCH2-Ph, -C3H6-OCH2-Ph, -NO2, -F, -Cl, -Br , -COCH3, -COC2H5, -COC3H7, -CO-ciclo-C3H5, -COCH (CH3) 2, COC (CH3) 3, -COOH, -COOCH3, -COOC2H5, -COOC3H7, -COO-ciclo-C3H5, -COOCH (CH3) 2, -COOC (CH3) 3, OOC-CH3, - OOC-C2H5, C3H7- OOC, OOC-ciclo-C3H5, OOC-CH (CH3) 2, OOC-C (CH3) 3, -CONH2, -CONHCH3, -CONHC2H5, -CONHC3H7, -CONH-ciclo-C3H5, -CONH [CH (CH3) 2], -CONH [C (CH3) 3], -CON (CH3) 2, -CON (C2H5) 2, -CON (C3H7) 2, -CON (ciclo-C3H5) 2, -CON [CH (CH3) 2] 2, -CON [C (CH3) 3] 2, -NHC0CH3, -NHCOC2H5 , -NHCOC3H7, -NHCO- ciclo-C3H5, -NHCO-CH (CH3) 2, -NHCO-C (CH3) 3, -NH2, -NHC3H3, -NHC2H5, -NHC3H7, -NH-ciclo- C3H5, -NHCH (CH3) 2, -NHC (CH3) 3, -N (CH3) 2, -N (C2H5) 2, -N (C3H7) 2, -N (ciclo-C3H5) 2, -N [CH (CH3) 2] 2, -N [C (CH3) 3] 2, -OCF3, -CH2-OCF3, -C2H4-OCF3, -C3H6-OCF3, -OC2F5, -CH2-OC2F5, -C2H4-OC2F5, -C3H6-OC2F5, -CH2F, -CHF2, -CF3, -CH2Cl, -CH2Br, -CH2-CH2F, -CH2-CHF2, -CH2-CF3, -CH2-CH2Cl, -CH2-CH2Br.

15

20

25 El resto de carbohidrato CH

25 El resto de carbohidrato CH

[0056] El CH representa un monosacárido, un disacárido o un trisacárido, en el que los monómeros de hidratos de carbono de los mismos pertenecen preferentemente a hexosas, pentosas, tetrosas. En el caso de CH representa un monosacárido, el monómero de hidratos de carbono es idéntica a la monosacárido. El disacárido contiene dos monómeros de hidratos de carbono y al trisacárido contiene tres monómeros de hidratos de carbono. En el disacárido y trisacárido los monómeros de hidrato de carbono están conectados entre sí a través de enlaces α/β glicosídicos que pertenecen preferentemente al grupo que consiste en 1,2; 1,3; 1,4; 15; 16; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; o 2,6 enlaces glucosídicos.

5 El CH monosacárido, disacárido y trisacárido están unidos covalentemente a L y también a CA a través de un heteroátomo (N, O, S) de la fracción de CH y lo más preferiblemente a través de un átomo de oxígeno de un antiguo grupo hidroxilo de CH.

10 Tal como se utiliza aquí, el término "grupo hidroxilo anterior" significa que el átomo de oxígeno de un monómero de hidratos de carbono que actualmente está vinculado a L o CA era el átomo de oxígeno de un grupo hidroxilo y unido a un átomo de hidrógeno que ahora se sustituye por el residuo L o CA.

15 **[0057]** En una realización preferida de esta invención, el monosacárido, disacárido o el trisacárido el CH está obligado covalentemente por un átomo de oxígeno a L y a través de otro átomo de oxígeno para CA.

En otra realización preferida de esta invención, el monosacárido, disacárido o el CH el trisacárido se une covalentemente por un hidroxilo átomo de oxígeno a L y a través de otro átomo de oxígeno hidroxilo para CA.

20 En otra realización preferida de esta invención, L o CA está obligado a CH, es decir, a la monosacárido, disacárido o el trisacárido, por un enlace glucosídico en C1 del sacárido.

[0058] En una realización más preferida de esta invención, L está unido por un enlace glucosídico a C1 del monosacárido, disacárido o trisacárido y CA está obligado por el oxígeno a C6 de un hexosa o por el oxígeno en C5 de un pentosa o por el oxígeno a C4 de un tetrosa.

25 En otra forma de realización más preferida de esta invención, CA está obligado por un enlace glucosídico a C1 del monosacárido, disacárido o trisacárido y L está obligado por el oxígeno a C6 de un hexosa o por el oxígeno en C5 de una pentosa o el oxígeno a C4 de una tetrosa.

En una realización preferida de la invención, el monosacárido, disacárido o el trisacárido CH consta de uno, dos o respectivamente 3 hidratos de carbono seleccionados del siguiente grupo que comprende o que consiste en los

30 siguientes α - y β -D / L-hidratos de carbono:

α -D-ribopyranose, α -D-arabinopiranosa, α -D-xilopiranosa, α -D-lyxopyranose, α -D-allopyranose, ose α -D-altropyran-, α -D-glucopiranosa, α -D-mannpyranose, α -D-glucopiranosa, α -D-idopyranose, α -D-galactopiranosa, talopiranosa α -D-, α -D-psicopyranose, α -D-fructopiranosa, α -D-sorbopiranosa, α -D-tagatopyranose, α -D-ribofuranose, ose, α -D-arabinofuranosa, α -D-xilofuranosa, α -D-lyxofuranose, α -D-Allofuranose, α -D-Altrofuranose, α -D-glucofuranosa, α -D-35 manofuranosa, α -D-gulofuranose, α -D-idofuranose, α -D-galactofuranosa, α -D-talofuranose, psicofuranose α -D-, α -D-fructofuranosa, α -D-sorbofuranosa, α -D-tagatofuranose, α -D-ribulofuranose, ose, α -D-threofuranose, α -D-erythrocyanose, α -D-glucosamina, D- α -ácido glucopiranurónico, α -D-ramnopiranosa, β -D-ribopyranose, β -D-arabinopiranosa, β -D-xilopiranosa, β -D-lyxopyranose, β -D-allopyranose, β -D-altropyranose, β -D-glucopiranosa, β -D-mannpyranose, β -D-glucopiranosa, β -D-idopyranose, β -D-galactopiranosa, β -D-talofuranose, β -D-psicopyranose, β -D-fructopiranosa, β -D-sorbopiranosa, β -D-tagatopyranose, β -D-ribofuranose, β -D-40 arabinofuranosa, β -D-xilofuranosa, β -D-lyxofuranose, β -D-allofuranose, β -D-Altrofuranose, β -D-glucofuranosa, β -D-manofuranosa, β -D-gulofuranose, β -D-idofuranose, β -D-galactofuranose, β -D-talofuranose, β -D-psicofuranose, β -D-fructofuranose, β -D-sorbofuranose, β -D-tagatofuranose, β -D-ribulofuranose, β -D-threofuranose, β -D-erythrocyanose, β -D-ramnopiranosa, β -D-glucosamina, α -D-ácido glucopiranurónico, α -L-Ribopyranose, α -L-arabinopiranosa, α -L-xilopiranosa, α -L-lyxopyranose, α -L-allopyranose, α -L-altropyranose, α -L-glucopiranosa, α -L-mannpyranose, α -L-glucopiranosa, α -L-idopyranose, α -L-galactopiranosa, α -L-talofuranose, α -L-psicopyranose, α -L-fructopiranosa, α -L-sorbopiranosa, α -L-tagatopyranose, α -L-ribofuranose, α -L-50 arabinofuranose, α -L-xilofuranose, α -L-lyxofuranose, α -L-Allofuranose, α -L-Altrofuranose, α -L-glucofuranosa, α -L-manofuranosa, α -L-gulofuranose, α -L-idofuranose, α -L-galactofuranose, α -L-talofuranose, α -L-psicofuranose, α -L-fructofuranose, α -L-sorbofuranose, α -L-tagatofuranose, α -L-ribulofuranose, α -L-rhamnopyranose α -L-threofuranose, α -L-erythrocyanose, α -L-glucosamina, α -L-glucopiranurónico ácido, β -L-ribopyranose, β -L-arabinopiranosa, β -L-xilopiranosa, β -L-lyxopyranose, β -L-allopyranose, β -L-altropyranose, β -L-glucopyranose, β -L-mannpyranose, β -L-glucopiranosa, β -L-idopyranose, β -L-galactopiranosa, β -L-talopiranosa, β -L-55 PS-icopyranose, β -L-fructopiranosa, β -L-sorbopiranosa, β -L-tagatopyranose, β -L-ribofuranose, β -L-arabinofuranosa, β -L-xilofuranose, β -L-lyxofuranose, β -L-allofuranose, β -L-Altrofuranose, β -L-glucofuranosa, β -L-gulofuranose, β -L-idofuranose, β -L-galactofuranose, β -L-talofuranose, β -L-psicofuranose, β -L-fructofuranose, β -L-sorbofuranosa, β -L-tagatofuranose, β -L-xylulofuranose, β -L-ribulofuranose, β -L-threofuranose, β -L-erythrocyanose, β -L-glucosamina, β -L-glucopiranurónico ácido, y β -L-ramnopiranosa.

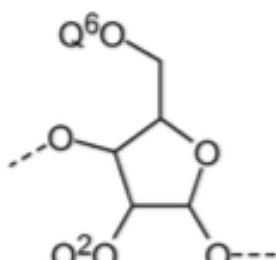
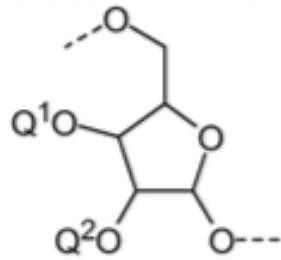
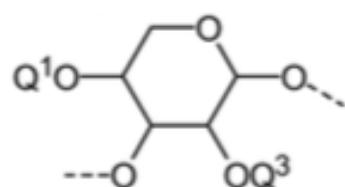
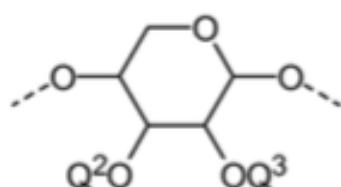
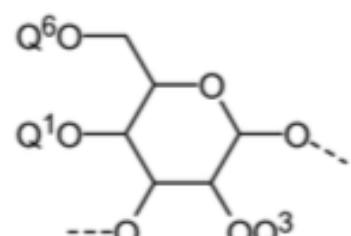
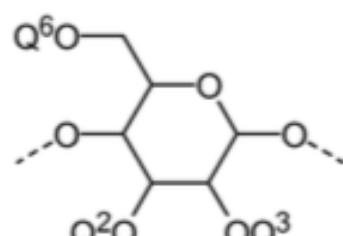
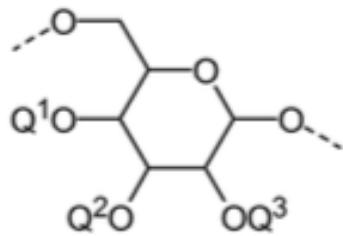
60 **[0059]** En otra realización preferida de la invención, el CH monosacárido, disacárido o el trisacárido consta de uno, dos o respectivamente 3 hidratos de carbono seleccionados del α - y β -D / L-hidratos de carbono como se ha mencionado en las páginas 25 - 29 y como se define para el resto A.

65 **[0060]** El CH monosacárido, disacárido o trisacárido, de acuerdo con la presente invención, pueden además estar sustituidos en posiciones específicas, de preferencia a grupos hidroxilos que no participan en la unión a los restos A y L, o en un grupo amino si está presente en el resto sacárido. En una realización preferida de la presente invención,

el CH monosacárido, disacárido o trisacárido llevan uno de los siguientes sustituyentes, preferiblemente en lugar de un átomo de hidrógeno en un grupo hidroxilo uno de los siguientes sustituyentes:

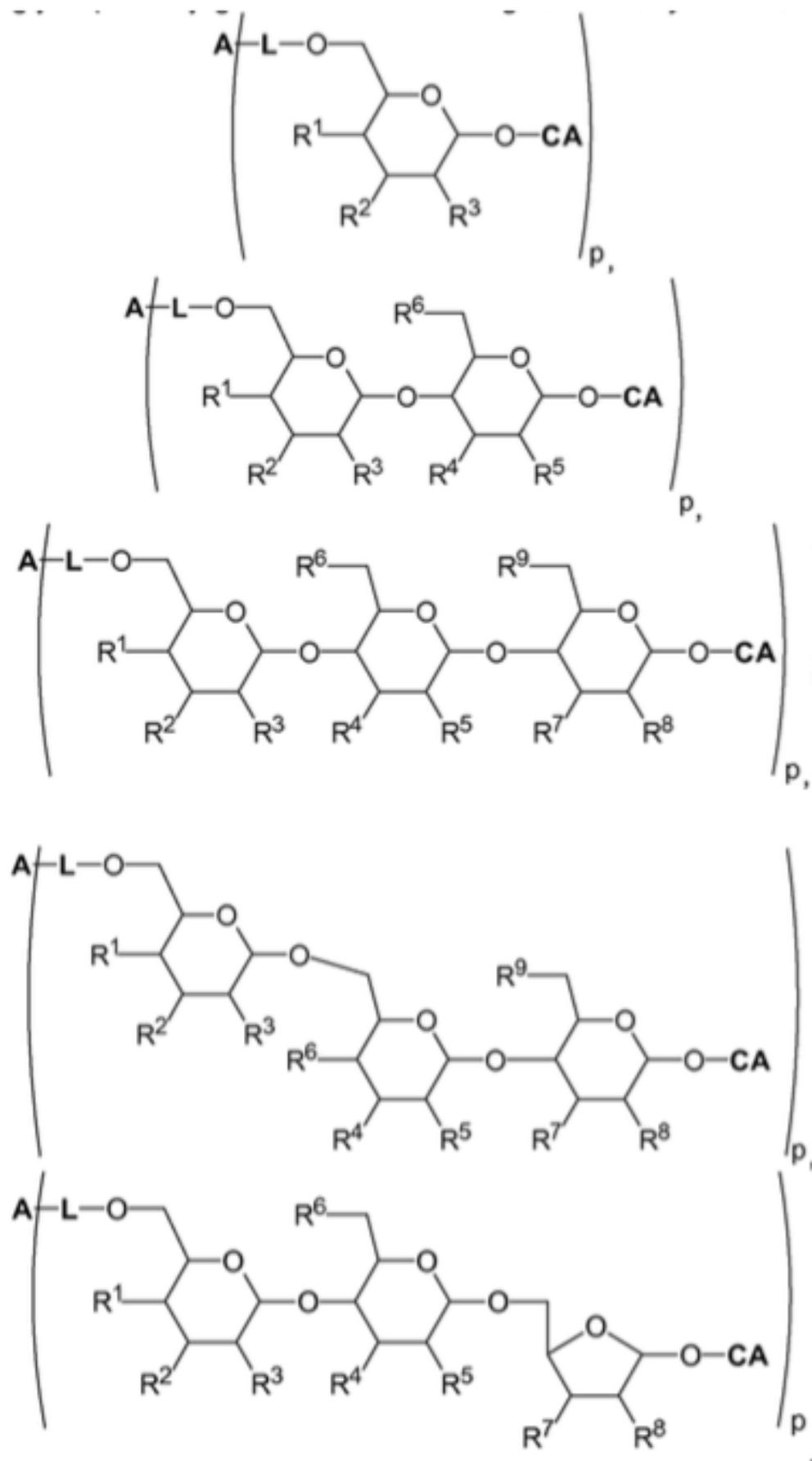
5 -CH3, -C2H5, -C3H7, -ciclo-C3H5, -CH (CH3) 2, -C (CH3) 3, -C4H9, Ph, -CH2-Ph, -CH2-OCH3, -C2H4-OCH3, -C3H6-OCH3, -CH2-OC2H5, -C2H4-OC2H5, -C3H6-OC2H5, -CH2-OC3H7, -C2H4-OC3H7, -C3H6-OC3H7, -CH2-O-
clo clo-C3H5, -C2H4-O- ciclo-C3H5, -C3H6-O-ciclo-C3H5, -CH2-OCH (CH3) 2, -C2H4-OCH (CH3) 2, -C3H6-OCH (CH3) 2, -CH2-OC (CH3) 3, - C2H4-OC (CH3) 3, -C3H6-OC (CH3) 3, -CH2-OC4H9, -C2H4-OC4H9, -C3H6-OC4H9, -CH2-OPh, -C2H4-OPh, -C3H6-OPh, -CH2- OCH2-Ph, -C2H4-OCH2-Ph, -C3H6-OCH2-Ph.

10 [0061] α - y β -D / L-hidratos de carbono preferidos para el resto CH con conectividad indicada por las líneas punteadas son los residuos siguientes:



[0062] Los sustituyentes Q1, Q2, Q3 y Q6 tienen los significados que se definen aquí.

15 [0063] En otras realizaciones preferidas de la invención, el resto CH de los conjugados de carbohidratos glicolípidos inventivos tiene la siguiente conectividad:

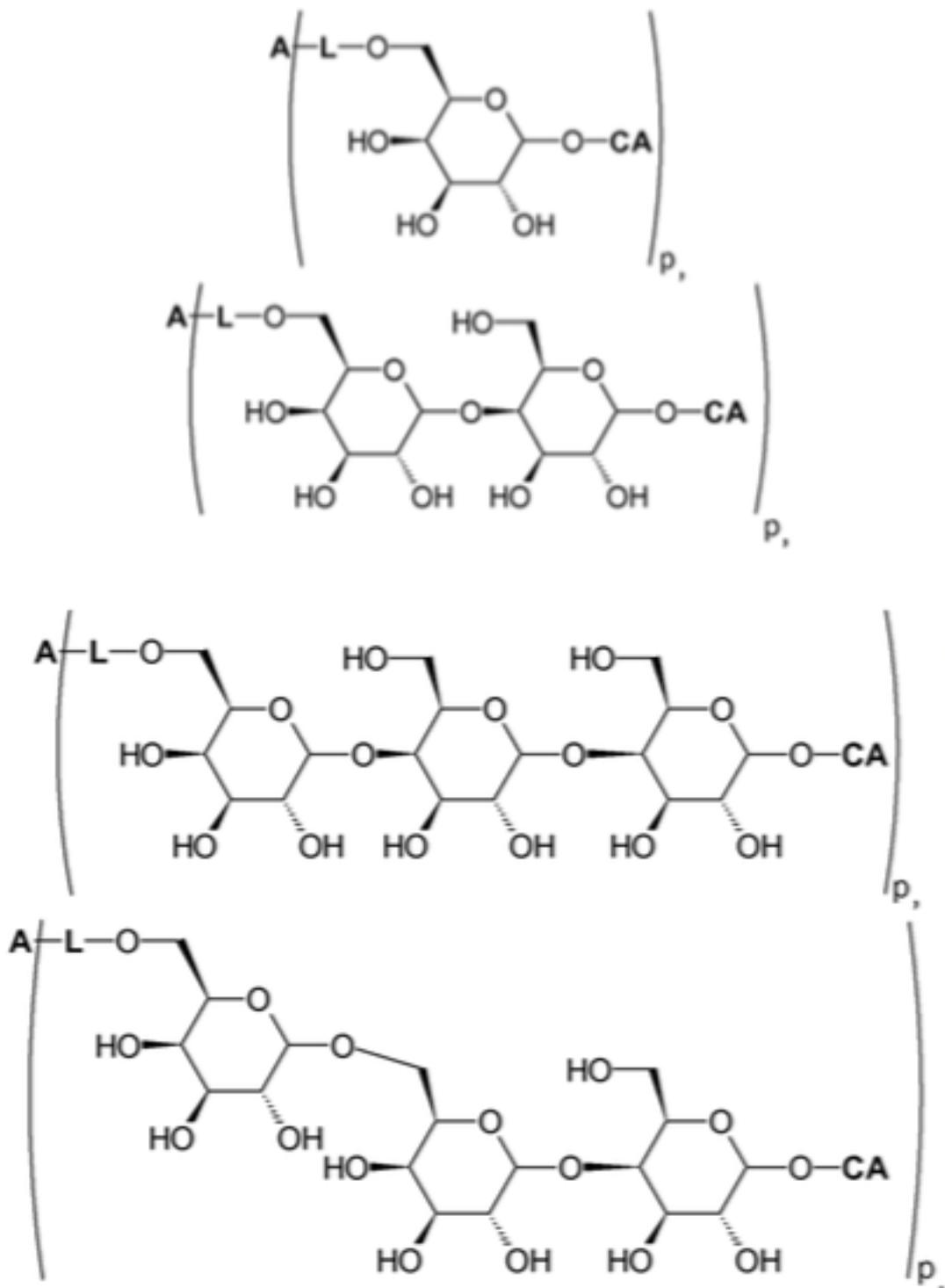


definiéndose el A, L, P y CA como se divulga aquí.

[0064] R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 representan independientemente el uno del otro:
 -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-SO₂-CH₃, -O-SO₂-C₂H₅, -O-SO₂-C₃H₇, -O-COOCH₃, -NHCOCH₃, o -NH₂.

5

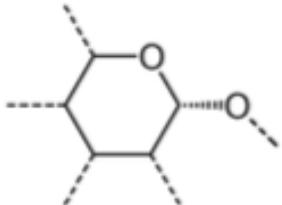
[0065] En realizaciones más preferidas de la invención, la fracción de CH de los conjugados en hidratos de carbono glicolípido de la invención tiene la siguiente conectividad como se muestra en la siguiente fórmula preferida:



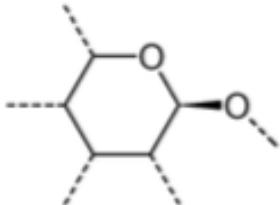
10 definiéndose el A, L, P y CA como se divulga aquí.

[0066] Los enlaces glucosídicos dentro del CH pertenecen preferentemente al grupo de los enlaces glicosídicos en el que la función hidroxilo del carbono anomérico se condensa con otra función de hidroxilo de otro carbohidrato o de la fracción del CA respectivamente. El enlace glicosídico entre dos hidratos de carbono comprende el enlace glicosídico entre el carbono anomérico de un hidrato de carbono y el carbono no anomérico del otro carbohidrato.

5 Debido a la estereoquímica del carbono anomérico existe la posibilidad de formar enlaces glicosídicos α or β como:



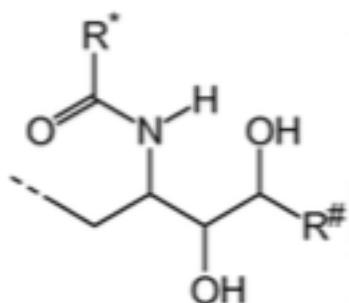
Enlace α -glicosídico



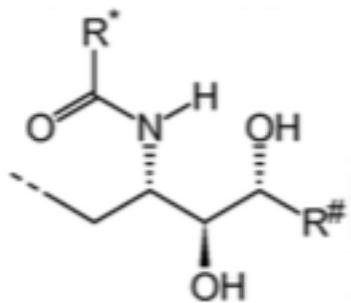
Enlace β -glicosídico

10 **[0067]** Las letras griegas α y β son aplicables sólo cuando el átomo de carbono anomérico tiene un localizador más bajo que el átomo de referencia anomérico. Si esto no es el caso, entonces la configuración anomérica se describe por símbolos normales R / S.

15 **[0068]** El resto CA de ceramida
El CA representa



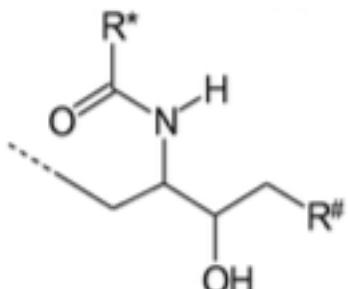
y más preferiblemente



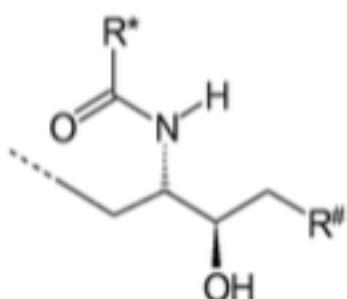
20 El CA representa

25

30

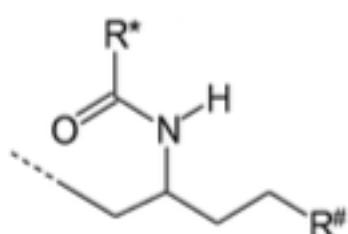


5 y más preferiblemente

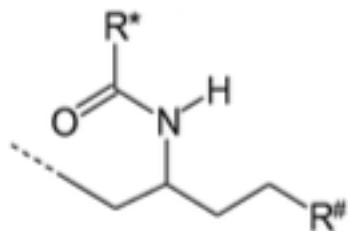


O

El CA representa



10 y más preferiblemente



15 [0069] R * y R # representan independientemente el uno del otro un residuo de carbono lineal o ramificado o cíclico, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado que consta de 1 a 30 átomos de carbono y hasta 5 heteroátomos seleccionados entre N, O, S, F, Br y Cl.

[0070] Por lo tanto, R * y R # representan independientemente el uno del otro un residuo de carbono de 1 - 30 átomos de carbono, en el que el residuo de carbono puede ser una cadena de carbono lineal o una cadena de carbono ramificada. El residuo de carbono también puede contener estructuras carbocíclico o estructuras heterocíclicas. El residuo de carbono puede contener además heteroátomos tales como N, O, S y / o puede tener grupos funcionales tales como halógeno como F, Cl y Br o grupos funcionales que contienen los heteroátomos N, O, y / o S o grupos funcionales tales como enlaces dobles y triples.

El residuo de carbono o de la cadena de carbono pueden contener uno o más C = C enlaces dobles y / o uno o más C = C enlaces triples. Las estructuras carbocíclicos que puedan estar presentes en el residuo de carbono o de la cadena de carbono son, por ejemplo, saturado de 3 miembros o 4 miembros anillos carbocíclicos, saturado o insaturado de 5 miembros anillos carbocíclicos o saturados, insaturados o aromáticos anillos carbocíclicos de 6 miembros que pueden estar presentes como sustituyentes en la cadena de residuos de carbón o de carbón o se pueden incorporar en el residuo de carbono o de la cadena de carbono.

Las estructuras heterocíclicos que pueden estar presentes en el residuo de carbono o de la cadena de carbono son, por ejemplo, saturado de 3 miembros o anillos heterocíclico de 4 miembros que contiene un N u O átomo, saturado o anillos heterocíclicos de 5 miembros insaturados que contienen 1, 2, 3 o 4 átomos de N o 1 o 2 S o átomos de O o 1 O o S átomo junto con 1 o 2 átomos de N o saturado, insaturado o aromático de 6 miembros anillos heterocíclicos que contienen 1, 2, 3 o 4 átomos de N o 1 o 2 S o átomos de O o 1 átomo de O o S, junto con 1 o 2 átomos de N que pueden estar presentes como sustituyentes en la cadena de residuos de carbón o de carbón o se pueden incorporar en el residuo de carbono o de cadena de carbono.

[0071] El término "residuo de carbono de 1 a 30 átomos de carbono" se refiere a un átomo de carbono o una cadena de 2 a 30 átomos de carbono que puede ser alineado rectamente (lineal) por un enlace químico adecuado o dispuestos en un orden tal que desde 1 átomo de carbono de dos o tres átomos de carbono individuales están obligados (ramificado), y opcionalmente proceder en diferentes direcciones desde el átomo de carbono de ramificación. Además, la disposición de los átomos de carbono puede formar también una forma de anillo (cíclico). Además, cualquiera de los arreglos de los átomos de carbono que forman un residuo de carbono antes mencionado puede incluir uno o más enlaces dobles o triples (insaturado). En el caso de la cadena de átomos de carbono no incluye ningún enlace doble o triple el residuo de carbono se considera saturado. Opcionalmente, el "residuo de carbono de 1 a 30 átomos de carbono" puede ser sustituido adicionalmente con 1 a 5 de los sustituyentes Z1, Z2, Z3, Z4, Z5. Sin embargo, es claro para una persona experimentada que el término "puede ser sustituido" se refiere a la sustitución de un átomo de hidrógeno por uno de los sustituyentes Z1, Z2, Z3, Z4, Z5 cada uno. En caso de que el residuo de carbono de 1 a 30 átomos de carbono no contiene ninguno de los sustituyentes adicionales Z1, Z2, Z3, Z4, Z5 el residuo se considera como no sustituido.

[0072] Más preferiblemente, R * y R # representan independientemente el uno del otro residuo de alquilo lineal o ramificado -C1-C30, residuo de alquenilo C2-C30, residuo de alquinilo C2-C30, residuo de carbocicloalquilo lineal o ramificado C3-C10, , residuo alquilcicloalquilo C4-C30, residuo de alquilheterocicloalquilo C4-C30, o un residuo de alquilo de carbono C1-C30 sustituido que contiene 1 a 5 de los sustituyentes Z1, Z2, Z3, Z4, Z5.

[0073] Los sustituyentes Z1, Z2, Z3, Z4, Z5 representan independientemente el uno del otro -OH, -OCH3, -OC2H5, -OC3H7, -O-ciclo-C3H5, -OCH (CH3) 2, -OC (CH3) 3, -OC4H9, -OPh, -OCH2-Ph, -OCPH3, -CH2-OCH3, -C2H4-OCH3, -C3H6-OCH3, -CH2-OC2H5, -C2H4-OC2H5, -C3H6-OC2H5, -CH2- OC3H7, -C2H4-OC3H7, -C3H6-OC3H7, -CH2-O-ciclo-C3H5, -C2H4-O- ciclo-C3H5, -C3H6-O-ciclo-C3H5, -CH2-OCH (CH3) 2, -C2H4 -OCH (CH3) 2, -C3H6-OCH (CH3) 2, -CH2-OC (CH3) 3, -C2H4-OC (CH3) 3, -C3H6-OC (CH3) 3, -CH2-OC4H9, -C2H4-OC4H9, -C3H6-OC4H9, -CH2-OPh, -C2H4-OPh, -C3H6-OPh, -CH2-OCH2-Ph, -C2H4-OCH2-Ph, -C3H6-OCH2-Ph, -NO2, -F, -Cl, -Br, -COCH3, -COC2H5, -COC3H7, -CO-ciclo-C3H5, -COCH (CH3) 2, COC (CH3) 3, -COOH, -COOCH3, -COOC2H5, -COOC3H7, -COO-ciclo-C3H5, -COOCH (CH3) 2, -COOC (CH3) 3, -OOC- CH3, C2H5-OOC, OOC-C3H73 OOC-ciclo-C3H5, OOC-CH (CH3) 2, OOC-C (CH3) 3, -CONH2, -CONHCH3, -CONHC2H5, -CONHC3H7, -CONH -ciclo-C3H5, -CONH [CH (CH3) 2], -CONH [C (CH3) 3], -CON (CH3) 2, -CON (C2H5) 2, -CON (C3H7) 2, -CON (ciclo -C3H5) 2, -CON [CH (CH3) 2] 2, -CON [C (CH3) 3] 2, -NHCOC2H5, -NHCOC3H7, -NHCO-ciclo-C3H5, -NHCO-CH (CH3) 2, -NHCO-C (CH3) 3, -NH2, -NHCH3, -NHC2H5, -NHC3H7, -NH-ciclo- C3H5, -NHCH (CH3) 2, -NHC (CH3) 3, -N (CH3) 2 , -N (C2H5) 2, -N (C3H7) 2, -N [ciclo-C3H5) 2, -N [CH (CH3) 2] 2, -N [C (CH3) 3] 2, -OCF3, -CH2-OCF3, -C2H4-OCF3, -C3H6-OCF3, -OC2F5, -CH2-OC2F5, -C2H4-OC2F5, -C3H6-OC2F5, -CH2F, -CHF2, -CF3, -CH2Cl, -CH2Br, -CH2- CH2F, -CH2-CHF2, -CH2-CF3, -CH2-CH2Cl, -CH2-CH2Br.

[0074] El término "lineal o resto alquilo C1-C30-ramificado" se refiere a un residuo que está vinculado a través de un átomo de carbono y que consiste en total de 1 a 30 átomos de carbono, incluyendo los átomos de carbono de las ramas. La misma definición se aplica en consecuencia a los términos " residuo de alquilo C20-C30 lineal", "residuo de alquilo C1-C10 lineal" y "residuo de alquilo C10-C19 lineal".

[0075] El término "lineal o C2-C30-alquenilo residuo ramificado" se refiere a un residuo que está vinculada a través de un átomo de carbono y que consiste en total de 2 a 30 átomos de carbono, incluyendo los átomos de carbono de las ramas y que tiene al menos uno, pero no más de 15 dobles enlaces. Una vez ramificada, la cadena de carbono más larga es la cadena principal, mientras que las cadenas laterales son las ramas. 1 al 15 C = C enlaces dobles pueden estar presentes en la cadena principal y / o la cadena (s) lateral.

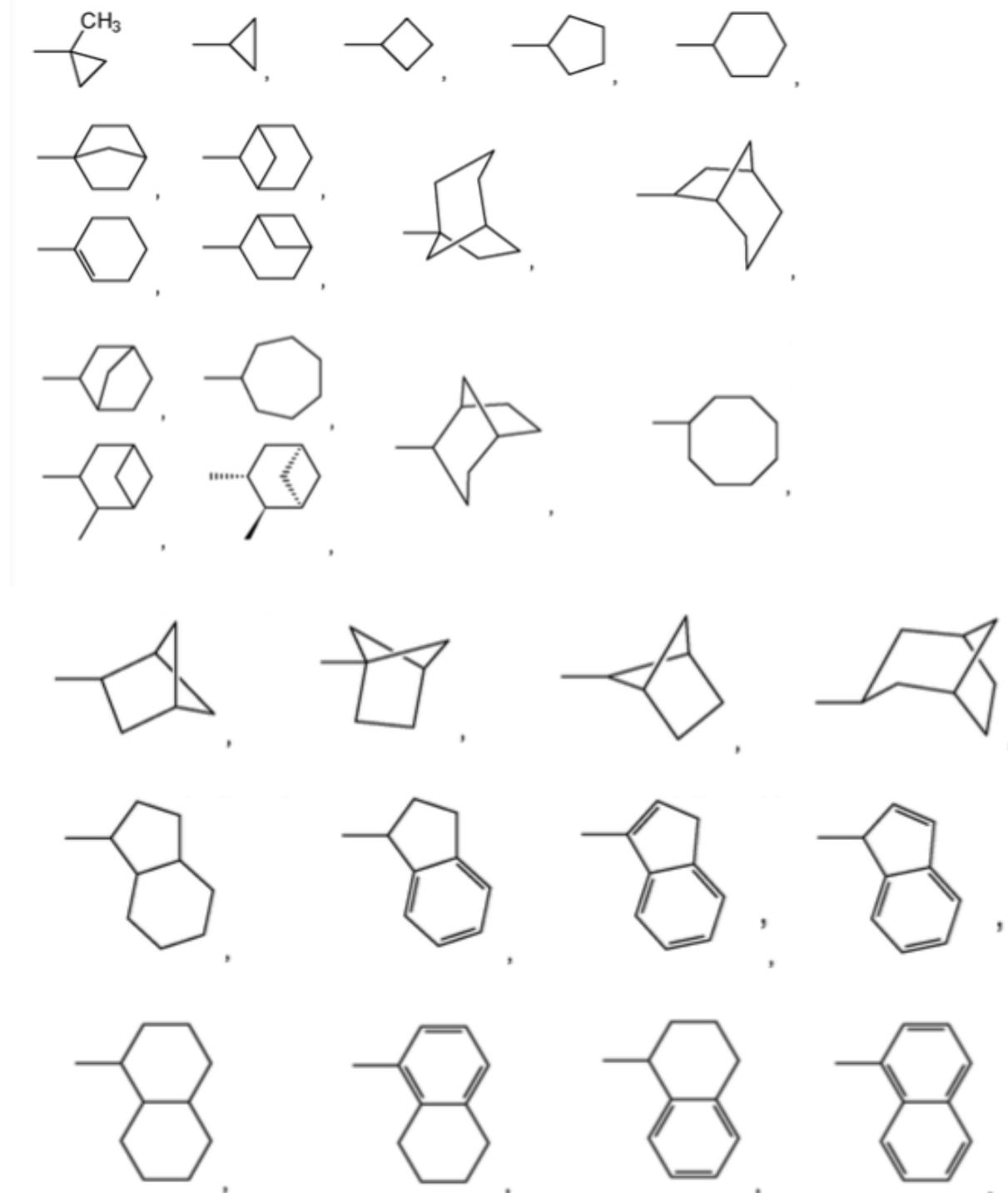
[0076] El término "residuo de alquinilo lineal o ramificado C2-C30" se refiere a un residuo que está vinculado a través de un átomo de carbono y que consiste en total de 2 a 30 átomos de carbono, incluyendo los átomos de carbono de las ramas y que tiene al menos uno, pero no más de 15 enlaces triples y preferiblemente 1, 2 o 3 triples enlaces. Una vez ramificada, la cadena de carbono más larga es la cadena principal, mientras que las cadenas

laterales son las ramas. 1 al 15 C = C enlaces triples puede estar presente en la cadena principal y / o la cadena (s) lateral.

5 [0077] El término "residuo de C3-C10-carbocicloalquilo" se refiere a un residuo que está vinculada a través de un átomo de carbono del anillo y contiene al menos un anillo carbocíclico y que consiste en total de 3 a 10 átomos de carbono, incluyendo los átomos de carbono de cualquier grupo alquilo, alquenilo o alquinilo sustituyente. El anillo carbocíclico en el residuo de C3-C10-carbocicloalquilo puede estar saturado, parcialmente insaturado o totalmente insaturado y puede ser aromático. Si el anillo carbocíclico es parte de un anillo bicíclico o está conectado a otro anillo, los dos anillos carbocíclicos pueden ser saturados o insaturados y pueden ser aromáticos o un anillo estar saturado y el segundo anillo parcial o totalmente insaturado.

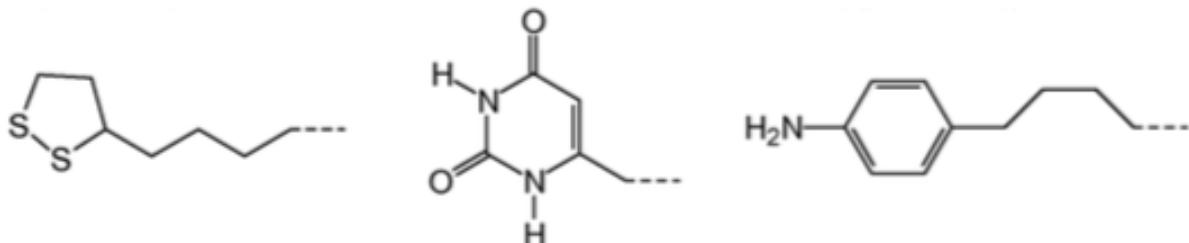
10

Ejemplos de residuos preferidos de carbocicloalquilo C3-C10 a los que también se conoce como sustituyentes M1 son los siguientes:

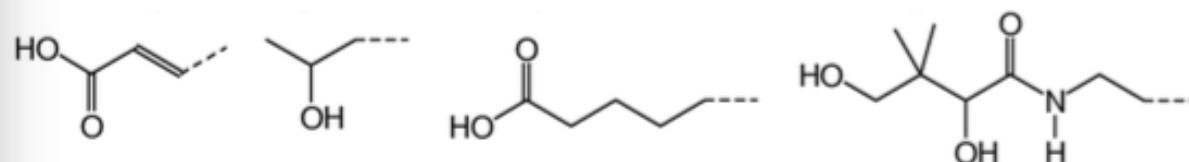


[0078] El término "alquilcicloalquilo C4-C30" se refiere a un residuo que está vinculada a través de un átomo de carbono no parte del anillo carbocíclico y contiene al menos un anillo carbocíclico y que consiste en total de 4 a 30 átomos de carbono incluyendo el carbono átomos de cualquier grupo alquilo, alquenilo o alquinilo sustituyente. El anillo carbocíclico en el residuo C4-C30-carbocicloalquilo puede estar saturado, parcialmente insaturado o totalmente insaturado y puede ser aromático. Si el anillo carbocíclico es parte de un anillo bicíclico o está conectado a otro anillo, los dos anillos carbocíclicos pueden estar saturados o insaturados y pueden ser aromáticos o un anillo estar saturado y el segundo anillo parcial o totalmente insaturado.

[0079] El término "residuo de C4-C30-alquilheterocicloalquilo" se refiere a un residuo que está vinculada a través de un átomo de carbono no forma parte del anillo heterocíclico y que contiene al menos un anillo heterocíclico y que consiste en total de 4 a 30 átomos de carbono incluyendo la átomos de carbono de cualquier grupo alquilo, alquenilo o alquinilo sustituyente. El anillo heterocíclico en el residuo heterocicloalquilo C4-C30-alquilo puede estar saturado, parcialmente insaturado o totalmente insaturado y puede ser aromático. 1 ó 2 átomos de oxígeno pueden estar unidos al anillo heterocíclico formando así uno o dos grupos carbonilo. Si el anillo heterocíclico forma parte de un anillo bicíclico o está conectado a otro anillo que puede ser un anillo carbocíclico o heterocíclico, ambos anillos pueden ser saturados o insaturados y pueden ser aromático o un anillo está saturado y el segundo anillo es parcial o totalmente insaturado y podría ser aromático. El anillo heterocíclico contiene 1 o 2 átomos de O, 1 o 2 átomos de S, 1, 2, 3, o 4 átomos de N, O 1 y 1 o 2 átomos de N o 1 S y 1 o 2 átomos de N. Ejemplos de tales residuos de C4-C30-alquilheterocicloalquilo son:



[0080] El término "residuo de carbono sustituido de C1-C30 que contiene 1 a 5 de los sustituyentes Z1, Z2, Z3, Z4, Z5" se refiere a un residuo que está vinculada a través de un átomo de carbono y que consiste en total de 1 a 30 átomos de carbono incluyendo los átomos de carbono de cualquier sustituyente tal como alquilo, alquenilo, alquinilo, Z1, Z2, Z3, Z4, y / o sustituyente de Z5. Los residuos llevan 1 a 5 de los sustituyentes Z1, Z2, Z3, Z4, Z5 y puede ser lineal o ramificado y saturado o insaturado. Por lo tanto, además de la al menos un sustituyente Z1, el residuo puede contener uno o más C = C enlaces dobles y / o uno o más C = C enlaces triples. Además el residuo C1-C30-carbono sustituido puede contener de 1 a 10 heteroátomos N, O, S en la cadena de carbono o unido a la cadena de carbono. Uno o más átomos de oxígeno pueden estar unidos a la cadena de carbono formando así uno o más grupos carbonilo. Si ramificada, la cadena más larga es la cadena principal, mientras que las cadenas laterales son las ramas. Las funcionalidades carbonilo, los dobles enlaces, los enlaces triples, así como los sustituyentes Z1, Z2, Z3, Z4, Z5 pueden estar presentes en o sobre la cadena principal y también en o sobre la cadena (s) lateral. Ejemplos de tales residuos de C1-C30-carbono sustituido son:



[0081] En una realización preferida de la invención, los residuos R * y R # representan independientemente el uno del otro:

-CH3, - (CH2) r-CH3, -CH (OH) - (CH2) s-CH3, -CH = CH-CH3, -CH = CH- (CH2) t-CH3, -CH (OH) - (CH2) v-CH (CH3) 2, -CH (OH) - (CH2) w-CH (CH3) -CH2-CH3, - (CH2) a-CH = CH- (CH2) b-CH3, - (CH2) c-CH = CH- (CH2) d-CH = CH- (CH2) e-CH3, - (CH2) f-CH = CH- (CH2) g-CH = CH- (CH2) h-CH = CH- (CH2) i-CH3, - (CH2) j-CH = CH- (CH2) k-CH = CH- (CH2) l-CH = CH- (CH2) o-CH = CH- (CH2) q-CH3,

donde a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, o, q son números enteros de 1 a 26 con la condición de que: (a + b) ≤ 27; (c + d + e) ≤ 25; (f + g + h + i) ≤ 23; (j + k + l + o + q) ≤ 21; y en el que r es un número entero de 1 a 29, s es un número entero de 1 a 28, t es un número entero de 1 a 27, v es un número entero de 1 a 26, y w es un número entero de 1 a 25 y, además, - (CH = CH-CH2) q-CH3, - (CH2-CH = CH) q-CH3, - (CH = CH) A-CH3,

donde q es un número entero de 1 a 9, A es un número entero de 1 a 14 y, además, - (CH = CH-CH2) B- (CH2) C-CH3, - (CH2-CH = CH) B- (CH2) C-CH3, - (CH = CH) D- (CH2) E-CH3, - (CH2) E- (CH = CH) D-CH3, - (CH2) F- (CH = CH) G- (CH2) H-CH3, - (CH2) J- (CH = CH-CH2) K- (CH2) n-CH3, - (CH2) p- (CH = CH) Q- (CH2) R- (CH = CH) S- (CH2) T-CH3, - (CH2) U- (CH = CH-CH2) V- (CH2) W- (CH = CH-CH2) X- (CH2) Y-CH2,

en la que B, C, D, E, F, G, H; I, J, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y y Z representan independientemente el uno del otro un número entero entre 1 y 26 con la condición de que el total número de átomos de carbono de los residuos antes mencionados no exceda del 30.

[0082] En otra realización preferida de la invención, los residuos R * y R # representan independientemente el uno del otro:

etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, dodecilo, tetradecilo, cis-9-tetradecenil, cis-9-cenylhexade-, cis-6-octadecenilo, cis-9-octadecenilo, cis- 11-octadecenilo, cis-9-eicosenilo, nyl cis-11-eicosenilo, cis-13-docose-, cis-15-tetracosenyl, trans-9-octadecenilo, trans-11-octadecenilo, trans-3-hexadecenilo, 9, 12-octadecadienilo, 6,9,12-octadecatrienilo, 8,11,14-eicosatrienyl, 5,8,11,14-eicosatetraenilo, 7,10,13,16-docosatetraenyl, 4,7,10,13,16-docosapentaenyl, 9,12,15-octadecatrienilo, 6,9,12,15-octadecatetraenyl, 8,11,14,17-eicosatetraenilo, 5,8,11,14,17-eicosapentaenyl, 7,10,13,16, 19-docosapentaenyl, 4,7,10,13,16,19-docosahexaenyl, 5,8,11-eicosatrienyl, 9c 11t 13t eleostearyl, 8t 12c 10t calendyl, 9c 11t 13c catalpyl, cis-9-tetradecenilo, cis-9-hexadecenilo, cis-6-octadecenilo, cis-9-octadecenilo, cis-11-octadecenilo, cis-9-eicosenilo, cis-11-eicosenilo, cis-13-docosenilo, cis-15-tetracosenyl, 9,12-octadecadienilo, 6,9,12-octadecatrienilo, 8,11,14-eicosatrienyl, 5,8,11,14-eicosatetraenilo, tetraenyl 7,10,13,16-docosa-, 4,7,10,13,16 docosapentaenyl, 9, 12,15-octadecatrienilo, 6,9,12,15-octadecatetraenyl, 8,11,14,17-eicosa- tetraenyl, 5,8,11,14,17-eicosapentaenyl, 7,10,13,16,19 -docosapentacnly, 4,7,10,13,16,19-docosahexaenyl, 5,8,11-eicosatrienyl, 1,2-ditiolano-3-pentanil, 6,8-ditiano octanilo, docosaheptadecanyl, eleostearyl, calendyl, gato- alpyl, taxoleyl, pinolenyl, sciadonyl, retinol, pentadecanilo 14-metilo, pristanyl, phytanyl, 11,12-methyleneoctadeca- nyl, 9,10 methylenehexadecanyl, 9,10 epoxystearyl, 9,10 epoxyoctadec-12-enil, 6 -octadecynyl, t11 inil-octadecen-9-, 9-octadecynyl, 6-octadecen-9-inil, t10-heptadecen-8-inil, 9-octadecen-12-inil, t7, t11-octadecadiene-9- inil, t8 , t10-octadecadiene-12-inil, 5,8,11,14-eicosatetraynyl, 2-hydroxytetracosanyl, 2-hidroxi-15-tetracosenyl, 12-hidroxi-9-octadecenilo o 14-hidroxi-11-eicosenilo, 4,7 , 9,11,13,16,19-docosaheptadecanyl, 6-octadecynyl, t11- octadecen-9-inil, isopalmityl, 9,10-methylenhexadecyl, coronaryl, (R, S) -lipoyl, 6,8-bis (metilsulfanil) -octanyl, 4,6- bis (metilsulfanil) -hexanyl, 2,4-bis (metilsulfanil) -butanyl, 1,2-ditiolanilo, cerebronyl, hydroxynervonyl, ricinyl, lesqueryl, brassyl, thapsyl, dodecilo, hexadecilo, octadecilo, eicosanilo, docosanil, tetracosanil, cis-9-tetradecenilo, cis-9-hexadecenilo, cis-6-octadecenilo, cis-9-octadecenilo, cis-11-octadecenilo, cis-9-eicosenilo, cis-11-eicosenilo, cis 13-docosenilo, cis-15-tetracosenyl, 9,12-octadecadienilo, 6,9,12-octadecatrienilo, 8,11,14-eicosatrienyl, 5,8,11,14- eicosatetraenyl, 9,12,15-octadecatrienilo, 6,9,12,15- octadecatetraenyl, 8,11,14,17-eicosatetraenilo, 5,8,11,14, 17-eicosapentaenyl, 7,10,13,16,19-docosapentaenyl, 4,7,10,13,16,19-docosahexaenyl, 5,8,11-eicosatrienyl, 1,2-ditiolano-3-pentanil, 6, octanilo 8-ditiano, docosahep- tadecanyl, eleostearyl, calendyl, catalpyl, taxoleyl, pinolenyl, sciadonyl, de retinilo, 14-metil pentadecanilo, pristanyl, phytanyl, 11,12-methyleneoctadecanyl, 9,10-methylenehexadecanyl, 9,10-epoxystearyl, 9,10-epoxyoctadec-12- enil, 6-octadecynyl, t11-octadecen-9-inil, 9-octadecynyl, 6-octadecen-9-inil, t10-heptadecen-8-inil, 9-octade-CEN-12-inil, t7, t11-octadecadiene-9-inil, t8, t10-octadecadiene-12-inil, 5,8,11,14-eicosatetraynyl, cosanyl 2-hydroxytetra-, 2-hidroxi-15-tetracosenyl, 12-hidroxi-9-octadecenilo, y 14-hidroxi-11-eicosenilo.

[0083] En otra realización preferida de la invención, los residuos R * y R # son sustituidos independientemente el uno del otro por un anillo de fenilo, preferiblemente un anillo de fenilo no sustituido. Además, se prefiere que dicho anillo fenilo esté posicionado en los residuos R * y R # en el extremo opuesto, donde los residuos R * y R # se enlacen con el resto de la fracción de CA.

[0084] Además, en una realización preferida de la presente invención, los residuos R * y R # son los mismos, preferiblemente un residuo alquilo lineal, y más preferiblemente un resto alquilo C10-C30 lineal, y más preferiblemente un linear-C14H29.

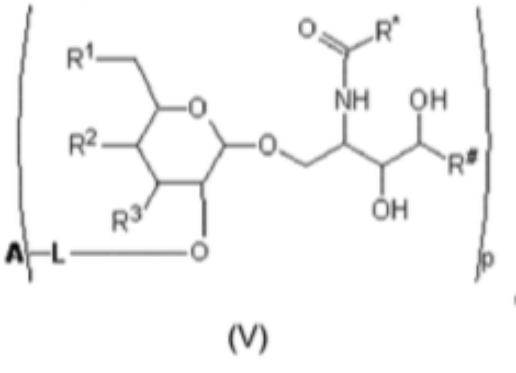
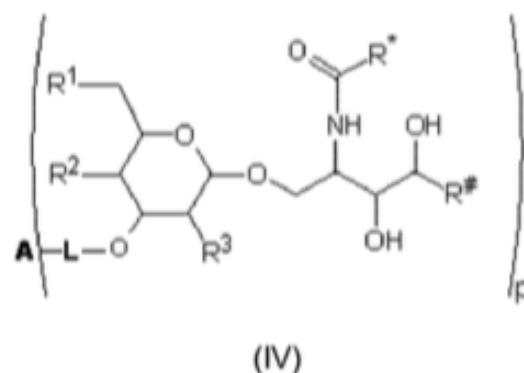
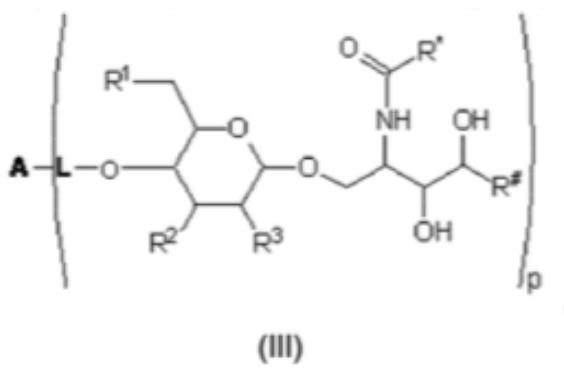
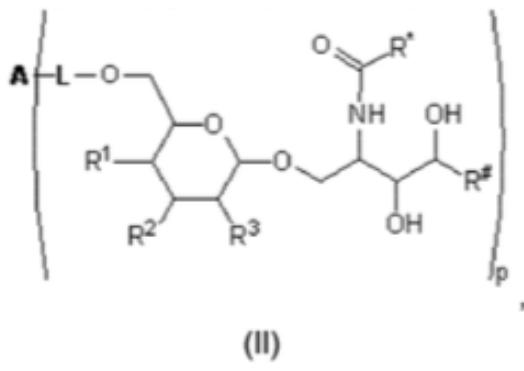
[0085] En otra realización preferida de la presente invención, los residuos R * y R # son diferentes entre sí y representan residuos diferentes de alquilo lineal, preferiblemente el residuo R * representa un residuo de alquilo de C20-C30 lineal y el residuo R # representa un residuo de alquilo C10-C19 lineal, y más preferiblemente R * representa un resto lineal -C25H51 y el residuo R # representa un residuo lineal -C14H29.

[0086] En otra realización preferida de la presente invención, los residuos R * y R # son diferentes entre sí y representan diferentes residuos de alquilo lineal, preferiblemente el residuo R * representa un resto de alquilo-C1-C10 lineal y el residuo R # representa un residuo de alquilo C10-C19 lineal, y más preferiblemente R * representa un resto -C4H9 lineal y el residuo R # representa un residuo lineal -C14H29.

[0087] Sin embargo, en otra realización preferida de la presente invención, los residuos R * y R # son diferentes entre sí y representan diferentes residuos de alquilo lineal, donde los residuos R * son adicionalmente sustituidos con un anillo de fenilo, preferiblemente el residuo R * representa un residuo alquilo C1-C10 lineal sustituido con fenilo y el residuo R # representa un resto alquilo C10-C19 lineal, y más preferiblemente R * representa un resto lineal -C6H12-Ph y el residuo R # representa un -C14H29 lineal residuo.

[0088] En otra realización preferida de la presente invención, los residuos R * y R # son diferentes entre sí y representan diferentes residuos alquilo lineal, preferiblemente el residuo R * representa un resto alquilo de C20-C30 lineal y el residuo R # representa un residuo alquilo C1-C10 lineal, y más preferiblemente R * representa un resto lineal -C25H51 y el residuo R # representa un residuo lineal -C5H11.

[0089] Se prefieren las siguientes fórmulas (II, III, IV y V) de la fórmula general (I):



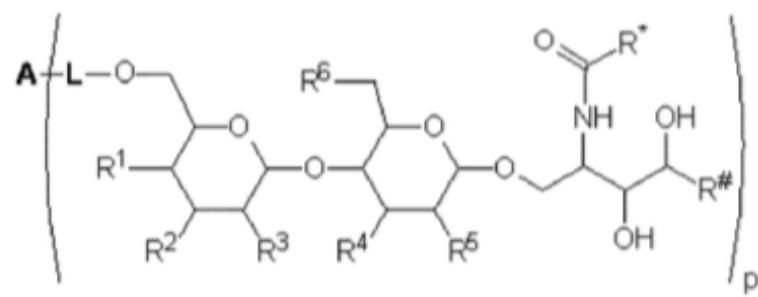
donde

A, L, R *, R # y p tienen los significados que se definen aquí.

R1, R2, R3 representan independientemente los unos de los otros:

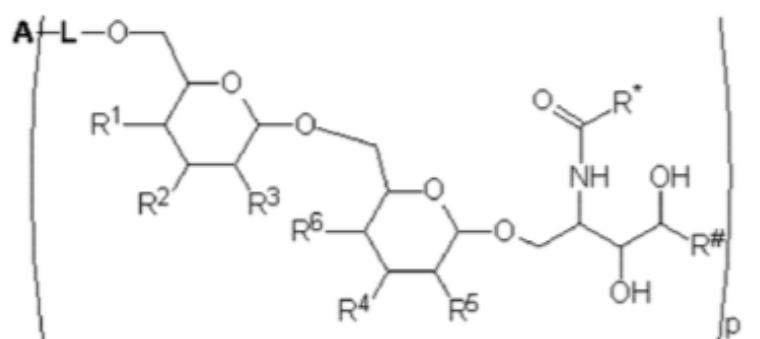
5 -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-SO₂-CH₃, -O-SO₂-C₂H₅, -O-SO₂-C₃H₇, -O-COOCH₃, -NHC(O)CH₃, -NH₂,

[0090] Por otra parte, las siguientes fórmulas (VI, VII, VIII, IX) de la fórmula general (I) se prefieren:

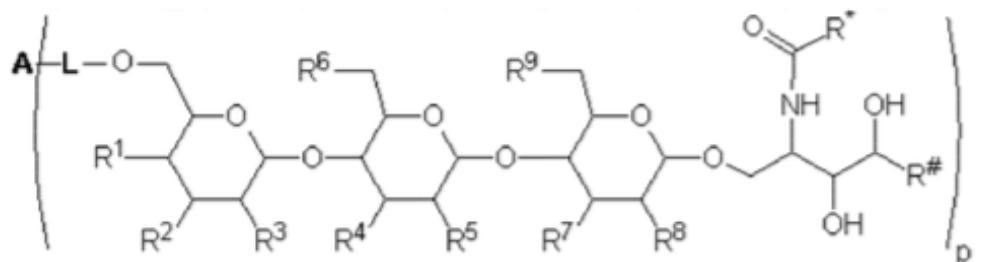


(VI)

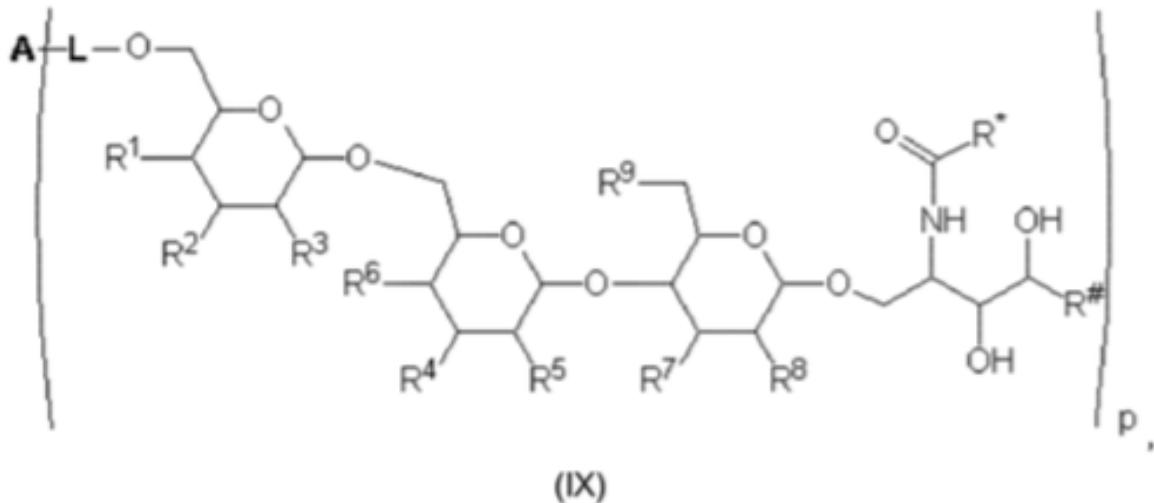
•



(VII)



(VIII)



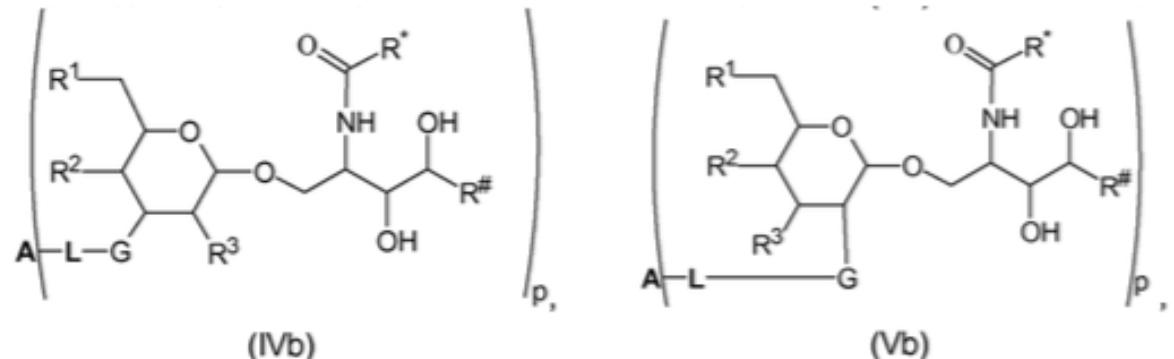
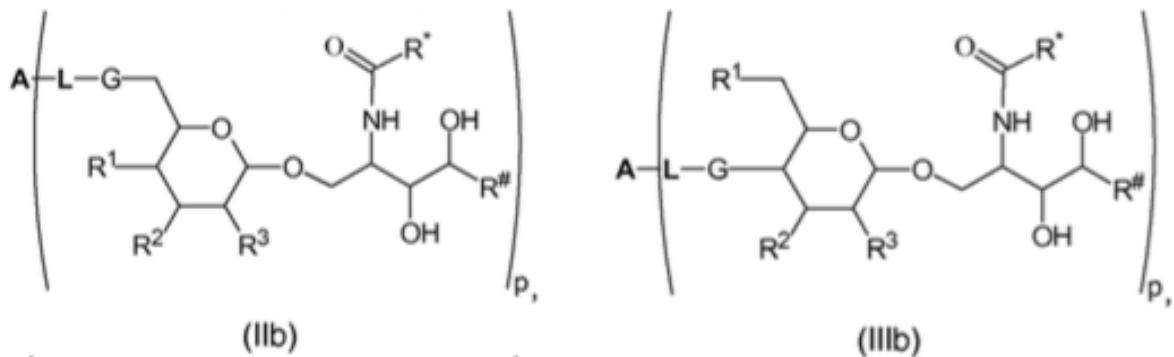
donde

A, L, R *, R # y p tienen los significados que se definen aquí.

R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 representan independientemente el uno del otro:

5 -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-SO₂-CH₃, -O-SO₂-C₂H₅, -O-SO₂-C₃H₇, -O-COOCH₃, -NHCOC₃H₇, -NH₂,

[0091] En una realización específicamente preferida de la presente invención se prefieren las siguientes subfórmulas (IIb, IIIb, IVb y Vb) de la fórmula general (I):



10 donde

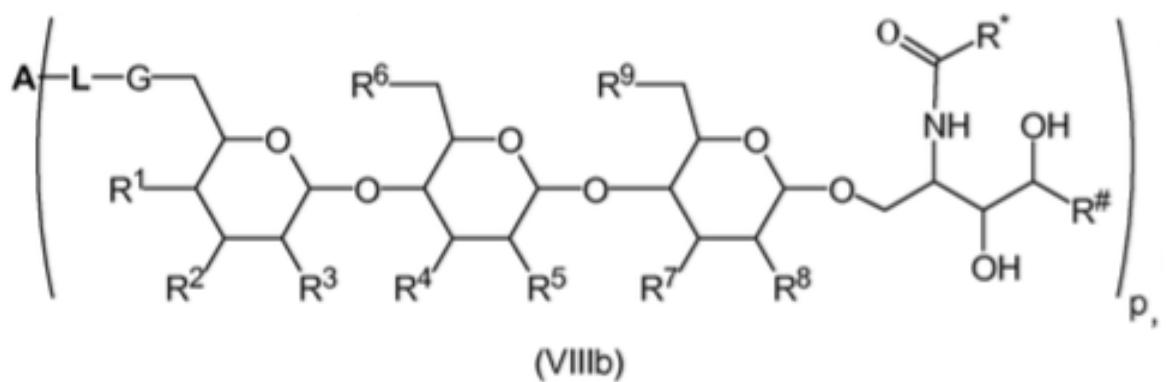
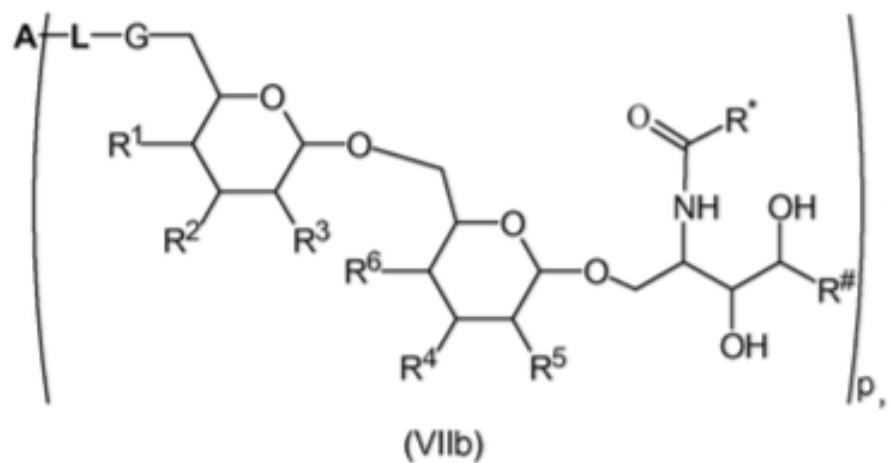
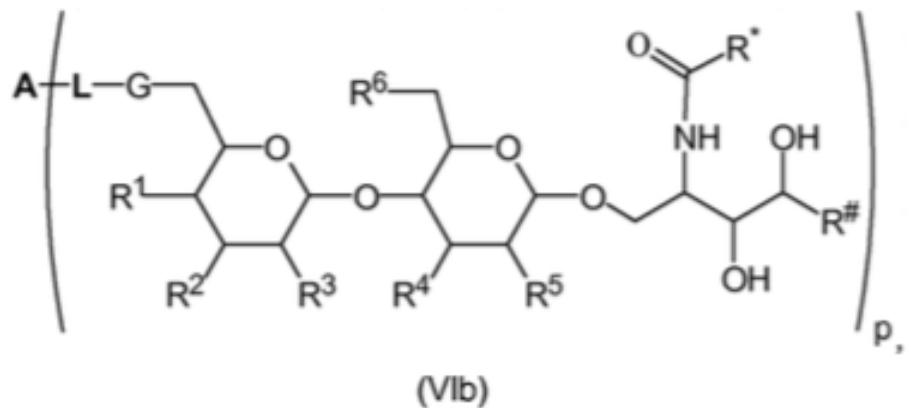
A, L, R *, R # y p tienen los significados que se definen aquí.

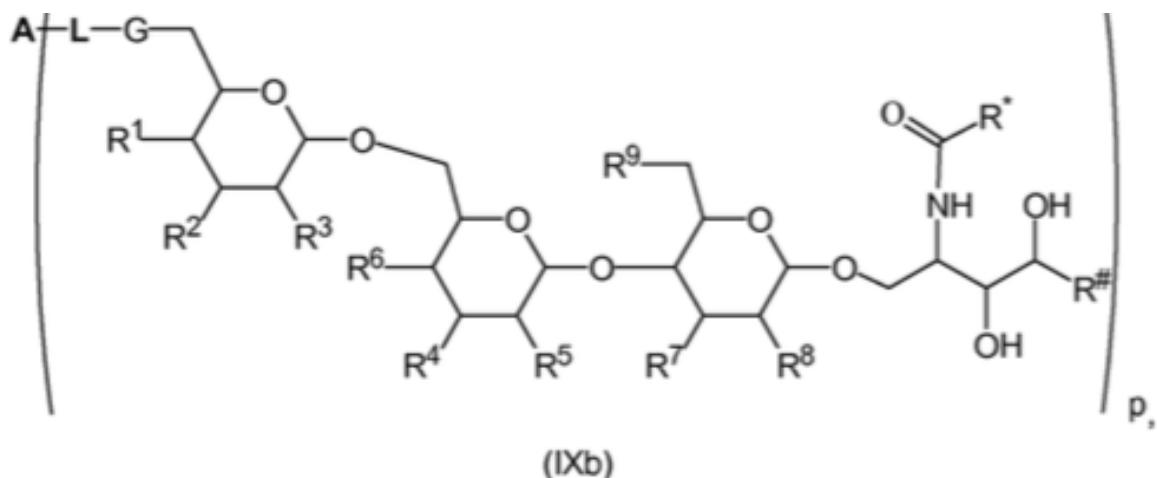
R1, R2, R3 representan independientemente el uno del otro:

-H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-SO₂-CH₃, -O-SO₂-C₂H₅, -O-SO₂-C₃H₇, -O-COOCH₃, -NHCOCH₃, -NH₂, G represents -NH-, -O-, -S-,

15

[0092] Por otra parte, se prefieren los siguientes subfórmulas (VIB, VIIb, VIIIb, IXb) de la fórmula general (I):





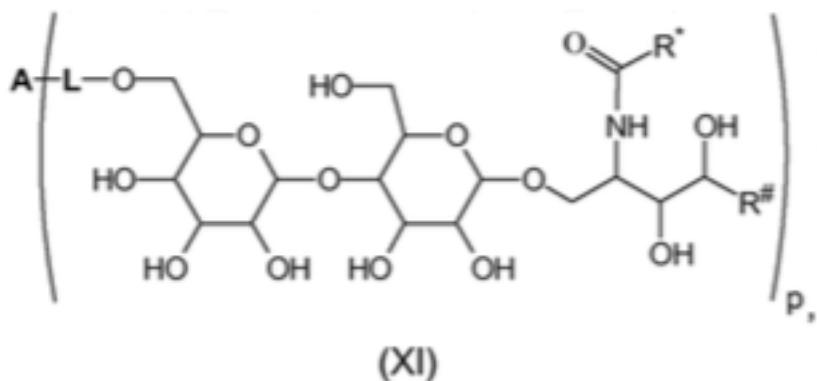
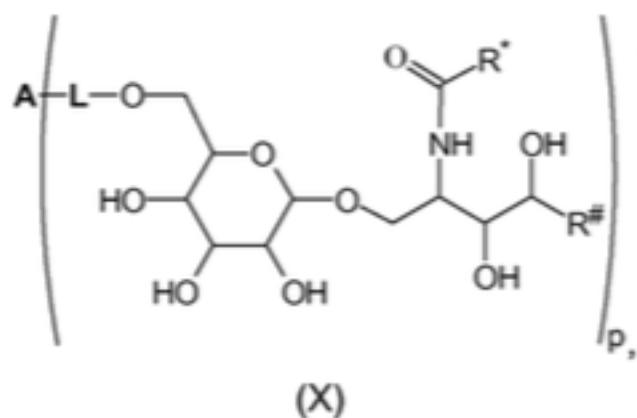
donde

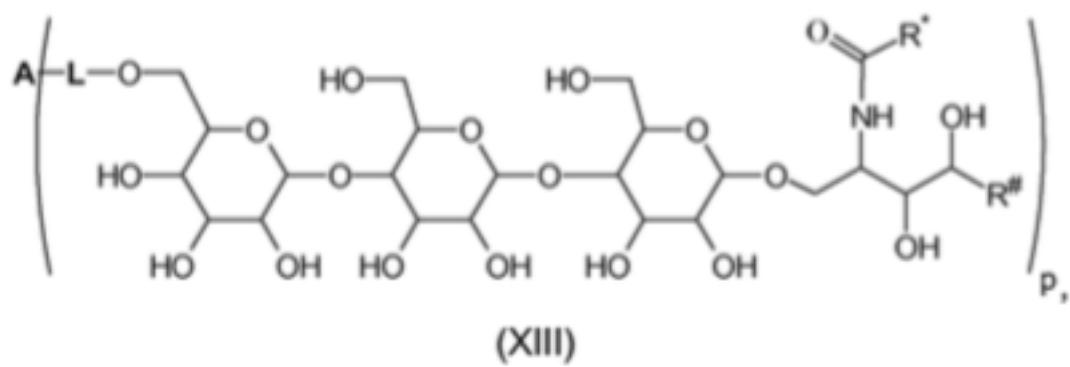
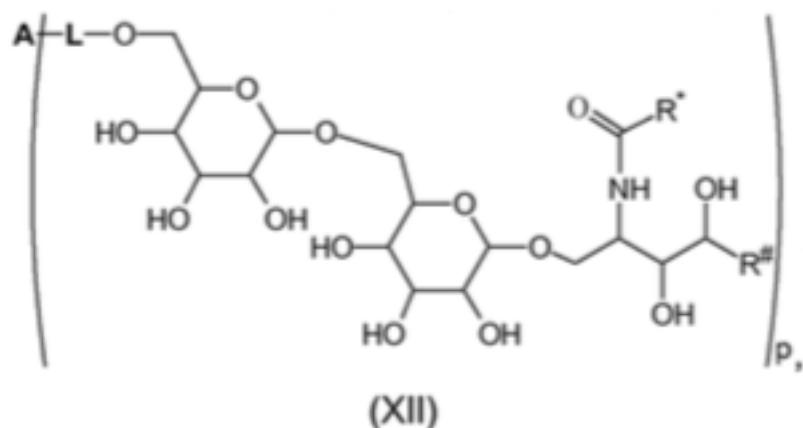
A , L , R^* , $R^{\#}$ y p tienen los significados que se definen aquí.

$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9$ representan independientemente los unos de los otros:

5 $-H, -OH, -OCH_3, -OC_2H_5, -OC_3H_7, -O-SO_2-CH_3, -O-SO_2-C_2H_5, -O-COOCH_3, -NHCOCH_3, -NH_2$,
 G representa $-NH-, -O-, -S-$,

[0093] Además, las siguientes subestructuras (X, XI, XII, XIII) de la estructura general (I) son las preferidas:

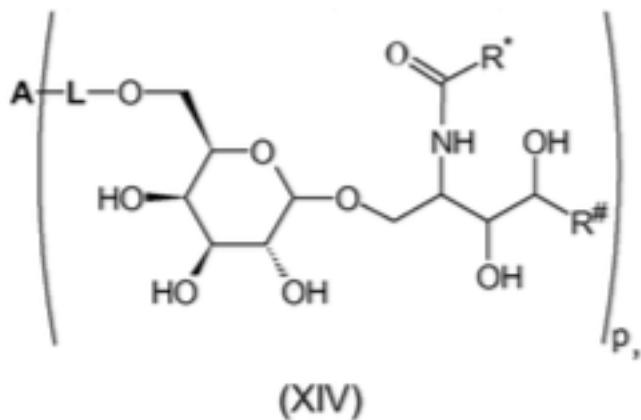


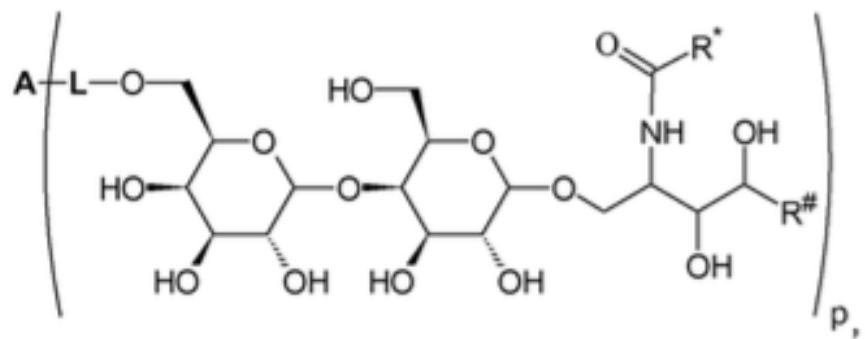


donde

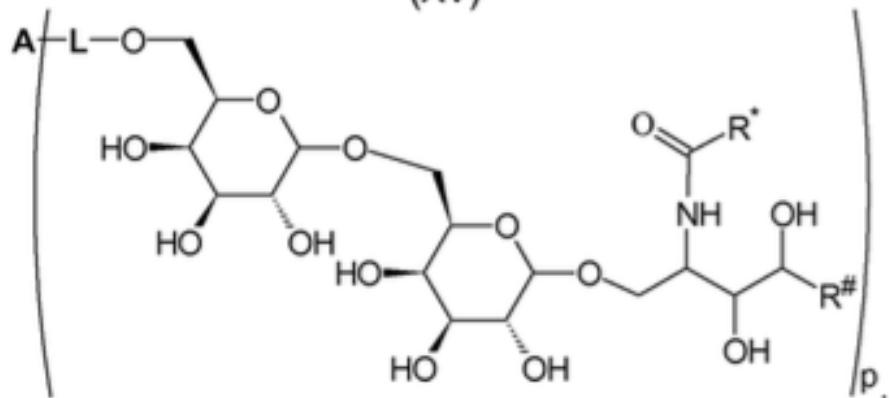
A, L, R *, R # y p tienen los significados que se definen aquí.

5 [0094] Además se prefieren los siguientes subestructuras (XIV, XV, XVI, XVII), de la estructura general (I):

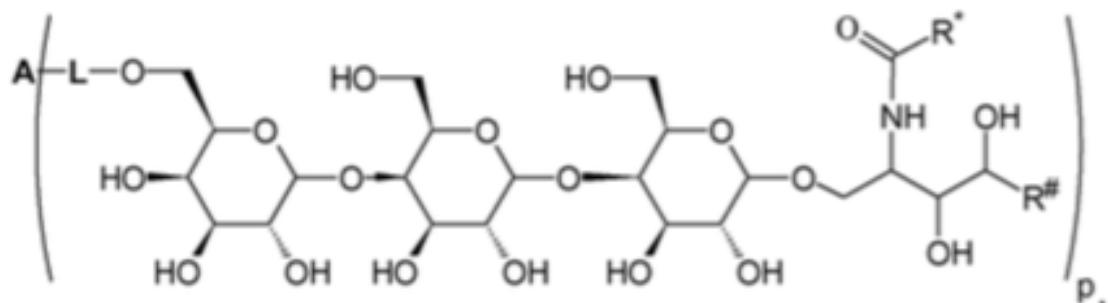




(XV)



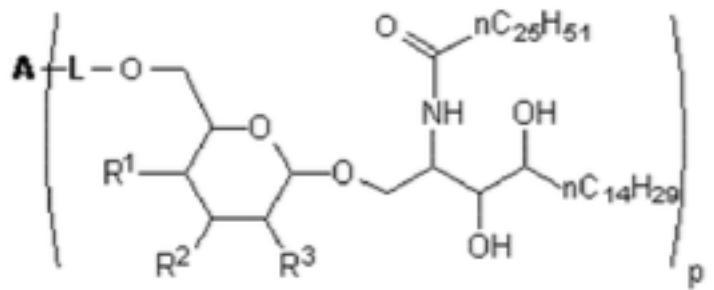
(XVI)



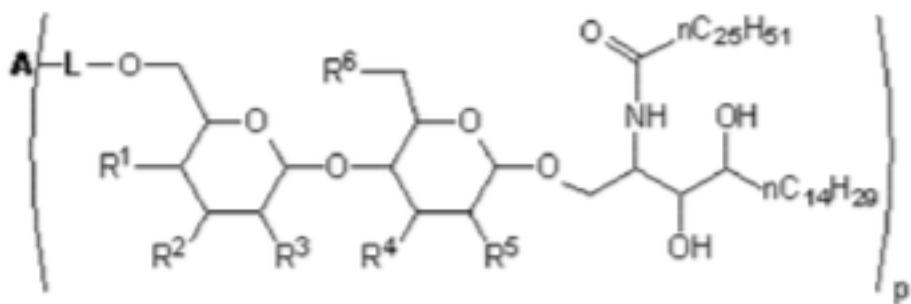
(XVIII)

5 en que lugar
A, L, R *, R # y p tienen los significados como se define aquí.

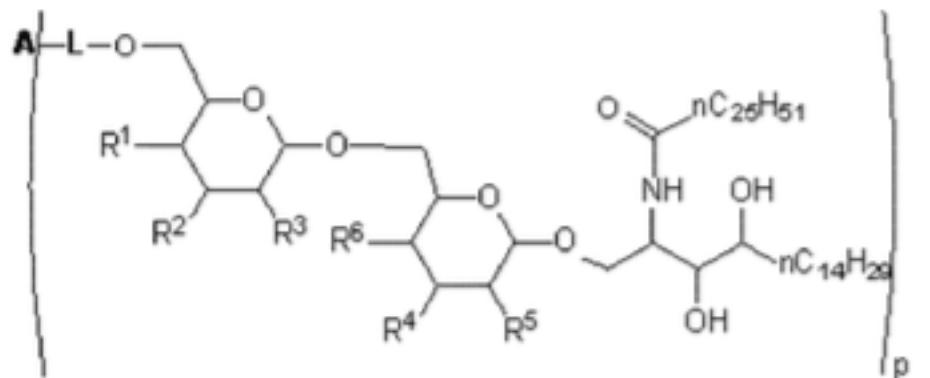
[0095] Además se prefieren los siguientes subestructuras (XVIII, XIX, XX) de la estructura general (I):



(XVIII)



(XIX)



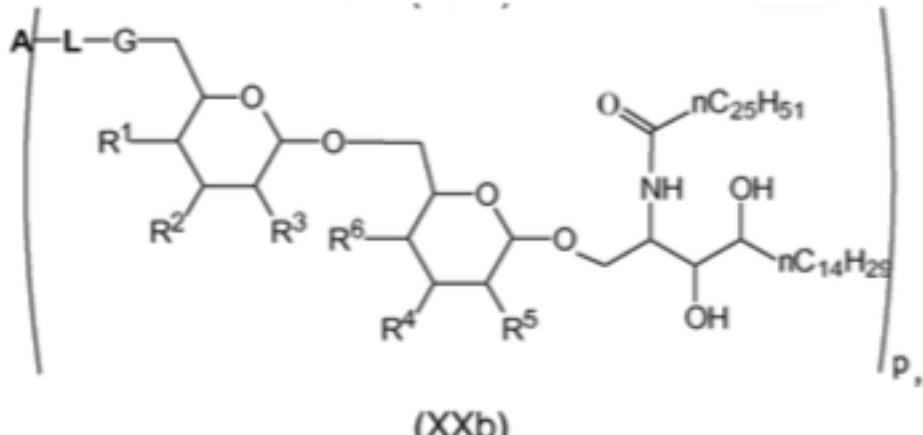
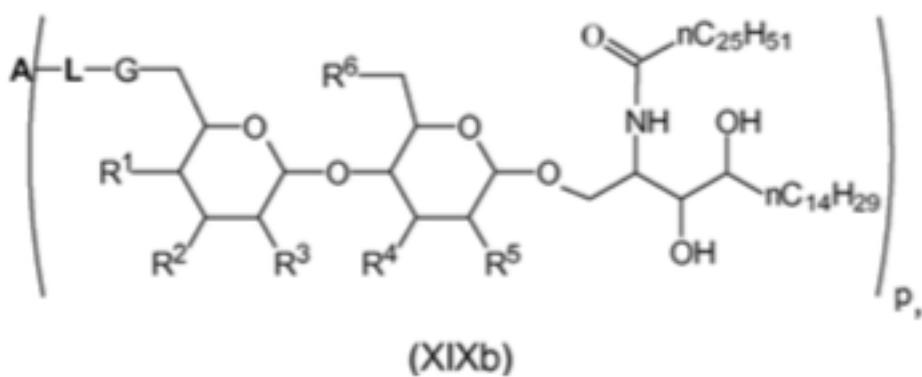
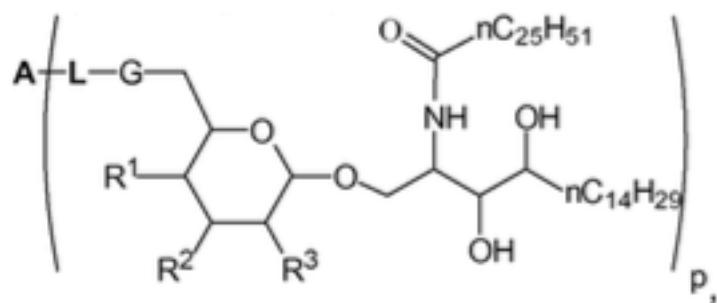
(XX)

donde

A, L y p tienen los significados que se definen aquí.

5 R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 representan independientemente los unos de los otros:
 -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-SO₂-CH₃, -O-SO₂-C₂H₅, -O-SO₂-C₃H₇, -O-COOCH₃, -NHCOCH₃, -NH₂,

[0096] En una realización específicamente preferida de la presente invención se prefieren las siguientes subestructuras (XVIIIb, XIXb, XXb) de la estructura general (I):



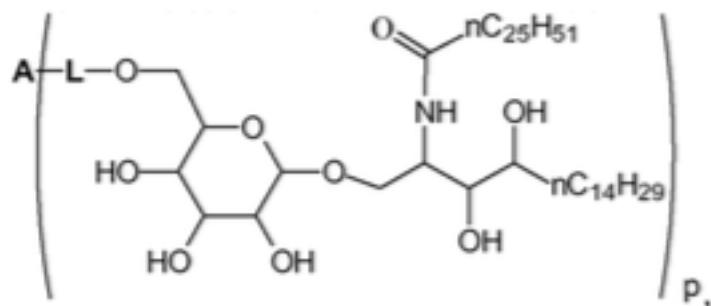
donde

A, I, y μ tienen los significados que se definen aquí.

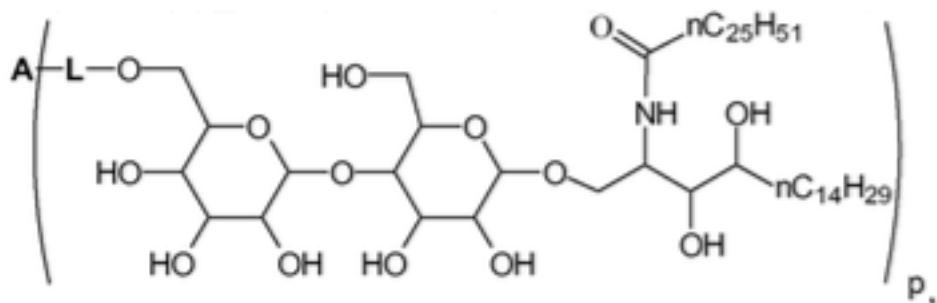
5 A, B y C tienen los significados que se definen aquí:
B1, B2, B3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 representan independientemente los unos de los otros:

-H, -OH, -OCH3, -OC2H5, -OC3H7, -O-SO2-CH3, -O-SO2-C2H5, -O-SO2-C3H7, -O-COOCH3, -NHCOCH3, -NH2, G representa -NH-, -O-, -S-.

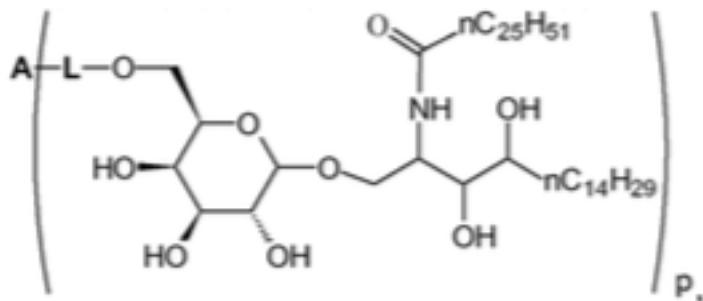
[0097] Además, se prefieren las siguientes subestructuras (XXXI, XXXII, XXXIII, XXXIV) de la estructura general (I):



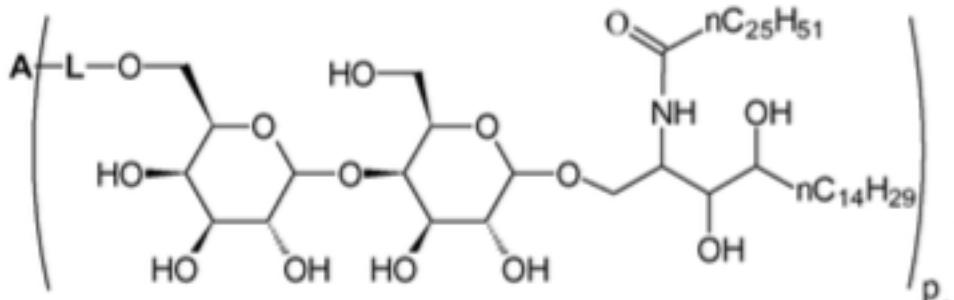
(xxi)



(XXIII)



(XXIII)



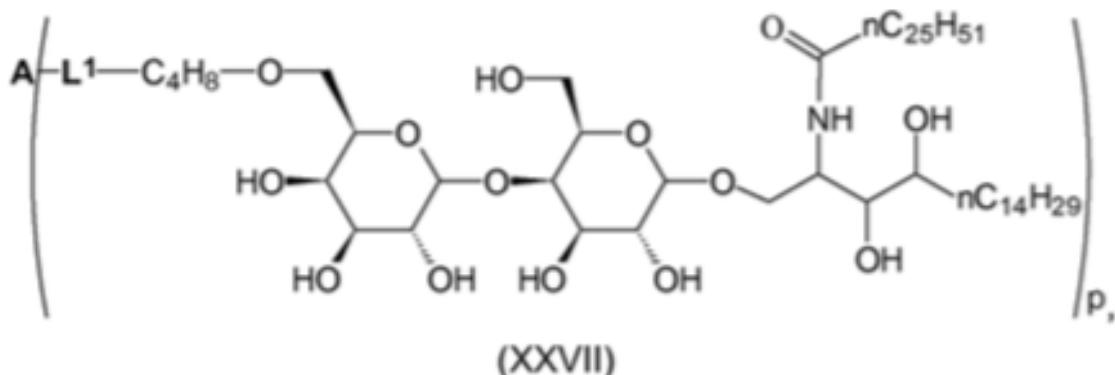
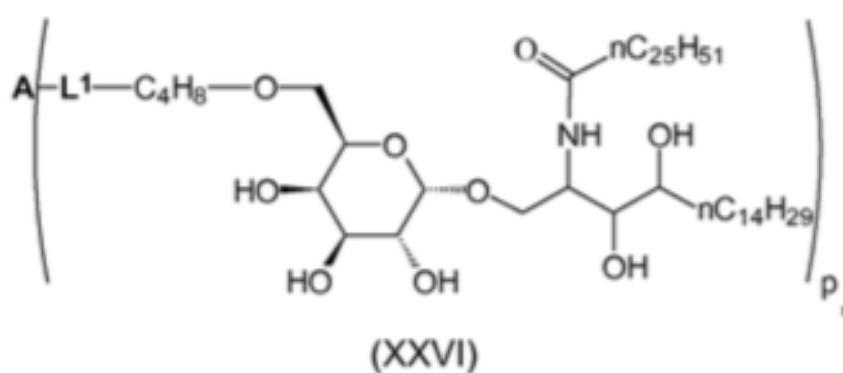
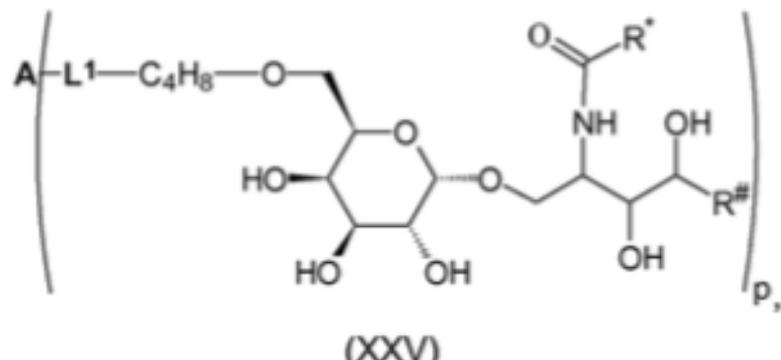
(XXIV)

donde

A, L y p tienen los significados que se definen aquí.

5

[0098] Especialmente son preferidos los compuestos de las subfórmulas (XXV), (XXVI) y (XXVII) de la fórmula general (I):

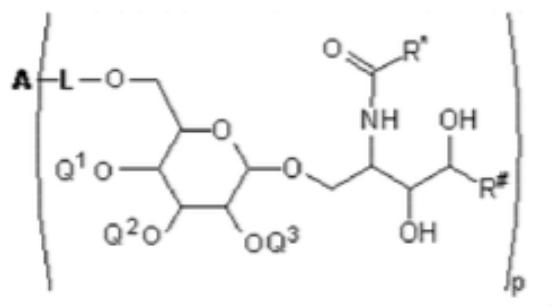


donde

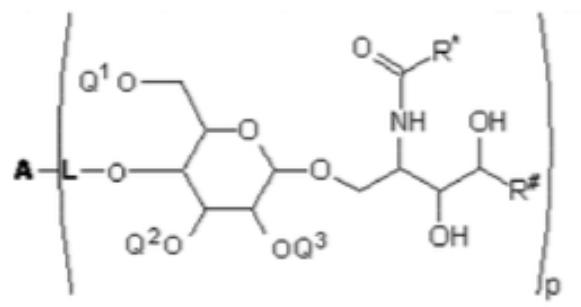
A , $L1$ y p tienen los significados que se definen aquí.

5 [0099] Sin embargo, en otra forma de realización preferida de la presente invención, los compuestos de la presente invención se refieren a las siguientes subfórmulas

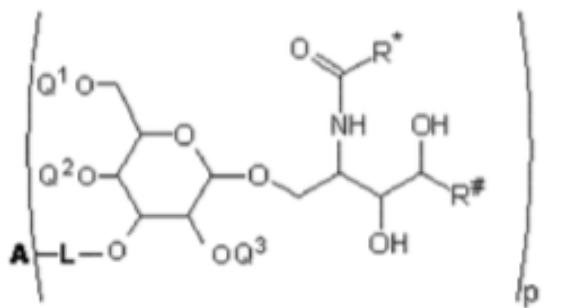
[0100] Se prefieren las siguientes subfórmulas (IIc, IIIC, IVc y VC) de la fórmula general (I):



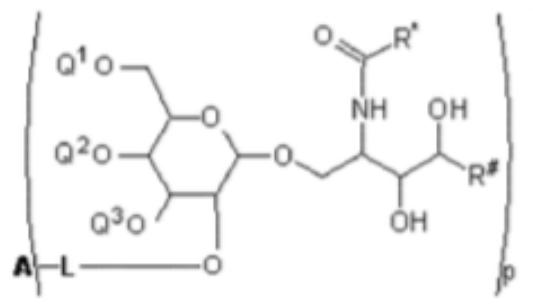
(IIlc)



(IIIlc)



(IVc)



(Vc)

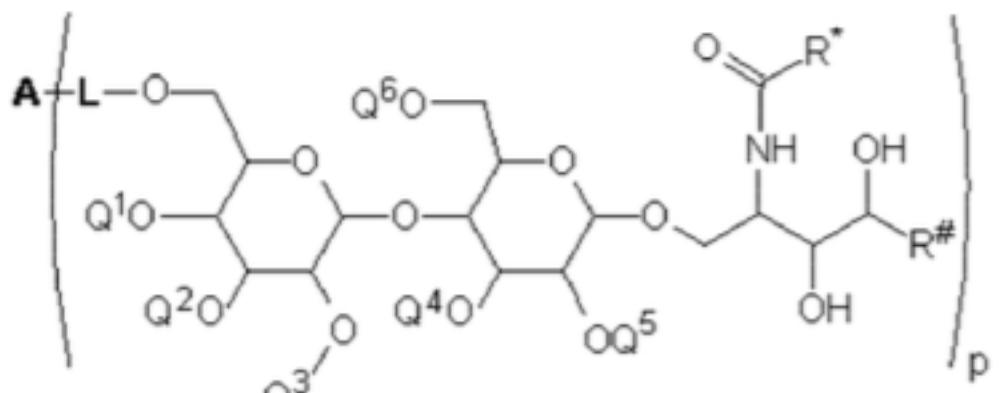
donde

A, L, R *, R # y p tienen los significados que se definen aquí.

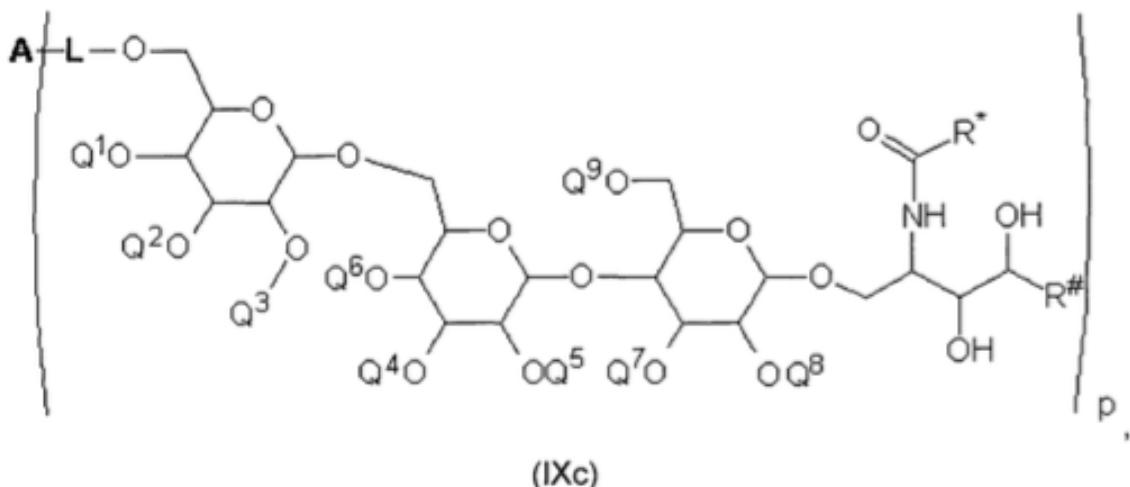
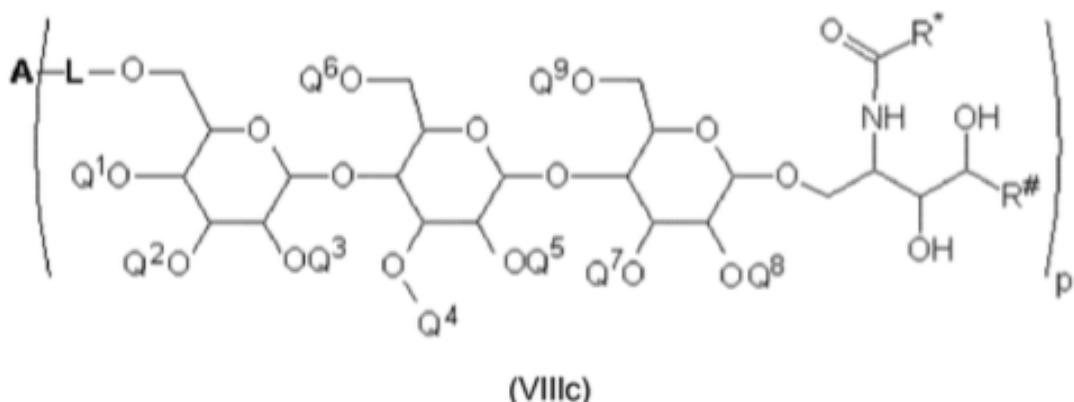
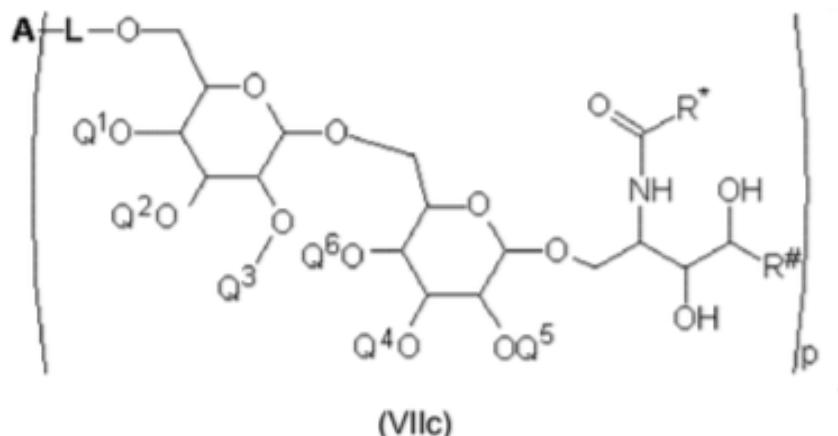
Q1, Q2, Q3 representan independientemente los unos de los otros:

5 -H, -CH3, -C2H5, -C3H7, -SO2-CH3, -SO2-C2H5, C3H7 -SO2-, -COCH3,

[0101] Es más, las siguientes subfórmulas de la fórmula general (I) VI, VII, VIII, IX) son preferidas:



(VIc)



donde

A, L, R *, R # y p tienen los significados que se definen aquí.

Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9 representan independientemente los unos de los otros:

5 -H, -CH3, -C2H5, -C3H7, -SO2-CH3, -SO2-C2H5, C3H7 -SO2-, -COCH3,

[0102] La expresión "tautómero" se define como un compuesto orgánico que es interconvertibles por una reacción química llamada tautomerización. Tautomerización puede ser catalizada preferiblemente mediante bases o ácidos u otros compuestos adecuados.

10

[0103] La extracción y aislamiento de antígenos de hidratos de carbono de un patógeno puede llevar a cabo por una variedad de medios (VALORACIONES MICROBIOLÓGICAS, Vo 42, Nr.1, 84-113, 1978;. REVISTA DE MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Vo. 44, Nr. 3, 249-270, 1981). Un método común se describe como sigue:

El aislamiento y purificación implican generalmente la extracción alcalina de las paredes celulares o células que primero había sido deslipidada con disolventes orgánicos, seguido por precipitación con disolventes orgánicos. La purificación adicional se logra con cromatografía de intercambio iónico. Las enzimas proteolíticas se utilizan para eliminar los componentes de péptidos o proteínas que queda, seguido por cromatografía de afinidad como una etapa de purificación final.

[0104] La síntesis de antígenos de carbohidrato sintéticos puede llevar a cabo por una variedad de medios (Nature Reviews Drug Discovery 4, 751-763, septiembre 2005). El método automatizado de fase sólida se describe como sigue:

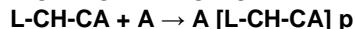
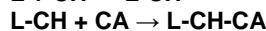
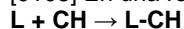
"La síntesis automatizada de oligosacáridos en fase sólida se ha desarrollado a partir de los conocimientos adquiridos a partir de oligopéptido y montaje de oligonucleótidos. El primer bloque de construcción se añade a una resina de poliestireno equipado con un enlazador escindible fácilmente que contiene un grupo hidroxilo libre. Un agente de activación induce acoplamientos involucran fosfato de glicosilo y bloques de construcción de tricloroacetimidato de glicosilo. A diferencia de oligonucleótidos y acoplamientos de péptidos, la formación del enlace glicosídico se produce sobre todo a bajas temperaturas y no requiere de una cámara de reacción que pueda enfriarse. Bloques restantes de construcción (es decir, un exceso molar de 5-10 veces, a veces aplica dos veces) se añaden a la cámara para cada acoplamiento."

[0105] El lavado y filtración eliminan cualquiera de los productos secundarios o reactivos restantes antes de la eliminación selectiva de un grupo protector temporal prepare el siguiente grupo hidroxilo para el acoplamiento subsiguiente. Eficacias de acoplamiento pueden ser evaluados por espectrometría de lectura después de la eliminación proteger-grupo cuando, se utilizan grupos protectores temporales que absorben la radiación ultravioleta, tales como 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). Originalmente, este ciclo de acoplamiento-desprotección se automatizó usando un sintetizador de péptidos convertido.

[0106] Después de la terminación de la secuencia de oligosacárido, el producto totalmente protegido se escinde del soporte sólido. Después de la desprotección global, el oligosacárido se purifica y su estructura verificada. Una serie de oligosacáridos cada vez más complejas ha sido ensamblado, cada uno dentro de 1 día o menos, utilizando el sintetizador automático de oligosacáridos. Esto se compara favorablemente con las semanas a meses tomadas utilizando métodos en fase de solución.

[0107] Otro aspecto de la presente invención comprende la síntesis de los compuestos de la fórmula general (I) $A [L-CH-CA]_p (I)$

[0108] En una realización, la síntesis de los compuestos de la presente invención son procede como sigue:



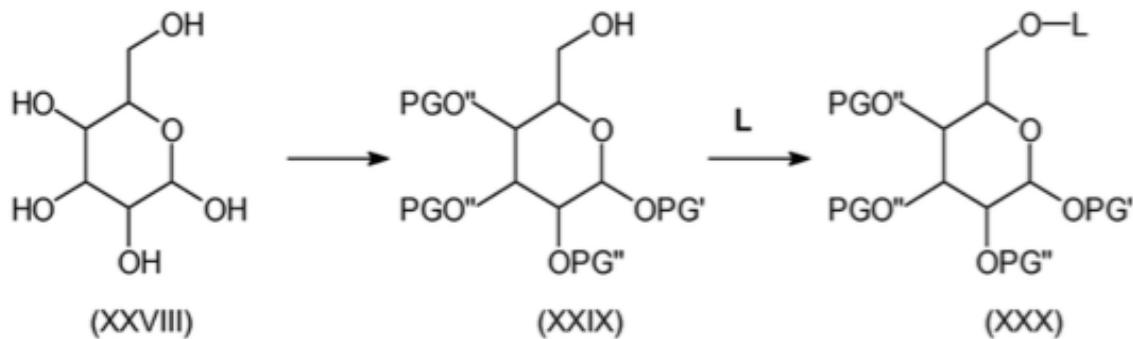
[0109] Específicamente, en una realización preferida particular de la presente invención, el resto CH se hace reaccionar con una molécula enlazadora L después de haber sido protegido con grupos de protección adecuados (PGs). En ella, las PGs pueden ser o bien los mismos PGs o también pueden ser diferentes PGs tales como PG' y PG'', dependiendo del grupo hidroxilo en el resto CH. En una realización preferida de la presente invención las protecciones grupos PG' y PG'' son diferente de cada uno. En otra realización preferida, los grupos de protección PG' y PG'' son los mismos.

[0110] Como aquí se emplean, los grupos protectores usados en este documento son preferentemente útiles para alcoholes secundarios. En una realización sililo grupos protectores tales como trimetilsililo (TMS), terc-butildifenilsililo (TBDPS), terc-butildimetilsililo (TBS o TBDMS), pylsilyl triisopro- (TIPS) y [2- (trimetilsilil) etoxi] metilo (SEM) se utilizan . En otra realización éter pro- tección de carbono prefieren los grupos se utilizan tal como metilo, n-butilo, terc-butilo, p-metoxibencilo, metoxi-metilo, tritilo, vinilo, alilo, loxymethyl benzyl, acetilo, pivolyl, 2-tricloro -1-imidoacetyl, 2-tricloro-1-N-phenylimioacetyl y tetrahidropiranilo. Sin embargo, en otra realización preferida de la presente invención al menos un grupo sililo para PG' y al menos un éter de carbono para PG'' se utilizan en una de las moléculas (XXIX), (XXX) y (XXXII). Todavía en otra realización preferida de la presente invención en las moléculas (XXIX), (XXX) y (XXXII), dos grupos de protección éter de carbono diferentes se utilizan para los grupos de protección PG' y PG'', preferiblemente al menos una de bencilo para PG'' y al menos un alil grupo de PG', más preferiblemente tres grupos bencilo para PG'' en cada posición 3, 4 y 5 de cuatro en moléculas (XXIX), (XXX) y (XXXII) y un grupo alilo para PG' en 2 posición en moléculas (XXIX) y (XXX).

[0111] Por lo tanto, en una realización preferida particular, una secuencia de reacción se lleva a cabo como sigue:

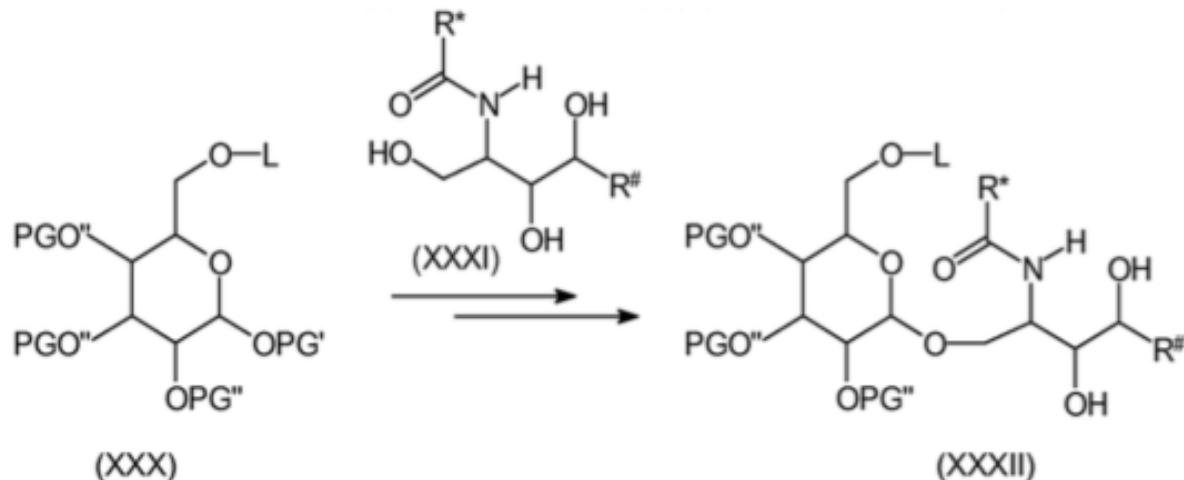
60

65



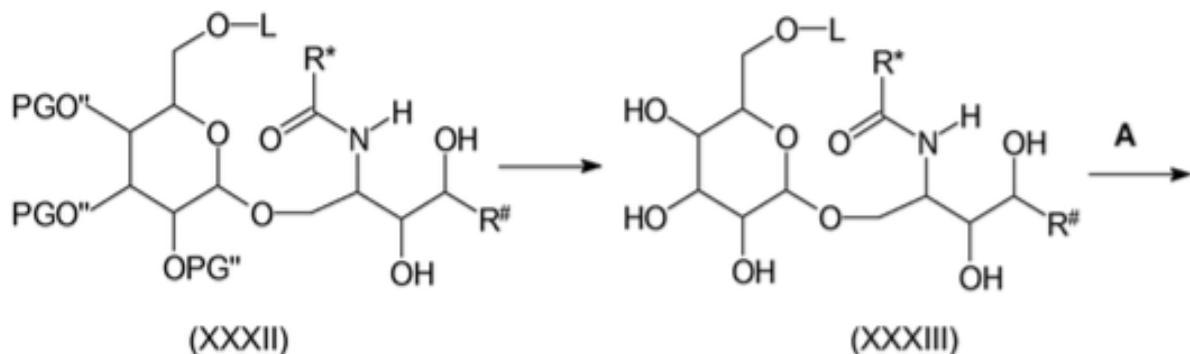
donde L , PG' y PG'' son como se definen en el presente documento.

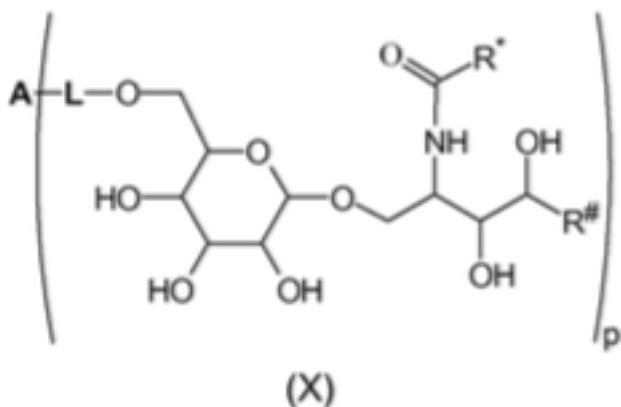
5 [0112] Posteriormente, en esta realización, la molécula de L-CH (XXX) se convierte en al menos una etapa de reacción, preferiblemente en dos etapas de reacción a intermedio L-CH-CA con un precursor adecuado (XXXI) para la molécula de CA:



donde A , L , PG' , PG'' , R^* y $R^{\#}$ son como se definen aquí.

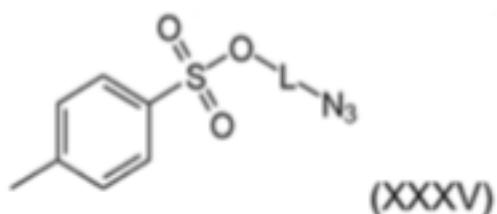
10 [0113] En la siguiente secuencia de reacción de esta realización particular, (XXXII) intermedio se desprotege a partir de los grupos de protección PG" a (XXXIII) intermedio y se hace reaccionar con cualquier antígeno A adecuado para producir el compuesto (X) como un representante de los compuestos inventivos de la fórmula general (I):



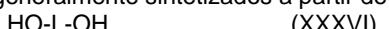


donde A, L, PG", R * y R # son como se definen aquí.

[0114] En la síntesis de los compuestos de la fórmula general (I) A [L-CH-CA] p, y, en particular, como se muestra arriba en la síntesis de compuestos de la fórmula general (X) se prefiere que la molécula enlazadora L se introduzca a través de un precursor que se origina a partir del compuesto diol (glicol). Se prefieren las moléculas precursoras asimétricas para el enlazador L, que tienen por un lado un grupo nucleófilo tal como un haluro o un grupo hidroxil activado y en el otro lado un grupo funcional que se puede convertir en un grupo amino tal como una azida, un protegida grupo amino o nitrilo. En una realización más preferida de la presente invención, las moléculas precursoras para el enlazador L tienen por un lado un grupo funcional alcohol activado con un grupo saliente tal como tosilato, triflat, o mesilato, y en el otro lado preferiblemente un grupo amino protegido o una azida. En una realización particularmente preferida de la presente invención, la molécula precursora para el enlazador L tiene la fórmula general (XXXV)



que pueden ser generalmente sintetizados a partir de diol (glicol) compuestos de la fórmula general (XXXVI)



[0115] Además, se prefieren los enlazador ser una cadena de carbono ramificada con 2 a 30 átomos de carbono y de 0 a 6 heteroátomos selected de entre el grupo de -O-, -S- y -N (RN) lineal o - y / o con uno o sistemas de anillos más aromáticos y / o carbocíclico y / o heterocíclico, en el que el ligador es un enlace a través de un átomo de carbono a un átomo de oxígeno de la fracción hydrato de carbono (CH), preferiblemente al átomo de oxígeno en el átomo de carbono C6 de la fracción de carbonhydrate, y es directamente o indirectamente a través de un enlace átomo de carbono al antígeno. Esta cadena de carbono es preferiblemente de bonos través de un grupo metileno de la cadena de carbono al oxígeno y preferiblemente el C6-oxígeno de la fracción de carbonhydrate. Además, esta cadena de carbono es preferiblemente de bonos través de un grupo metileno o un grupo carbonilo de la cadena de carbono a un heteroátomo y preferiblemente un átomo de nitrógeno del antígeno (A) y más preferiblemente a un átomo de nitrógeno de un grupo amino del antígeno. Tal como se usa en el presente documento "vincular directamente" significa que la cadena de carbono está unido a un grupo funcional del antígeno, preferiblemente un grupo amino del antígeno mientras que el término "vincular indirectamente" se refiere a una unión de la cadena de carbono a un espaciador unido a la antígeno de modo que la cadena de carbono está unido al espaciador que está conectado al antígeno. Por lo tanto, tal un espaciador está interpuesto entre el enlazador o respectivamente de cadena de carbono y el antígeno y puede por ejemplo surgen de la escisión de un anhídrido o una succinimida. Preferiblemente, la cadena de carbono tiene de 2 a 25, más preferiblemente 2 a 20, aún más preferiblemente de 2 a 15 o de 2 a 12 átomos de carbono. También se prefiere que la cadena de carbono tiene hasta 4 átomos de oxígeno y más preferiblemente 1, 2 ó 3 átomos de oxígeno y / o hasta 4 átomos de azufre, preferiblemente 1 ó 2 átomos de azufre. Además, uno o dos anillos sustituidos o no sustituidos de fenileno pueden estar presentes dentro de la cadena de carbono.

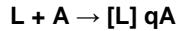
[0116] En todas las realizaciones descritas anteriormente un residuo RN representa -H, -CH3, -C2H5, -C3H7, -C4H9, -C5H11, -C6H13, -C7H15, -C8H17, -OH, -OCH3, -OC2H5, -OC3H7, -O-ciclo-C3H5, -OCH (CH3) 2, -OC (CH3) 3, -OC4H9, -OPh, -OCH2-Ph, -OCPH3, -CH2-OCH3, -C2H4-OCH3, -C3H6- OCH3, -CH2-OC2H5, -C2H4-OC2H5, -C3H6-OC2H5, -CH2OC3H7, -C2H4-OC3H7, -C3H6-OC3H7, -CH2O-ciclo-C3H5, -C2H4-O-ciclo-C3H5, -

5 C3H6-O -ciclo-C3H5, -CH2-OCH (CH3) 2, -C2H4-OCH (CH3) 2, -C3H6-OCH (CH3) 2, -CH2-OC (CH3) 3, -C2H4-OC (CH3) 3, -C3H6-OC (CH3) 3, -CH2-OC4H9, -C2H4-OC4H9, -C3H6-OC4H9, -CH2-OPh, -C2H4-OPh, -C3H6-OPh, -CH2-OCH2-Ph, -C2H4-OCH2 Ph, -C3H6-OCH2-Ph, -NO2, -F, -Cl, -Br, -COCH3, -COC2H5, -COC3H7, -CO-ciclo-C3H5, -COCH (CH3) 2, COC (CH3) 3, -COOH, -COOCH3, -COOC2H5, -COOC3H7, -COO-Ciclo-C3H5, -COOCH (CH3) 2, -COOC (CH3) 3, OOC-CH3, C2H5-OOC, OOC-C3H7, OOC-ciclo-C3H5, -OOC-CH (CH3) 2, OOC-C (CH3) 3, -CONH2, -CONHCH3, -CONHC2H5, -CONHC3H7, -CONH-ciclo-C3H5, -CONH [CH (CH3) 2], -CONH [C (CH3) 3], -CON (CH3) 2, -CON (C2H5) 2, -CON (C3H7) 2, -CON (ciclo-C3H5) 2, -CON [CH (CH3) 2] 2, -CON [C (CH3) 3] 2.

10 [0117] En otra realización de la presente invención, el orden de conexión de los respectivos restos de los compuestos de la presente invención se puede variar.

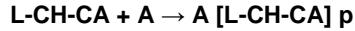
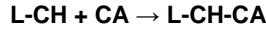
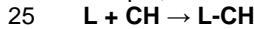
15 En otra realización particular de la presente invención en primer lugar los restos CH y CA están conectados a través de reacción química adecuada o reacciones a dar el intermedio CH-CA, y posteriormente se añade una molécula de engarce L para dar el intermedio L-CH-CA que luego se hace reaccionar adicionalmente para proporcionar los compuestos de la presente invención de la fórmula general (I).

20 En otra realización de la presente invención antígeno A se modifica con enlazador molécula de L para dar el intermedio [L] qA. Intermedio [L] qA puede entonces hacerse reaccionar adicionalmente con el compuesto intermedio CA-CH obteniéndose los compuestos de la presente invención de la fórmula general (I).



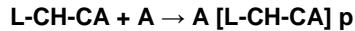
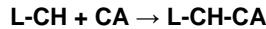
25 [0118] Todos los enfoques de reacción pueden ser modificados para usar o producir los respectivos compuestos preferidos de las subfórmulas (II) a (XXVII).

En que, de acuerdo con la secuencia de reacción



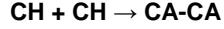
30 [0119] Restos de CH con conectividad diferente como se ejemplifica en subfórmulas (II) a (V). Del mismo modo, los restos de CH, siendo monosacáridos, disacáridos o trisacáridos como se ejemplifica en subfórmulas (VI) a (XIII), también con respecto a los aspectos estereoquímicos como se ejemplifica en subfórmulas (XIV) a (XVII) son adecuados para la secuencia de reacción anterior. Además, el enfoque sintético es también adecuado para ser aplicado a restos de Ceramida específicos como se ejemplifica en las subfórmulas (XVIII) a (XXIV), que también es válido para moléculas específicas enlazadoras ejemplificadas para las subfórmulas (XXV) y (XXVII).

35 Por lo tanto, la secuencia de reacción



40 es adecuada también para la síntesis de compuestos intermedios (II) a (XXVII) por la elección de los restos respectivos L, CH, y CA.

45 [0120] En una realización preferida adicional de la presente invención, el resto de carbohidrato y la ceramida se unen juntos por primera vez antes de la introducción de la molécula de enlazador. Por lo tanto, una reacción posterior también podría ser como sigue:



50 [0121] La presente invención también comprende sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la fórmula general (I).

55 [0122] En el caso, los compuestos de la invención llevan y / o ácidos sustituyentes básicos, pueden formar sales con ácidos o bases orgánicas o inorgánicas. Ejemplos de ácidos adecuados para tal formación de sal de adición de ácido son el ácido clorhídrico, hidro-ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido salícílico, ácido p-aminosalícílico, ácido málico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido sulfónico, ácido fosfónico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido lacetic pheny-, ácido benzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico ácido, ácido nitroso, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilensulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naphthylsulfonic, ácido sulfánilico, ácido canforsulfónico, ácido china, ácido mandélico, o-methylmandelic, ácido-hidrógeno bencenosulfónico, ácido pírico, ácido adípico, do-tolyltartraric , ácido tartrónico, (o, m, p) del ácido toluico, ácido sulfónico naftilamina, y otros ácidos minerales o carboxílicos bien conocidos por personas experimentadas. Las sales se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir una sal de la manera convencional.

60 [0123] Ejemplos de bases inorgánicas u orgánicas adecuadas son, por ejemplo, NaOH, KOH, NH4OH, hidróxido de tetraalquilamonio, lisina o arginina y similares. Las sales pueden prepararse de una manera utilizando métodos convencionales bien conocidos en la técnica, por ejemplo por tratamiento de una solución del compuesto de la fórmula general (I) con una solución de un ácido, seleccionado fuera del grupo mencionado anteriormente.

[0124] Algunos de los compuestos de la presente invención se pueden cristalizar o recristalizar en disolventes tales como disolventes acuosos y orgánicos. En tales casos se pueden formar solvatos. Esta invención incluye dentro de su alcance solvatos ometrico stoichi- incluyendo hidratos así como compuestos que contienen cantidades variables de agua que se pueden producir mediante procesos tales como liofilización.

[0125] Ciertos compuestos de la fórmula general (I) pueden existir en la forma de isómeros ópticos, si sustituyentes con al menos un centro asimétrico están presentes, por ejemplo, diastereoisómeros y mezclas de isómeros en todas las proporciones, por ejemplo, mezclas racémicas. La invención incluye todas estas formas, en particular las formas isómeras puras. Las diferentes formas isómeras se pueden separar o resolver una de la otra por métodos convencionales, o cualquier isómero dado se puede obtener por métodos sintéticos convencionales o por síntesis estereoespecífica o asimétrica. Cuando un compuesto según la fórmula general (I) contiene un resto de alqueno, el alqueno se puede presentar como un cis o trans isómero o una mezcla de los mismos. Cuando se proporciona una forma isomérica de un compuesto de la invención sustancialmente libres de otros isómeros, contendrá preferiblemente menos de 5% w / w, más preferiblemente menos de 2% w / w y especialmente menos de 1% w / w de los otros isómeros.

[0126] Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los derivados de conjugados de hidratos de carbono glicolípidos de la invención como medicamentos, es decir, como agentes farmacéuticamente activos aplicables en medicina.

[0127] Sorprendentemente, se encontró que los nuevos conjugados de hidratos de carbono glicolípidos de la presente invención también son adecuados para elevar una respuesta inmune en un animal y son adecuados para la vacunación contra enfermedades infecciosas que son causadas por patógenos seleccionados del grupo de bacterias, virus, sporozoa, parásitos u hongos. Por otra parte, si el antígeno de sacárido es específico para las células cancerosas, los nuevos conjugados en hidratos de carbono de glicolípidos son adecuados para el tratamiento y profilaxis de cánceres.

Ambos aislados y antígenos de carbohidrato sintéticos son adecuados para la formación del conjugado descrito. Además se encontró, que el tratamiento de un animal con los nuevos conjugados en hidratos de carbono glicolípidos de la invención actual llevaron a la formación de IgG-isotipos de inmunoglobulinas, que demuestran el desarrollo de las células B de memoria en el organismo vivo. La presencia de células B de memoria demuestra memoria inmunológica. De este modo se ha demostrado, que los conjugados en hidratos de carbono glicolípidos de la presente invención son capaces de inducir una protección a largo plazo en un animal contra un patógeno. La vacunación descrita es, además, independiente de otros adyuvantes, no necesita ningún portador de proteínas ni refrigeración de la vacuna.

[0128] Por lo tanto, los compuestos según la fórmula general (I - XXVII) son adecuados para el uso como un agente farmacéuticamente activo aplicable en medicina, especialmente para su uso en la vacunación contra las enfermedades infecciosas.

[0129] Las enfermedades infecciosas para las que las vacunas pueden proporcionarse por los compuestos de acuerdo con la presente invención se seleccionan del grupo de bacterias, sporozoal, parásitos, hongos o enfermedades infecciosas virales.

[0130] La enfermedad infecciosa bacteriana para la que las vacunas pueden ser proporcionadas por los compuestos de acuerdo con la invención es causada por un patógeno seleccionado del grupo que comprende: *Allochromatium vinosum*, *Acinetobacter baumanii*, *Bacillus anthracis*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium spp.*, *CIT robacter spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Rensis TulFrancisella*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *catharralis Moraxella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Serratia spp.*, *Shigella spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* *lloccucus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Yersina pestis*, *und enterocolitica Yersina*.

[0131] La enfermedad infecciosa parásita para los que las vacunas pueden ser proporcionadas por los compuestos de acuerdo con la invención es causada por un patógeno seleccionado del grupo que comprende: *Babesia*, *Balantidium*, *Besnoitia*, *Blastocystis*, *coccidios*, *Cryptosporidium*, *Cytauxzoon*, *Cyclospora*, *Dientamoeba*, *Eimeria*, *Entamoeba*, *Enterocytozoon*, *Enzephalitozoon*, *Eperythrozoon*, *Giardia*, *Hammondia*, *Isospora*, *Leishmania*, *microsporidios*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*, *Pneumocystis*, *Schistosoma*, *Sarcocystis*, *Theileria*, *Trichinella*, *Toxoplasma*, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, *Unicaria*, *Cestoda*, *Dipylidium*, *Dranunculus*, *Echinococcus*, *Fasciola*, *Fasciolopsis*, *Taenia*, *Ancylostoma*, *Ascaris*, *Brugia*, *Enterobius*, *Loa loa*, *Mansonella*, *Necator*, *Oncocerca*, *Strongyloides*, *Strongylus*, *Toxocara*, *Toxascaris*, *Trichuris* o *Wuchereria*.

[0132] La enfermedad infecciosa fungica para los que las vacunas pueden ser proporcionadas por los compuestos de acuerdo con la invención es causada por un patógeno seleccionado del grupo que comprende:

5 Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Trichophyton interdigitale, T. schonleinii, T. verrucosum, T. violaceum, T. tonsurans, Trichophyton spp., M. canis, Candida albicans, C. guillermondii, C. krusei, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. glabrata, Candida spp., Microsporum spp., Microsporum canis, Microsporum audonii, Microsporum gypseum, M. ferrugineum, Trichosporum beigelii, Trichosporum inkiin, Aspergillus niger, Alternaria, Acremonium, Fusarium o Scopulariopsis.

10 [0133] La enfermedad infecciosa viral para los que las vacunas pueden ser proporcionadas por los compuestos de acuerdo con la invención es causada por un patógeno seleccionado del grupo que comprende:

15 Los adenovirus, virus Ébola, virus de Epstein-Barr-virus, Flavivirus, FSME-virus, virus de la gripe, Hanta-virus, virus de inmunodeficiencia humana ("VIH"), virus del herpes simple ("HSV", tipo 1 o 2), herpes humano virus 6 (HHV-6), el virus del papiloma humano ("HPV", tipo 16 o 18), citomegalovirus humano ("HCMV"), la hepatitis B humana o virus C ("VHB", Tipo B; "VHC", Tipo C), Lassavirus, Lyssavirus (EBL 1 o EBL 2), Marburgvirus, Norovirus, parvovirus B19, Pestvirus, poliovirus, rinovirus, rotavirus, el SARS-associated coronavirus, el virus de la varicela-zoster.

20 [0134] Entre los cánceres para los que los nuevos conjugados en carbohidratos glucolípidos son adecuados, se ha prestado atención al cáncer de vejiga, cáncer de mama, de colon y cáncer rectal, cáncer endometrial, del riñón (células renales) Cáncer, leucemia, cáncer de pulmón del melanoma, no -Hodgkin linfoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de tiroides.

25 [0135] Entre las enfermedades infecciosas, se ha dado la atención a Haemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae.

30 [0136] Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la presente invención como ingrediente activo, junto con al menos un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente y / o diluyentes. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse en un portador sólido o líquido convencional o diluyente a nivel de dosificación adecuado de una manera conocida. Las preparaciones preferidas están adaptados para la aplicación oral. Estas formas de administración incluyen, por ejemplo, píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos con película, comprimidos recubiertos, cápsulas, polvos y depósitos.

35 [0137] Además, la presente invención también incluye preparaciones farmacéuticas para aplicación parenteral, dérmica incluyendo, intradérmica, intragástrica, intracutáneo, intravasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrabucal, percután, rectal, subcutánea, sublingual, tópica o aplicación transdérmica, que las preparaciones además de vehículos y / o diluyentes típicos contienen al menos un compuesto de acuerdo con la presente invención y / o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo.

40 [0138] Las **composiciones farmacéuticas** de acuerdo con la presente invención contienen al menos un compuesto de acuerdo con la presente invención, y / o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo. Normalmente se administra junto con materiales portadores adecuados seleccionados con respecto a la forma deseada de administración, es decir, para la administración oral en forma de tabletas, cápsulas (ya sea llenado sólido, semisólido o líquido lleno lleno), polvos para la constitución, extruidos, depósitos, geles, elixires, gránulos dispersables, jarabes, suspensiones, y la como, y en consonancia con las prácticas farmacéuticas convencionales. Por ejemplo, para administración oral en forma de comprimidos o cápsulas, el componente de fármaco activo puede combinarse con cualquier portador farmacéuticamente aceptable no tóxico oral, preferiblemente con un vehículo inerte como lactosa, almidón, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico , sulfato de calcio, talco, manitol, alcohol etílico (cápsulas llenas de líquido) y similares. Por otra parte, aglutinantes adecuados, lubricantes, agentes desintegrandes y agentes colorantes también se pueden incorporar en la tableta o cápsula. Los polvos y comprimidos pueden contener aproximadamente 5 a aproximadamente 95% en peso del compuesto derivado de benzotifeno-1,1-dióxido y / o la respectiva sal farmacéuticamente activo como ingrediente activo.

45 [0139] Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, hidratos de carbono naturales, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenoglicol y ceras. Entre los lubricantes adecuados se pueden mencionar el ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, y similares. Los disgregantes adecuados incluyen almidón, metilcelulosa, goma guar, y similares. Agentes edulcorantes y aromatizantes, así como conservantes se pueden incluir también, en su caso. Los disgregantes, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, etc. se discuten en más detalle a continuación.

50 [0140] Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en forma de liberación sostenida para proporcionar la liberación a velocidad controlada de uno cualquiera o más de los componentes o ingredientes activos para optimizar el efecto terapéutico, por ejemplo actividad antihistamínica y similares. Formas de dosificación adecuadas para la liberación sostenida incluyen comprimidos que tiene capas de diferentes velocidades de disgregación o matrices poliméricas de liberación controlada impregnadas con los componentes activos y conformadas en forma de comprimidos o cápsulas que contienen tales matrices poliméricas porosas impregnadas o encapsuladas.

5 [0141] Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Como ejemplo, puede haber soluciones de glicol o agua / propileno para inyecciones parenterales o adición de edulcorantes y opacificantes para soluciones orales, suspensiones y emulsiones. Las preparaciones en forma líquida también pueden incluir soluciones para administración intranasal. Las preparaciones en aerosol adecuadas para la inhalación

10 pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar presentes en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable tal como un gas comprimido inerte, por ejemplo nitrógeno. Para preparar supositorios, una grasa o cera de bajo punto de fusión, como una mezcla de glicerídos de ácidos grasos como manteca de cacao se funde primero, y el ingrediente activo se dispersa homogéneamente en ella a continuación, por ejemplo, por agitación. La mezcla fundida homogénea se vierte entonces en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar, y de ese modo se solidifica.

15 [0142] También se incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a ser convertidas, poco antes del uso, en preparaciones en forma líquida para administración oral o parenteral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

20 [0143] Los compuestos de acuerdo con la presente invención también se pueden administrar por vía transdérmica. Las composiciones transdérmicas pueden tener la forma de una crema, una loción, un aerosol y / o una emulsión y pueden incluirse en un parche transdérmico de tipo matriz o depósito como es conocido en la técnica para este propósito.

25 [0144] La cápsula plazo como el expuesto en el presente documento se refiere a un contenedor específico o recinto hecho por ejemplo, de metil celulosa, alcoholes de polivinilo, o gelatinas desnaturalizadas o almidón para sostener o contener composiciones que comprenden el ingrediente activo (s). Cápsulas con conchas duras se hacen típicamente de mezclado de gelatinas de resistencia relativamente alta de gel de huesos y piel de cerdo. La propia cápsula puede contener pequeñas cantidades de colorantes, agentes opacificantes, plastificantes y / o conservantes. Bajo la tableta una forma de dosificación sólida comprimida o moldeada se entiende que comprende los ingredientes activos con diluyentes adecuados. El comprimido puede prepararse por compresión de mezclas o granulaciones obtenidas por granulación húmeda, granulación seca o por compactación bien conocidos por una persona con experiencia ordinaria en la técnica.

30 [0145] Los geles orales se refieren a los ingredientes activos dispersos o solubilizados en una matriz semisólida hidrófila. Polvos para constitución se refieren a mezclas de polvo que contienen los ingredientes activos y diluyentes adecuados que pueden suspenderse por ejemplo, en agua o en zumo.

35 [0146] Los diluyentes adecuados son sustancias que habitualmente componen la porción principal de la composición o forma de dosificación. Los diluyentes adecuados incluyen carbohidratos tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol, almidones derivados de trigo, maíz, arroz y papa, y celulosas tales como celulosa microcristalina. La cantidad de diluyente en la composición puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 95% en peso de la composición total, preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 75% en peso, y más preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 60% en peso.

40 [0147] El término disgregantes se refiere a materiales añadidos a la composición para ayudar a romperse (desintegrar) y liberar los ingredientes farmacéuticamente activos de un medicamento. Los disgregantes adecuados incluyen almidones, "solubles en agua fría" almidones modificados tales como carboximetil almidón sódico, gomas naturales y sintéticas tales como algarrobo, karaya, guar, tragacanto y agar, derivados de celulosa tales como metilcelulosa y carboximetilcelulosa sódica, celulosas microcristalinas, y cruzada celulosas microcristalinas tales como enlaces croscarmelosa de sodio, alginatos tales como ácido algínico y alginato de sodio, arcillas tales como bentonitas, y mezclas efervescentes. La cantidad de disgregante en la composición puede variar de aproximadamente 2 a aproximadamente 20% en peso de la composición, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10% en peso.

45 [0148] Los aglutinantes son sustancias que se unen o "pegamento" entre sí partículas de polvo y los hacen cohesivos formando gránulos, sirviendo así como el "pegamento" en la formulación. Los aglutinantes añaden fuerza cohesiva ya disponible en el diluyente o agente de aumento de volumen. Los aglutinantes adecuados incluyen carbohidratos tales como sacarosa, almidones derivados del arroz de maíz trigo y patata, gomas naturales tales como acacia, gelatina y tragacanto, derivados de algas tales como ácido algínico, alginato de sodio y alginato de calcio y amonio, materiales de celulosa tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y droxipropilmetilcelulosa hi-, polivinilpirrolidona y compuestos inorgánicos tales como silicato de magnesio y aluminio. La cantidad de aglutinante en la composición puede variar de aproximadamente 2 a aproximadamente 20% en peso de la composición, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10% en peso, y más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 6% en peso.

50 [0149] Los lubricantes se refieren a una clase de sustancias que se añaden a la forma de dosificación para permitir que los gránulos de tabletas etc. después de ser comprimidos para liberar del molde o matriz reduciendo la fricción o desgaste. Los lubricantes adecuados incluyen estearatos metálicos tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de potasio o, ácido esteárico, ceras de alto punto de fusión, y otros lubricantes solubles en agua

tales como cloruro de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, oleato de sodio, glicoles de polietileno y D , L- leucina. Los lubricantes se añaden habitualmente en el último paso antes de la compresión, ya que deben estar presentes en la superficie de los gránulos. La cantidad de lubricante en la composición puede variar de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5% en peso de la composición, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2% en peso, y más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,5% en peso de la composición.

5 [0150] Los deslizantes son materiales que evitan la aglomeración de los componentes de la composición farmacéutica y mejoran las características de flujo del granulado de manera que el flujo es suave y uniforme. Los deslizantes adecuados incluyen dióxido de silicio y talco. La cantidad de deslizante en la composición puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5% en peso de la composición final, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2% en peso.

10 [0151] Los agentes colorantes son excipientes que proporcionan coloración a la composición o la forma de dosificación. Tales excipientes pueden incluir colorantes de calidad alimentaria adsorbidos sobre un adsorbente adecuado tal como arcilla u óxido de aluminio. La cantidad del agente colorante puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5% en peso de la composición, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1% en peso.

15 [0152] Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender además al menos un conjugado de carbohidrato-glicolípido activo de la fórmula general (I).

20 [0153] Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además al menos un agente activo adicional. Se prefiere que este agente activo se seleccione del grupo que consiste en antidepresivos y otras drogas psicotrópicas. Además, se prefiere que el antidepresivo se seleccione de entre amitriptilina, clomipramina amioxide, doxepina, duloxetina, imipramina trimi- pramine, mirtazapina, reboxetina, citalopram, fluoxetina, moclobemida y sertralina.

25 [0154] Una realización adicional de la invención comprende la relación media del antígeno de hidratos de carbono de A a la glicolípido (L-CH-CA) que puede variar entre 1: 4 y 1: 100 (n / n).

30 [0155] Otra realización de la invención comprende los compuestos de la invención, de acuerdo a la fórmula general (I) que puede utilizarse para la preparación de una formulación de vacuna para el uso en la vacunación de un animal. La formulación de vacuna mencionada puede comprender uno o más de los compuestos de la presente invención o una mezcla de diferentes compuestos de la invención y preferiblemente de la fórmula general (I), en el que la mezcla de diferentes compuestos de la fórmula general (I) comprende preferiblemente una mezcla de diferentes serotipos de los hidratos de carbono utilizado antígeno A, y / o la mezcla de diferentes compuestos de la fórmula general (I) puede comprender una mezcla de diferentes hidratos de carbono antígenos A, que se utilizan en diferentes compuestos de la fórmula general (I) . Por consiguiente, la mezcla mencionada de los diferentes compuestos de la fórmula general (I) dentro de la formulación de vacuna puede constituir una combinación de vacunas que pueden ser utilizados por una vacuna combinada contra más de al menos un patógeno.

35 [0156] En una realización adicional de la invención, la formulación de vacuna puede comprender una mezcla de diferentes compuestos de la fórmula general (I).

40 [0157] Las formulaciones de vacunas mencionadas pueden comprender además una combinación con al menos un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente y / o diluyentes.

45 [0158] Los compuestos de la invención de la fórmula general (I) están presentes en dicha formulación de la vacuna en el intervalo de 10 a 1000 mg / g.

50 [0159] En una realización preferida de la invención los compuestos de la fórmula general (I) están presentes en dicha formulación de la vacuna en el intervalo de 10 a 1000 ng / g.

55 [0160] En una realización más preferida de la invención los compuestos de la fórmula general (I) están presentes en dicha formulación de la vacuna en el intervalo de 100 a 1.000 pg / g.

60 [0161] La formulación de vacuna mencionada demuestra una extraordinaria estabilidad a temperatura ambiente debido a la constitución modular de los compuestos de la presente invención, en el que dicha formulación de vacuna puede mantenerse a una temperatura de al menos 25 ° C por un período de por lo menos 3 meses antes de la reconstitución.

65 [0162] En una realización preferida de la invención, el mencionado período es de 6 meses o comprende al menos 12 meses.

65 [0163] Las sorprendentes ventajas de los conjugados de la presente invención fueron encontradas por aplicación in vitro e in vivo.

Específicamente, cuando se aplica en un *in vitro*, la vacuna glicoconjuguado de acuerdo con la presente invención retiene la capacidad de estimular las células iNKT cuando es presentado por las células presentadoras de antígeno CD1d-positivo (APC). Adicionalmente se encontró que los compuestos de la presente invención no consiguen estimular las mismas células iNKT cuando se cargan sobre la placa unida a CD1d recombinante. Sin estar vinculado a la teoría, parece que el resto sacárido está acoplado correctamente y dificulta el reconocimiento de células T.

[0164] Además, cuando se aplica *in vivo* se encontró que los conjugados de la presente invención son capaces de inmunizar de manera efectiva y continua contra un patógeno. Esto es bastante ventajoso puesto que con ello los conjugados de la presente invención no sólo pueden estimular la generación de anticuerpos de títulos elevados y la resistencia de larga duración en condiciones *in vivo*, por otra parte los compuestos de la presente invención en sí mismos exhiben una estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente. Por lo tanto, los conjugados de la presente invención son especialmente estables al calor y por lo tanto no se requiere refrigeración.

Ejemplos

Los métodos generales:

[0165] Las células. Las líneas de APC MOLT-4 (ATCC CRL 1582), que sólo expresa un nivel insignificante de CD1d y CD1d- humano transfectado células C1R y HeLa (C1R-hCD1d y HeLa-hCD1d, respectivamente) [6] se mantuvieron en medio RPMI-1640 que contiene 10 % de FCS, 2 mM L-glutamina, piruvato de sodio 1 mM, 100 mM de aminoácidos no esenciales, y 100 mg / ml kanamicina. Las mismas condiciones de mantenimiento se utilizaron para las células RAW (línea celular de ratón leucémico de macrófagos de monocitos), J774A.1 (ratón BALB / c, monocitos y macrófagos, tumoral no definido), HL60 y NB4 (ambos leucemia humana promielocítica). Aislamiento de clones de células iNKT de PBMC de donantes sanos se ha descrito antes [7]. Células iNKT se mantuvieron en medio RPMI-1640 que contiene 5% HS, 2 mM L-glutamina, piruvato de sodio 1 mM, 100 mM de aminoácidos no esenciales, 100 mg / ml de kanamicina, y 100 U / ml de IL-2 recombinante.

[0166] Los ratones. Ratones C57BL / 6, BALB / cy B6; 129-CD1 <tm1Gru> (CD1 KO) [8] fueron criados en nuestro instituto (Versuchsstätte- la Département Biomedizin, Basilea, Suiza) o C57BL / 6 también fueron comprados de Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania). Este estudio fue revisado y aprobado por el "Kantonales Veterinäramt Basel-Stadt" en Basilea, Suiza.

[0167] Las bacterias. *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4 cepa de referencia (Statens Serum Institute, Dinamarca) se cultivó en caldo de Todd-Hewitt suplementado con extracto de levadura 0,5% a 37°C.

[0168] Infecciones. Ratones no vacunados / se desafiaron con *S. pneumoniae* serotipo 4 y la mortalidad, pérdida de peso y la puntuación clínica se registraron a lo largo del tiempo.

[0169] Opsonizaciones. 5 mM 5-diacetato de clorometilfluoresceína (CMFDA, Invitrogen, Suiza) etiquetado y no fijo o bacterias fijadas se revistieron con 10% complemento de conejo (suministros de alta definición, Reino Unido) y / o mAbs CPS-específicos purificados de hasta 1 h. Bacterias mezcladas con dimetilformamida- (Sigma-Aldrich, Suiza) o células no inducidas en una proporción de 10-100: 1 para un máximo de 2 h a 37 ° C. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo ADP cian (Beckman Coulter, Suiza). Los datos fueron cerrados para excluir las células no viables sobre la base de dispersión de la luz, ancho de pulso, y la incorporación de yoduro de propidio y analizados mediante el software Summit (Beckman Coulter).

[0170] Los ensayos de activación. En los ensayos de presentación de antígeno *in vitro* por APC vivo o moléculas presentadoras de antígenos unidos a la placa se realizaron como se describe anteriormente [9]. Brevemente, APC vivos se colocaron en placas 2,5 x 104 / pocillo en 96 pocillos y se incubaron durante todo el ensayo a 37 ° C con vehículo o de titulación de dosis de αGalCer o vacuna conjugada. Después de 1 h células iNKT humanas (0,5 a 1 x 105 / pocillo) se añadieron. Sobrenadantes de cultivos celulares se recogieron después de 24-48 h y liberación de citocinas se midió por ELISA.

[0171] ELISA. Para la detección de citoquinas humanas, la siguiente captura y el anticuerpo monoclonal purificado de detección biotinilado (mAb) pares (todo BioLegend, San Diego, EE.UU.) se utilizaron: hTNFα (mAb1 1 mg / ml y 0,5 mg MAb11 / ml), hIFNy (MD- 1 2 mg / ml y 0,5 mg 4S.B3 / ml), hIL-4 (8D4-8 1 mg / ml y 0,5 mg MP4-25D2 / ml), hGM-CSF (BVD2-23B6 3,33 mg / ml y BVD2- 21C11 0,5 mg / ml), hIL-8 (JK8-1 1,25 mg / ml y JK8-2 1 mg / ml). Para la detección de citoquinas de ratón, se utilizaron los siguientes pares de mAb (todo Becton Dickinson (BD), Allschwil, Suiza): mIL-2 (JES6-1A12 2 mg / ml y JES6-5H4 1 mg / ml), mIL-4 (11 B11 1 m / ml y BVD6-24G2 1 mg / ml), mIFNy (R4-6A2 2 m / ml y XMG1.2 1 mg / ml). Para la detección de Abs, placas se recubrieron con 1 mg / ml de biotina de cabra anti-ratón (GAM) Ig (BD, 553999) y revelaron con 1: 10'000 HRP marcado GAM-IgG (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza, A0168) o con 1: 1'000 (todo SouthernBiotech, Birmingham, marcado con HRP EE.UU.) GAM-IgM (1020-1005), GAM-IgG1 (1070-05), GAM-IgG2a (1080-1005), GAM-IgG2b (1090-1005), GAM-IgG3 (1100-1105) o recubiertas con 2,5 mg / ml de CPS y reveló con (todo Biolegend) rata biotinilado anti-ratón (RAM) -IgG1 (clon RMG1-1, 1 mg / ml) , -IgG2a (clon RMG2a-62, 1 mg / ml), - IgG2b (clon RMG2b-1, 0,5 mg / ml), -IgG3 (clon RMG3-1,

0,5 mg / ml) o en burro anti-IgM de ratón (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Reino Unido, 0,95 mg / ml) o GAM F (ab') 2 de IgG (Abcam, 0,1 mg / ml) GAM Ig (BD, 2 mg / ml).

[0172] El análisis estadístico. Los datos de supervivencia se compararon con la prueba de Mantel-Cox y Gehan-Breslow-Wilcoxon. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.03). Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0,05$.

[0173] Análisis Químico y Estructural. Todos los productos químicos utilizados fueron de grado reactivo y se utiliza tal como se suministra, excepto donde se indique. Dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), tolueno, diclorometano (CH₂Cl₂) y éter dietílico (Et₂O) fueron adquiridos de JT Baker o VWR International y se purificó mediante un sistema de suministro de disolvente Tainer Ciclo. Piridina, trietilamina (NEt₃) y acetonitrilo (MeCN) se calentaron a refluo sobre hidruro de calcio y destilados. Se separaron por destilación los disolventes para los procedimientos de cromatografía y workup. Las reacciones se realizaron bajo una atmósfera de argón o nitrógeno, excepto cuando se indique. Cromatografía de capa fina analítica se realizó sobre gel de sílice E. Merck 60 F254 placas (0,25 mm). Los compuestos se visualizaron por luz UV a 254 nm y por inmersión de las placas en un molibdato de amonio sulfato de cerio solución (CAM) o una solución de ácido / metanol sulfúrico seguido de calentamiento. La cromatografía líquida se realizó con circulación forzada del disolvente indicado en Fluka gel de sílice 60 (230-400 mesh). 1H NMR espectros se obtuvieron en un Varian VXR-300 (300 MHz), Varian VXR-400 (400 MHz), Bruker DRX500 (500 MHz) y Bruker AV600 (600 MHz) y se presentan en partes por millón (δ) con respecto a la resonancia del disolvente o a TMS (0,00 ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se presentan en Hertz (Hz). 13C NMR espectros se obtuvieron en un Varian VXR-300 (75 MHz), Varian VXR-400 (101 MHz), Bruker DRX500 (125 MHz) y Bruker AV600 (150 MHz) y se informan en δ con respecto a la resonancia del disolvente o para TMS (0,00 ppm). Espectros IR: Medida como solución de CHCl₃ al 1-2% en un espectrofotómetro Perkin-Elmer-782 o puro en un espectrómetro FT-IR de Perkin-Elmer-100. Reciclaje de exclusión por tamaño preparativo HPLC (LC-9.101, Japón Analytical Industry Co.); velocidad de flujo: 3,5 ml / min; disolvente: CHCl₃. Las rotaciones ópticas [α] IDT se midieron en un DIP-370 perimétrico pola- Jasco (10 cm, 1 ml de células); los disolventes y concentraciones (en g / 100 ml) se indican. Los espectros de masas de alta resolución fueron realizados por el servicio MS Libre de Berlín y se les da en m / z.

30 Ejemplo 1

Actividad in vitro de la vacuna conjugada

[0174] La vacuna glicoconjugada (*S. pneumoniae* serotipo 4 CPS acoplado a α GalCer) conserva la capacidad de estimular células iNKT cuando se presenta por las células presentadoras de antígeno CD1d-positivo (APC), pero no consigue estimular las mismas células iNKT cuando cargado en plaquetas unido CD1d recombinante (Figura 3A y 3B, respectivamente). Estos hallazgos indican que el resto sacárido está acoplado correctamente y dificulta el reconocimiento de células T, pero puede ser escindido de la α GalCer estimuladora glicolípido por APC viviente.

40 Ejemplo 2

La actividad in vivo de la vacuna conjugada

[0175] El glyconjugate consiste en CPS tipo 4 acoplado a α GalCer se utilizó para inmunizar de tipo salvaje (WT) C57BL / 6 ratones. Tres inmunizaciones se realizaron con intervalos de 14 días. Estos ratones mostraron altos títulos de Abs anti-polisacárido en comparación con los ratones inmunizados solamente naiive o CPS (Figura 4A) hasta 3 meses después de la última inmunización. Esto aboga en favor de una respuesta duradera Abs por las células B sólo cuando ayudado por las células iNKT α GalCer responsivos.

[0176] La vacuna glyconjugada se utilizó para inmunizar ratones WT C57BL / 6 y CD1d-deficiente (CD1d - / -), CD1KO. Dos inmunizaciones se realizaron con un intervalo de 7 días. Ratones WT mostraron altos títulos de anticuerpos anti-polisacárido (ABS), que en su lugar no se observaron en los ratones con deficiencia de CD1d (Figura 4B), indicando que la expresión de CD1 d es necesaria para el efecto adyuvante como de α GalCer. En conclusión, la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna glicoconjugado es dependiente de la presencia de células iNKT y de CD1d tal como ratones KO CD1d no logran generar títulos elevados de anticuerpos específicos cps- después de la inmunización.

55 Ejemplo 3

Análisis de la respuesta de anticuerpos in vivo después de la vacunación

[0177] Cuando Abs CPS-específicos fueron investigados mediante ELISA utilizando reactivos secundarios de isotipo específico, se detectó la presencia de IgG1 Abs CPS-específica sólo en ratones WT mientras que los ratones CD1 KO fueron incapaces de inducir la IgG1 (Figura 5A). La misma conclusión se confirmó con otros subtipos de IgG. Estos experimentos demuestran que la inmunización con CPS tipo 4 acoplado a α GalCer glyconjugate facilita el cambio de clase de anticuerpos de polisacáridos específicos para todos los isótipos de IgG. Los Abs generados reaccionaron parcialmente con CPS de tipo 2 *S. pneumoniae* (Figura 5B). También podrían reconocer epitopos comunes en CPS de otros serotipos como se detectaron títulos muy altos de inmunoglobulina

total de la evaluación de la reactividad a una mezcla CPS de varios serotipos de *S. pneumoniae* (datos no mostrados).

5 **[0178]** Varios hibridomas que expresan Abs CPS-específicos se establecieron a partir de ratones inmunizados dos veces y se sacrificaron 1,5 meses después del último impulso. Podríamos aislar hibridomas que expresan IgM y todas las subclases de IgG, con la excepción de IgG2b. Los hibridomas IgM-positivos fueron madurados por afinidad (Figura 6).

10 Estos experimentos preliminares demuestran que la inmunización con CPS tipo 4 acoplado a aGalCer glicoconjungado facilita la conmutación de las células-polisacárido B específicas a los isotipos de IgG y / o afinidad de maduración del Abs CPS-específico. Todos los hibridomas derivados de ratones inmunizados glicoconjungados mostraron cambio de clase y la maduración de afinidad. La mutación somática parece un evento frecuente como dos de los hibridomas IgG1 utilizaró el mismo reordenamiento VDJ. Por otra parte varios hibridomas IgM eran idénticos excepto por diversidad de unión por P y N-nucleótidos.

15 15 Estos mAbs se evaluaron por su capacidad para fijar el complemento y mejorar la opsonización por las células fagocíticas. Uso de bacterias marcadas con CMD, encontramos que Abs CPS-específico desinhibió la fagocitosis bacteriana (Figura 7).

20 **Ejemplo 4**

Protección contra la infección con *S. pneumoniae* en un modelo murino

25 25 **[0179]** La inmunización con la vacuna de glicoconjungado protege C57BL / 6 ratones de la infección con *S. pneumoniae*. Tipo 4 ratones vacunados aGal- Cer-CPS muestran la protección a corto y largo plazo para desafiar con *S. pneumoniae* (Figura 8B).

30 Además, los ratones vacunados con aGalCer-CPS tipo 4 sufrieron una enfermedad menos grave que CPS tipo 4 ratones inmunizados solamente como muestra ninguna pérdida de peso después de la infección (Figura 8A, 3 y 3 animales representativos).

30 **Ejemplo 5**

Síntesis de la vacuna conjugada en hidratos de carbono glicolípidos

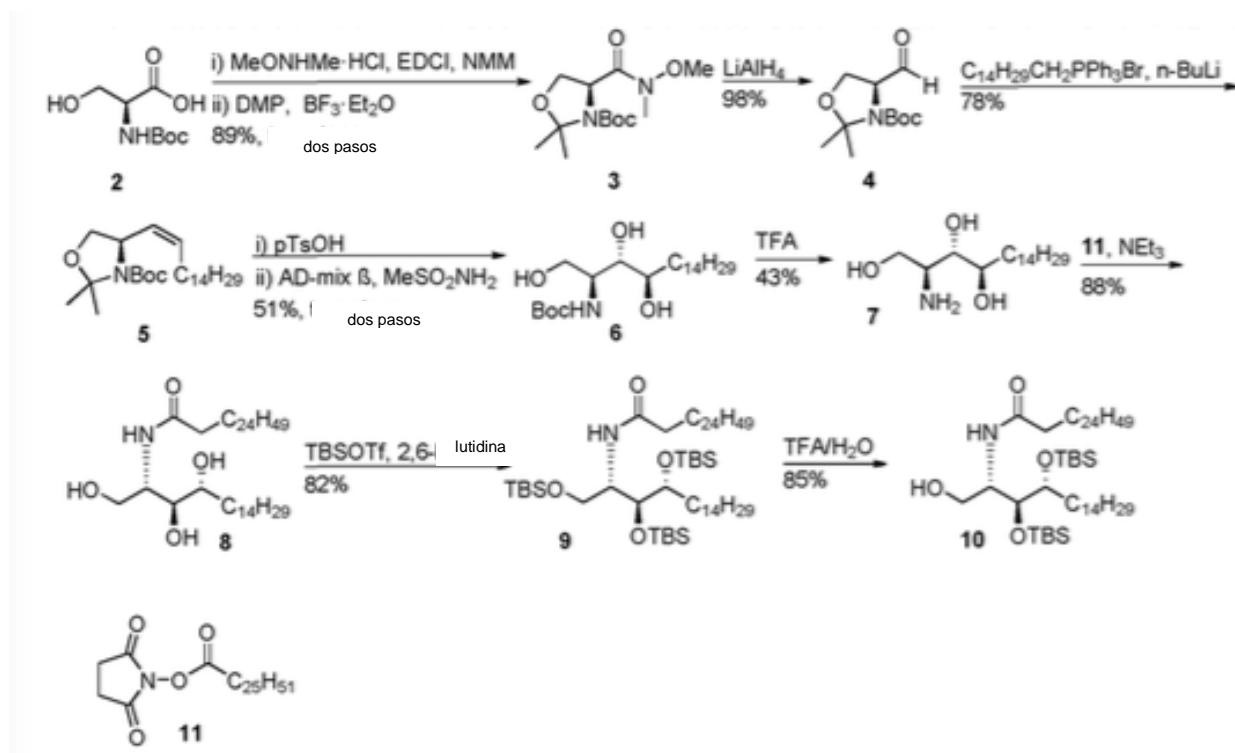
35 35 **[0180]** La síntesis de la porción lipídica de la vacuna conjugada comenzó a usar amida de Weinreb de la N-Boc-L-serina 2 (Esquema 1) que se formó utilizando EDCI como reactivo de acoplamiento, morfolina N-metilo como base, y N, O- hidroxilamina de dimetilo. Formación mezclada de N, O-acetal con 2,2-dimetoxipropano y cantidades catalíticas de BF3 · OEt2 produjo amida 3. Reducción de este último con hidruro de litio y aluminio a 0 C dio como resultado el aldehído de Garner 4. Z-selectivo olefinación de Wittig, usando pentadecyltriphenylphosphonio iluro produjo el alqueno 5. La eliminación del grupo acetal en olefina 5 fue seguida por la dihidroxilación asimétrica de Sharpless con β mezcla AD y metilsulfonamida, el suministro de N-Boc protegido diol 6 con un buen rendimiento y selectividad. La eliminación subsiguiente del grupo carbamato produjo fitoescfingosina 7. Formación de enlace de amida se realizó con hexacosanoico N-hidroxi éster de succinimidilo 11 y trietilamina como base, para producir 8. La adición de TBSOTf y 2,6-lutidina produjo trisilil éter 9. El éter de sililo en entonces el grupo hidroxilo primario se eliminó selectivamente con HCl ac. TFA para dar ceramida acceptor 10. [2]

50

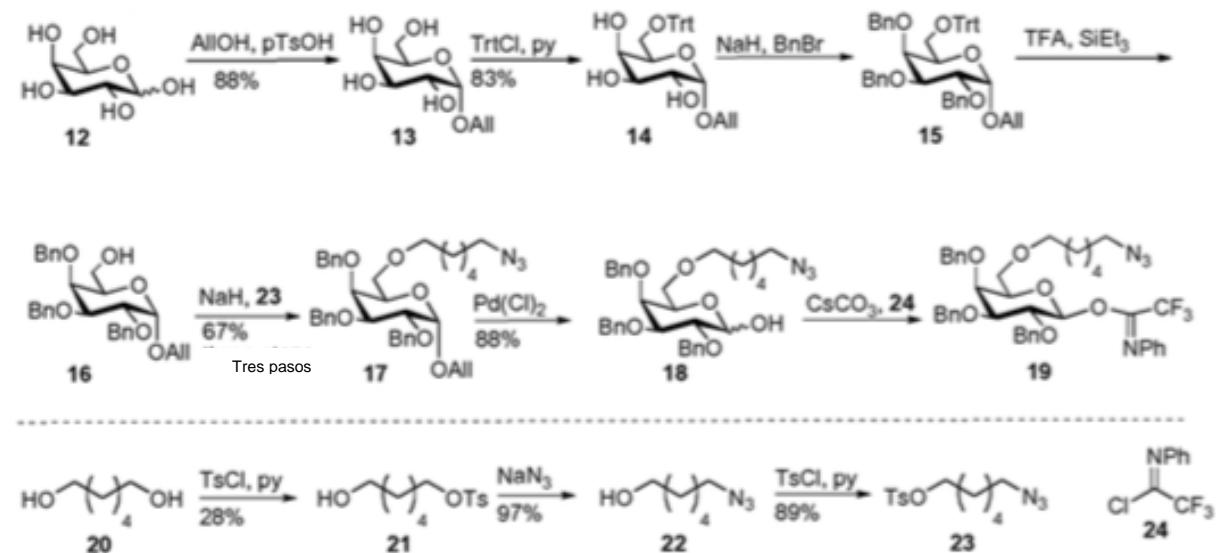
55

60

65



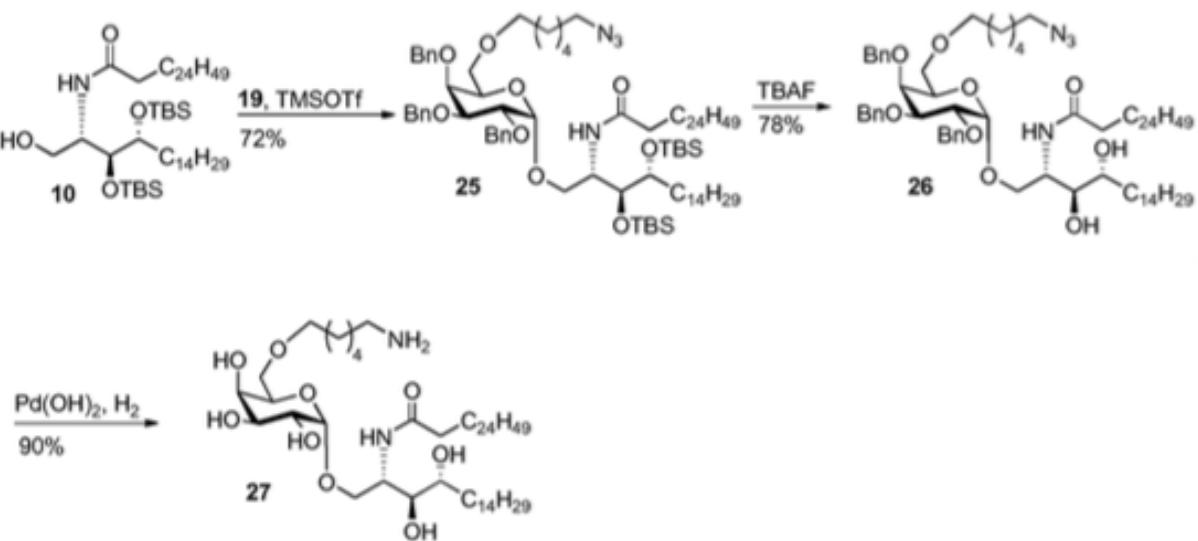
5 Esquema 1. Síntesis de lípido 10. [1,2,3,4]



10 [0181] Glicosidación de Ácido p-toluenosulfónico Fischer catalizada de galactosa 12 con alcohol alílico produjo glucósido 13 (Esquema 2). [5] La tritilación posterior del grupo hidroxilo C6 primaria produjo triol 14. Formación del bencíl de éter con hidróxido sódico y bromuro de bencíl proporcionó la galactosa completamente protegido 15. El grupo tritilo se eliminó posteriormente con ácido trifluoroacético y trietilsilano para liberar el grupo hidroxilo C6 para mayor funcionalización. Esterificación de Williamson de alcohol 16 y azida 23 utilizando hidróxido sódico produjo derivado 17. Isomerización catalítica del grupo protector de alilo anomérico en el correspondiente éter de enol con paladio (II) cloruro y posterior hidrólisis produjo lactol 18 que se convirtió en glicosilo imidato 19 con carbonato de cesio y cloruro de N-fenil trifluoroacetamida 24.

[0182] El enlazador 23 se preparó partiendo de 1,6-hexanodiol 20 que se hizo reaccionar con cloruro de tosilo para producir una mezcla del correspondiente monoproducto y diproducto tosilado junto con el material de partida. Después de la separación, el grupo tosilo de 21 fue desplazado por azida sódica para producir la azida 22. Tosilación posterior del grupo hidroxilo en 22 dio el tosilato 23.

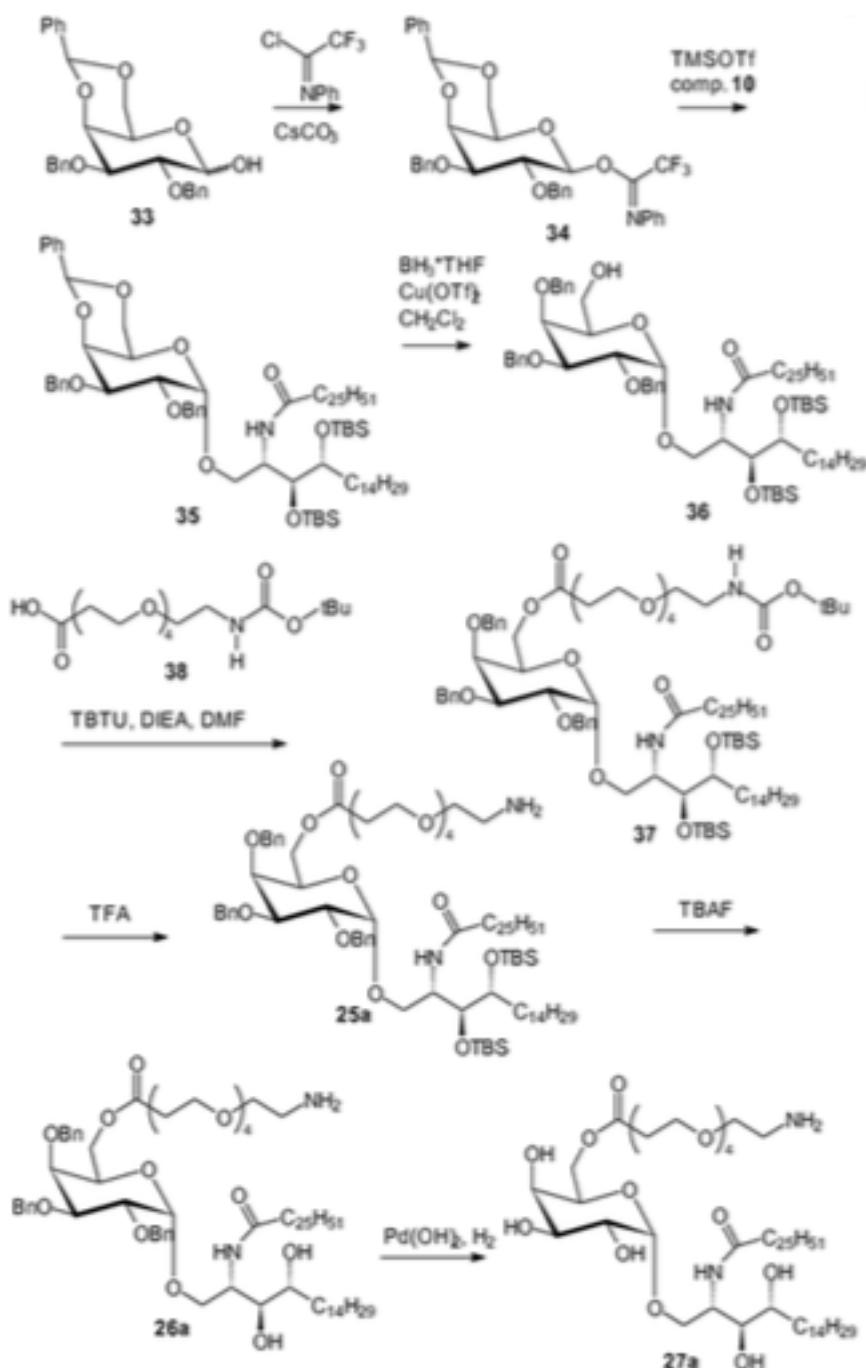
5



Esquema 3. Síntesis de glicolípido de enlazador 27

[0183] Glucolípido 25 equipado de enlazador (Esquema 3) se obtuvo a través de la glicosilación catalizada por TMSOTf del bloque galactoso 19 y ceramida 10. La reacción procedió en rendimiento del 72% y con total selectividad α . La eliminación del éter de sililo con grupos protectores de TBAF produjo diol 26 que fue convertido en 27 mediante hidrogenólisis con un catalizador de *Perlman*.

10

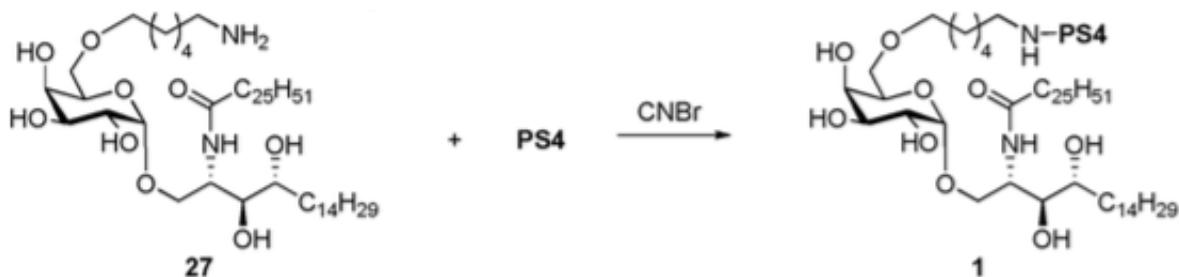


Esquema 3. Síntesis alternativa de glicolípido 27a equipado de enlazador

El glicolípido 36 se preparó en tres etapas a partir del compuesto conocido 33, haciendo reaccionar el compuesto activado 34 con derivados de los compuestos 10 por la glicosilación por encima de TMSOTf catalizado de bloque de construcción galactosa. Después de desprotección del compuesto 35 el enlazador fue introducido por reacción de condensación con el compuesto 38 con rendimientos moderados. El glicolípido 27a equipado de enlazador posteriormente se preparó a través de los intermedios 25a y 26a de la desprotección completa del compuesto 37 equipado de enlazador.

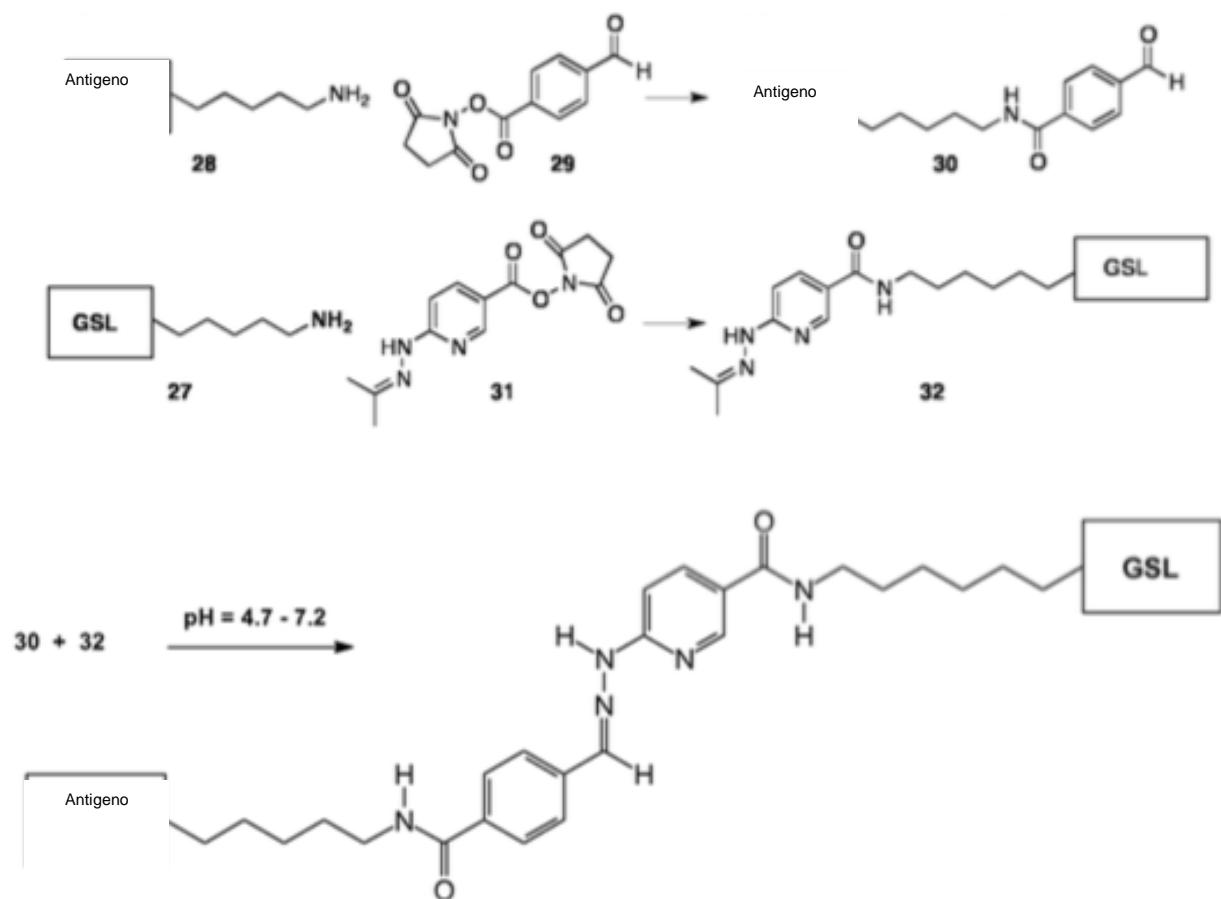
10

[0184] La conjugación del polisacárido al glicolípido 27 se llevó a cabo a través de un enlace covalente. Para este fin, el PS4 final fue activado con bromuro de cianógeno al que se añadió 27 para dar el conjugado 1 (Esquema 4).



Esquema 4. Conjugación del glicolídio 27 al PS4

[0185] Un enlace de hidrazona proporciona un método de conjugación alternativa para vincular la fracción epítopa con el glicolípida. Con este fin un enlace hidrazona se puede utilizar (Esquema 5). El antígeno 28 tiene que ser modificado para aldehído aromático 30 utilizando NHS-éster 29 y GSL 27 será convertido a hidrazona 32 utilizando NHS-éster 31. El acoplamiento del aldehído 30 y hidrazona 32 se produce a un pH de 4,7 a 7,2. El sistema enlazador está comercialmente disponible de Novabiochem (HydraLink TM).



10 Esquema 5. Conjugación del antígeno 28, equipado de enlazador de amina con glicolípido 27 a través de enlazamiento de hidrazona.

Procedimientos experimentales

15 **(S)-3-(terc-butoxicarbonil)-N-metoxi-2,2, N-trimetiloxazolidina-4-carboxamida (3)**

[0186] A una solución de L-Boc-serina 2 (12,33 g, 60,1 mmol) en CH₂Cl₂ (240 ml) se añadieron hidrocloruro de N, O-dimetilhidroxilamina (6,04 g, 61,9 mmol) y N-metilmorfolina (6,8 ml, 61,9 mmol) a 0 ° C. A esta solución se añadió N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida (11,86 g, 61,9 mmol) en porciones durante un período de 20 min. y la solución se agitó durante otra 1 h. Entonces, aq. solución de HCl se añadió (1,0 M, 30 ml) y la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución sat. aq. solución de NaHCO₃ (30 ml) y la capa acuosa se extrajo de nuevo con CH₂Cl₂ (100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a vacío para obtener la amida de Weinreb correspondiente (14,07

g, 94%) como un sólido blanco. $R_f = 0,3$ (EtOAc); 1H RMN (250 MHz, CDCl3) δ 5,60 (d, $J = 6,0$ Hz, 1 H), 4,77 (br s, 1 H), 1,42 (s, 9 H), 3,80 (d, $J = 3,3$ Hz, 2 H), 3,76 (s, 3 H), 3,21 (s, 3 H), 2,66 (br s, 1 H). El producto bruto se disolvió en acetona (180 ml) al que se añadieron 2,2-dimetoxipropano (57 ml) y BF3 · Et2O (0,5 ml). La solución naranja se agitó durante 90 min. a t.a. y luego se apagó con Et3N (1,2 ml) y los disolventes se retiraron al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc / ciclohexano = 1: 2 → 1: 1) para producir amida isopropilideno-protégida de Weinreb 3 (15,32 g, 89% en dos etapas) como un sólido blanco. Los espectros de RMN consisten en dos conjuntos de señales debido a la presencia de rotámeros. $[\alpha]_{D}^{25} = -30,9$ ($C = 1$, CHCl3); $R_f = 0,45$ (hexanos / EtOAc = 1: 1); IR (película) ν_{max} 2976, 2938, 1702, 1682, 1364, 1167, 1098, 998, 848, 768, 716; 1H RMN (250 MHz, CDCl3) δ 4,77 (dd, $J = 9,8, 2,8$ Hz, 1 H), 4,70 (dd, 7,5, 3,8, Hz, 1 H), 4,18 (dd, $J = 7,5, 4,0$ Hz, 1 H), 4,15 (dd, $J = 7,8, 3,8$ Hz, 1 H), 3,95 (dd, $J = 9,3, 3,0$ Hz, 1 H), 3,91 (dd, $J = 9,0, 3,5$ Hz), 3,72 (s, 3 H), 3,68 (s, 3 H), 3,19 (s, 6 H), 1,68 (s, 3 H), 1,66 (s, 3 H), 1,54 (s, 3 H), 1,50 (s, 3 H), 1,47 (s, 9 H), 1,39 (s, 9 H); 13C RMN (101 MHz, CDCl3) δ 171,4, 170,7, 152,2, 151,4, 95,1, 94,5, 80,6, 80,0, 66,2, 66,0, 61,3, 61,3, 57,9, 57,8, 28,5, 28,4, 25,8, 25,5, 24,8, 24,6; HR ESI Calculado para C13H24N2O5 [M + Na +]: 311.1577 encontró: 311.1582.

15 **terc-butilo (S) -4-formil-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de metilo (4)**

[0187] A una solución de amida de Weinreb 3 (8,00 g, 27,7 mmol) en THF (100 ml) a 0 ° C se añadieron LiAlH4 (1,0 M en THF, 13,9 ml, 13,9 mmol) gota a gota y la solución se agitó durante 1 hora a 0 ° C. Después de 1 h, la solución se enfrió a -10 ° C y KHSO4 (1 M, 70 ml) se añadió cuidadosamente y la solución se diluyó con Et2O (170 ml). La mezcla se dejó calentar a t.a. y se agitó durante 30 min. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO4, se filtró y el disolvente se eliminó *in vacuo* para dar el aldehído de Garner 4 como un aceite de color amarillo pálido (6,24 g, > 95% de pureza mediante 1H RMN). Los espectros de RMN consisten en dos conjuntos de señales debido a la presencia de rotámeros. 1H RMN (250 MHz, CDCl3) δ 9,58 (d, $J = 0,8$ Hz, 1 H), 9,52 (d, $J = 2,5$ Hz, 1 H), 4,32 (m, 1 H), 4,16 (m, 1 H), 4,06 (m, 4 H), 1,53-1,63 (m, 12 H), 1,49 (s, 9 H), 1,40 (s, 9 H). El producto en bruto se usó en la reacción posterior sin purificación adicional.

(4R, 1'Z)-3-(terc-butoxicarbonil) -2,2-dimetil-4-(1'-hexadecenil) oxazolidina (5)

[0188] n-BuLi (1,6 M en hexano, 25,2 ml, 40,3 mmol) se añadió gota a gota a bromuro de pentadeciltrifenilfosfonio (24,03 g, 43,4 mmol) en THF anhídrico (220 ml) a 78 ° C. La solución naranja resultante se dejó calentar a 0 ° C y se agitó durante otros 30 min. Después, la solución se enfrió a -78 ° C y el aldehído 4 (6,23 g, 27,2 mmol) de Garner en THF anhídrico (30 ml) se añadió lentamente. Después de agitar durante 2 h a t.a., la reacción se diluyó con una solución sat. aq. Solución de NH4Cl (35 ml) y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con CH2Cl2 (3 x 35 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con una solución sat. aq. Solución de NaCl (50 ml), se secó sobre MgSO4 y se concentró al vacío. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida sobre sílice (EtOAc / hexanos = 1: 2) dio gel (Z) olefina 5 como un aceite amarillo pálido (11,27 g, 78%). $[\alpha]_{D}^{25} = 45,2$ ($C = 1$, CHCl3); $R_f = 0,40$ (EtOAc / hexanos = 1: 2); IR (película) ν_{max} 2923, 2854, 1699, 1457, 1382, 1251, 1175, 1093, 1056, 850, 768 cm-1; 1H RMN (250 MHz, CDCl3) δ 5,27-5,40 (m, 2 H), 4,58 (br s, 1 H), 4,02 (dd, $J = 6,3, 8,8$ Hz, 1 H), 3,61 (dd, $J = 3,3, 8,5$ Hz, 1 H), 1,96 (s br, 2 H), 1,23-1,56 (m, 39 H), 0,85 (t, $J = 7$ Hz, 3 H); 13C RMN (101 MHz, CDCl3) δ 152,1, 130,9, 130,4, 94,1, 79,8, 69,2, 54,7, 32,1, 29,9, 29,8, 29,8, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,4, 28,6, 28,6, 27,6, 22,8, 14,2; HR ESI Calculado para C26H49NO3 [M + Na +]: 446.3605 encontró: 446.3614. Todos los datos espectrales se encontraban en buen acuerdo con los datos reportados. [4]

[0189] La deseada (Z) olefina se puede distinguir fácilmente de la no deseada (E) subproducto de olefina, al considerar los protones olefínicos en el espectro de RMN de 1H: Z-5 1H RMN (250 MHz, CDCl3) δ 4,05 (dd, $J = 6,3, 8,6$ Hz, 1H), 3,64 (dd, $J = 3,3, 8,6$ Hz, 1 H) cf. E-5 1H RMN (250 MHz, CDCl3) δ 4,01 (dd, $J = 6,1, 8,7$ Hz, 1 H), 3,71 (dd, $J = 2,1, 8,7$ Hz, 1 H).

50 **Bromuro de Pentadeciltrifenilfosfonio**

[0190] Una solución de 1-bromopentadecano (30,0 g, 103 mmol) y trifenilfosfina (27,02 g, 103 mmol) en MeCN (200 ml) se calentó a reflujo a 80 ° C durante cinco días. Después de la eliminación del disolvente a vacío, Et2O (30 ml) se añadió y el precipitado blanco resultante se separó por filtración, se lavó con Et2O y se secó en alto vacío durante 24 h para dar bromuro de pentadeciltrifenoilfosfonio (49,66 g, 87%) como un polvo blanco.

(2R, 3Z) -2- (terc-butoxicarbonil) amino-3-octadecen-1-ol (5b)

[0191] Para-toluensulfónico de ácido (371 mg, 1,95 mmol) se añadió a una solución agitada de (Z) olefina 5 (5,00 g, 12,2 mmol) en MeOH / agua (50 ml en total, ratio = 9: 1 v / v) y la mezcla se agitó durante 68 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío para dar un sólido blanco, que se volvió a disolver en CH2Cl2 (100 ml). La solución se lavó con salmuera (30 ml), se secó sobre MgSO4 y el disolvente se eliminó a vacío. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de ciclohexano / EtOAc = 4: 1 → 2: 1) proporcionó el alcohol 5b como un sólido blanco (2,71 g, 59%). Todos los datos espectrales se encontraban en buen acuerdo con los datos reportados.

(2S, 3S, 4R) -2- (terc-butoxicarbonil) amino-1,3,4-octadecanetriol (6)

[0192] Alcohol 5b (1,50 g, 3,91 mmol) se disolvió en t-BuOH / agua (38 ml en total, 1 ratio: 1) y metanosulfonamida (371 mg, 3,91 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió AD-mix-β (5,48 g). La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 41 h y otro 7 h a t.a., después se inactivó mediante la adición de Na2SO3 sólido (6,0 g) y se dejó en agitación durante 30 min. La extracción con EtOAc (3 x 40 ml) seguido. Los extractos orgánicos se lavaron con NaOH (1 M, 20 ml), agua (20 ml) y se sentó. aq. Solución de NaCl (20 ml), se secó sobre MgSO4 y los disolventes se eliminaron a vacío. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc / ciclohexano = 1: 1 → 2: 1) proporcionó 6 triol como un sólido blanco (1,05 g, 64%).

Fitoesfingosina (7)

[0193] Triol 6 (60 mg, 0,14 mmol) se disolvió en TFA (0,6 ml) y se agitó a rt durante 30 min. La solución se diluyó con CH2Cl2 (1,5 ml) y después se neutralizó cuidadosamente (pH ~ 8 a) con una solución sat. aq. Solución de NaHCO3 (10 ml) sobre la cual la precipitación de un sólido de color blanco Occurred. El sólido blanco separó por filtración, se lavó con agua (3 x 10 ml) y se secó bajo presión reducida. La recristalización en MeCN dio fitoesfingosina 7 como un polvo blanco (20 mg, 43%).

Ceramida (8)

[0194] A una solución de fitoesfingosina 7 (15 mg, 0,047 mmol) en THF anhídrico (1 ml) se añadió ácido hexacosanoico succinimidil éster 11 (34 mg, 0,071 mmol) y Et3N (24 ml, 0,14 mmol). La solución se calentó a 50 °C y se agitó durante 20 h. Se añadió EtOAc (5 ml) y la suspensión resultante se centrifugó (30 min., 3000 rpm). El precipitado blanco se separó por filtración y se secó bajo presión reducida para dar la amida 8 (29 mg, 88%).

Hexacosanoico N-hidroxisuccinimidil éster (11)

[0195] A una solución de ácido hexacosanoico (121 mg, 0,304 mmol) en CH2Cl2 (4 ml) se añadieron 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (0,058 ml, 0,33 mmol) y N-hidroxisuccinimidil éster (42 mg, 0,37 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, se agitó durante 3 h y después se inactivó con agua (4 ml). La solución se diluyó con Et2O (8 ml) y se separaron las dos capas. La fase acuosa se extrajo con Et2O (8 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa sat. Solución de NaCl (5 ml), se secó sobre MgSO4 y se filtró. Después de la eliminación del disolvente a vacío, éster de N-hidroxisuccinimidil 11 se obtuvo como un sólido blanco (85 mg, 57%).

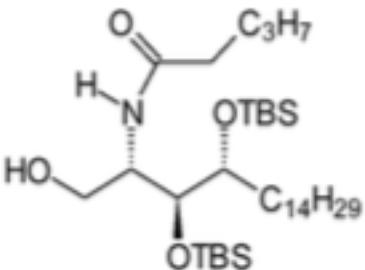
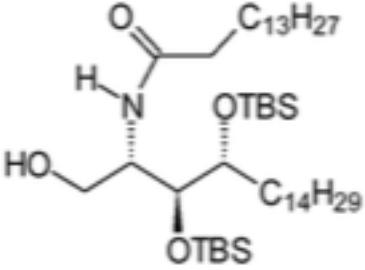
(2S, 3S, 4R) -1,3,4-tri-t-butil-dimetilsiloxi-2-hexacosanoilamino-1-octadecano (9)

[0196] A una suspensión agitada de la amida 8 (25 mg, 0,036 mmol) en CH2Cl2 (1,2 ml) se le añadió TBSOTf (43 ml, 0,18 mmol) y 2,6-lutidina (65 mL, 0,054 mmol) a 0 °C . La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2 h. La reacción se inactivó con MeOH (0,2 ml). La mezcla se diluyó con Et2O (2 ml) y se lavó con una solución sat. aq. Solución de NaHCO3 (1 ml) y se sentó. aq. Solución de NaCl (1 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO4, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (ciclohexano / Et2O = 15: 1) para dar TBS protegida ceramida 9 como un aceite incoloro (27 mg, 71%).

(2S, 3S, 4R) -3,4-bis-terc-butildimetilsiloxi-2-hexacosanoilamino-4-octadecanol (10)

[0197] A una solución de ceramida 9 (90 mg, 0,087 mmol) en THF (2 ml) se añadió TFA (40 ml, 0,519 mmol) en agua (0,5 ml, 27,8 mmol) a -10 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a 10 °C durante un período de 2 h. A continuación, la mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de solución sat. aq. Se alcanzó una solución de NaHCO3 hasta pH neutro. La mezcla resultante se diluyó con Et2O (10 ml), se lavó con agua (10 ml), se sentó. aq. NaHCO3 (10 ml), se sentó. aq. Solución de NaCl (10 ml), y se secó sobre MgSO4. El disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto se purificó por columna ultrarrápida cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc / ciclohexano = 10: 1 → 5: 1) para dar el alcohol 10 (68 mg, 85%) como un aceite incoloro . [α] Dr.t. = -11,6 (C = 1, CHCl3); Rf = 0,3 (ciclohexano / EtOAc = 4: 1); IR (película) v_{max} 3285, 2920, 2851, 1645, 1465, 1253, 1034, 835, 776, 721, 680 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl3) δ 6,27 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 4,21 (dd, J = 11,3, 3,0 Hz, 1 H), 4,06 (td, J = 6,5, 3,2 Hz, 1 H), 3,91 (t, J = 2,8 Hz, 1 H), 3,76 (td, J = 6,4, 2,6 Hz, 1 H), 3,59 (dd, J = 11,3, 3,7 Hz, 1 H), 2,24 - 2,14 (m, 2H), 1,69-1,45 (m, 4H), 1,45 - 1,16 (m, 68H), 0,92 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,87 (t, J = 6,9 Hz, 6H), 0,11 (s, 6H), 0,08 (s, 6H); 13C RMN (126 MHz, CDCl3) δ 172,8, 77,6, 76,6, 63,8, 51,4, 37,1, 34,6, 32,1, 30,0, 29,9, 29,8, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 26,2, 26,1, 26,0, 25,8, 22,8, 18,3 , 18,3, 14,3, -3,6, -3,9, -4,4, -4,8; HR ESI Calculado para C56H117NO4Si2 [M + Na +]: 924.8594 encontró: 924.8604.

[0198] De acuerdo con el procedimiento sintético para el compuesto 10 partiendo del compuesto 2 derivados 10a a 10o se prepararon en consecuencia utilizando los respectivos bromuros de trifenilfosfonio en la reacción del compuesto 4 en el compuesto 5 y los correspondientes compuestos 11 en la conversión de compuestos 7 a compuestos 8 :

comp.	Estructura	Masa espec.
10a		$C_{35}H_{75}NO_4Si_2$ Calc.: 631.1544 [M+H ⁺] encontrado : 631.1521
10b		$C_{45}H_{95}NO_4Si_2$ Calc.: 771.4206 [M+H ⁺] encontrado : 771.4181

comp.	Estructura	Masa espec.
10i		$C_{48}H_{101}NO_4Si_2$ Calc.: 813.5004 [M+H ⁺] encontrado 813.4962
10j		$C_{50}H_{97}NO_4Si_2$ Calc.: 833.4901 [M+H ⁺] encontrado 833.4913
10k		$C_{33}H_{67}NO_4Si_2$ Calc.: 671.1338 [M+H ⁺] encontrado 671.1306
10l		$C_{34}H_{69}NO_4Si_2$ Calc.: 611.14000 [M+H ⁺] encontrado 611.1403
10m		$C_{37}H_{103}NO_4Si_2$ Calc.: 823.6129 [M+H ⁺] encontrado 823.6097
10n		$C_{49}H_{95}NO_4Si_2$ Calc.: 783.4313 [M+H ⁺] encontrado 783.4281
10o		$C_{51}H_{105}NO_4Si_2$ Calc.: 869.5638 [M+H ⁺] encontrado 869.5604

1-O- Alquilo α -D galactopiranosida (13)

[0199] A una suspensión agitada de D-galactosa 12 (22,2 g, 123 mmol) en alcohol de alilo (250 ml) se añadió ácido paratoluenosulfónico - (2,3 g, 12,09 mmol). La mezcla se calentó a 100 ° C y se agitó durante 24 h después de lo cual se enfrió a ta y se inactivó por la adición de NEt₃. El disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto se co-evaporó dos veces con tolueno y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de CH₂Cl₂ / MeOH = 9: 1 → 4: 1). La recristalización a partir de EtOAc produjo galactósido 13 (22,2 g, 88%) como un sólido blanco.

10

1-O-alil-6-O- α -tritilo D-galactopiranosida (14)

[0200] Se disolvió galactósido 13 1-O-alil (4 g, 18,2 mmol) en piridina (18 ml). A la solución se añadió cloruro de tritilo (6,58 g, 23,6 mmol) y la mezcla se agitó a ta para 18 h después de lo cual el disolvente se eliminó a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (CH₂Cl₂ / MeOH = 10: 1)

para dar piranósido 14 (7,0 g, 83%) como un aceite incoloro. [α] Dr.t. = 60,0 (c = 1, CHCl₃); R_f = 0.8 (CH₂Cl₂ / MeOH = 5: 1); IR (película) *v*_{max} 3402, 2929, 1491, 1449, 1218, 1152, 1070, 1032, 746, 703 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,51-7,18 (m, 15H), 5,99-5,88 (m, 1 H), 5,25 (ddq, J = 35,9, 10,4, 1,4 Hz, 2H), 4,95 (d, J = 3,8 Hz, 1 H), 4,25 (ddt, J = 12,8, 5,4, 1,4 Hz, 1 H), 4,05 (ddt, J = 12,8, 6,3, 1,3 Hz, 1H), 3,96 (s, 1H), 3,89 (t, J = 5,8 Hz, 1 H), 3,81 (d, J = 5,7 Hz, 1 H), 3,75 (d, J = 9,8 Hz, 1 H), 3,47 (s, 1 H), 3,43 (dd, J = 9,8, 6,1 Hz, 1 H), 3,32 (dd, J = 9,8, 5,3 Hz, 1 H), 2,86 (d, J = 2,1 Hz, 1 H), 2,71 (d, J = 8,1 Hz, 1 H); 13C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 143,8, 133,7, 128,6, 127,8, 127,1, 117,8, 97,5, 86,9, 71,2, 69,8, 69,5, 69,5, 68,5, 63,3; HR ESI Calculado para C₂₅H₂₅O₅ [M + Na⁺]: 485.1935 encontró: 485.1941.

10 **1-O-alil-2,3,4-O-α-tritilo D-galactopiranósido-tri-O-bencil-6 (15)**

[0201] A una solución de galactopiranósida 14 alilo 6-O-tilit-α / β-D- (3,7 g, 8,0 mmol) en DMF (32 ml) se añadió hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 1,50 g, 36,0 mmol) en porciones a t.a. Después de 1 h bromuro de bencilo (4,2 ml, 35,2 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 48 h después de lo cual se inactivó mediante la adición de MeOH (5 ml). La mezcla se diluyó con Et₂O y se extrajo dos veces a partir sat. aq. NaHCO₃. La capa orgánica combinada se lavó con agua (3 x 100 ml) y se sentó. aq. Solución de NaCl y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto fue sobre un tapón de gel de sílice (hexanos / EtOAc = 2: 1, gel de sílice se neutralizó con 1% NEt₃) para dar el bencil éter 15 (5,5 g) como un aceite de color amarillo pálido que se utilizó en la etapa posterior sin purificación adicional.

20 **1-O-alil 2,3,4-tri-O-bencil-α-D-galactopiranósido (16)**

[0202] Una solución de alilo 2,3,4-tri-O-bencil-6-O-tilit-α-D-galactopiranósido 15 (5,00 g, 6,82 mmol) y trietilsilano (5,45 ml, 34,1 mmol) en CH₂Cl₂ (68 ml) se enfrió a 0 ° C. A la solución agitada se añadió ácido trifluoroacético (2,6 ml, 34,1 mmol) gota a gota. La mezcla se inactivó después de 15 min. con solución sat. aq. de NaHCO₃ y se extrajo con CH₂Cl₂. El producto bruto se filtró sobre un tapón de gel de sílice. Todos los residuos de silano y tritilo se retiraron con 10: 1 hexanos / EtOAc y el producto se eluyó con EtOAc para dar 16 (3,0 g) como un aceite de color amarillo pálido que se usó sin purificación adicional en la reacción posterior.

30 **1-O- Galactopiranosida alil 6- (6'-azidohexyl) 2,3,4-tri-O-bencil-α-D (17)**

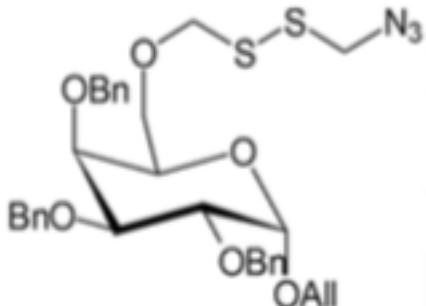
[0203] A una solución de galactopiranosida 16 alilo 2,3,4-tri-O-bencil-α-D (1,0 g, 2,04 mmol) en DMF (10 ml) se añadió hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 0,12 g, 3,1 mmol) a 0 ° C. Después de 15 min, la mezcla se calentó a t.a. y se agitó durante otra 1 h. Después, se añadió 6-azidohexyl 4-metilbencenosulfonato 23 (0,9 g, 3,1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a t.a durante otras 8 h después de lo cual la mezcla se inactivó mediante la adición de MeOH (2 ml). Después de la dilución con CH₂Cl₂, se sentó. aq. Se añadió solución de NH₄Cl y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x). La capa orgánica combinada se lavó con agua y se sentó. aq. Solución de NaCl. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se eliminó el disolvente a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente hex Anes / EtOAc = 1: 0 → 1: 1) para dar la azida 17 (1,0 g, 68% en tres pasos) como un aceite incoloro. [α] Dr.t. = 25,4 (c = 1, CHCl₃); R_f = 0,65 (hexanos / EtOAc = 4: 1); IR (película) *v*_{max} 2933, 2863, 2094, 1497, 1454, 1358, 1177, 1098, 1059, 926, 816, 736, 697 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,94 - 7,16 (m, 15H), 5,95 (dddd, J = 17,1, 10,3, 6,6, 5,2 Hz, 1 H), 5,31 (dq, J = 17,2, 1,6 Hz, 1 H), 5,21 (ddd, J = 10,3, 2,8, 1,1 Hz, 1 H), 5,01 - 4,58 (m, 7H), 4,17 (ddt, J = 13,0, 5,2, 1,4 Hz, 1 H), 4,09 - 3,99 (m, 3H), 3,98 - 3,90 (m, 2H), 3,50 - 3,18 (m, 6H), 1,72 - 1,47 (m, 4H), 1,44 - 1,30 (m, 4H); 13C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 138,9, 138,8, 138,6, 134,0, 129,8, 128,3, 128,3, 128,2, 128,1, 128,0, 127,9, 127,6, 127,5, 127,4, 117,9, 96,3, 79,1, 76,5, 75,3, 74,7, 73,3, 73,3, 71,3, 70,3, 69,5, 69,4, 68,2, 51,4, 51,2, 29,6, 28,8, 28,7, 28,6, 26,6, 26,1, 25,7, 25,0, 21,6. HR ESI Calculado para C₃₆H₄₅N₃O₆ [M + Na⁺]: 638,3201 encontró: 638,3229.

50 [0204] Los compuestos siguientes se prepararon de acuerdo con el procedimiento sintético anterior con los correspondientes compuestos 23 en moderados a altos rendimientos:

comp.	Estructura	Masa espec.
17a		$C_{38}H_{50}N_3O_9$ Calc.: 693.8278 [M+H ⁺] encontrado : 693.8241
17b		$C_{36}H_{46}N_3O_6$ Calc.: 617.7764 [M+H ⁺] encontrado : 617.7721
17c		$C_{34}H_{42}N_3O_6$ Calc.: 589.7231 [M+H ⁺] encontrado : 589.7274
17d		$C_{42}H_{58}N_3O_6$ Calc.: 701.9361 [M+H ⁺] encontrado 701.9400
17e		$C_{38}H_{50}N_3S_2O_6$ Calc.: 709.9618 [M+H ⁺] encontrado 709.9651

comp. Estructura

17f

Masa
espec.
 $C_{32}H_{38}N_3S_2O_6$
 Calc.: 625.8021 [M+H⁺]

encontrado : 625.7996

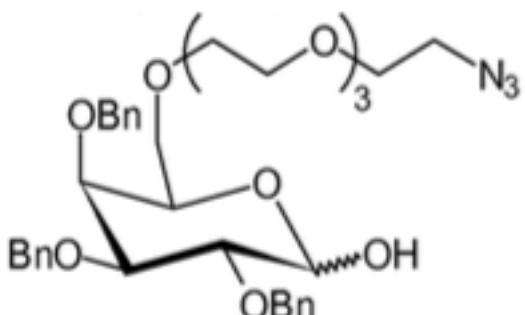
Galactopiranosa 6- (6'-Azidohexilo) 2,3,4-tri-O-bencil- α / β -D- (18)

[0205] Galactopiranósido de alilo 6- (6'-azidohexilo) 2,3,4-tri-O-bencil- α -D- 17 (1,4 g, 2,3 mmol) se disolvió en MeOH (16 ml) y PdCl₂ (0,21. Se añadió g, 1,17 mmol) a la solución a rt. La mezcla se agitó a 4 h después de lo cual la mezcla se filtró sobre celite y el disolvente se eliminó a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna flash (gradiente de hexanos / EtOAc = 1: 0 → 1: 1) para dar lactol 18 (1,2 g, 88%) como un aceite incoloro. R_f = 0,50 (hexanos / EtOAc = 2: 1); IR (película) ν_{max} 3414, 2933, 2862, 2093, 1454, 1255, 1060, 910, 733, 696 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45 - 7,20 (m, 30H), 5,33 - 5,27 (m, 1 H), 5,01 - 4,90 (m, 3H), 4,85 - 4,71 (m, 7H), 4,66 (ddd, J = 16,7, 11,5, 6,0 Hz, 3H), 4,18 - 4,09 (m, 1 H), 4,05 (dd, J = 9,2, 3,6 Hz, 1 H), 3,96 (s, 2H), 3,93 (d, J = 2,8 Hz, 1 H), 3,88 (d, J = 2,8 Hz, 1 H), 3,78 (dd, J = 9,6, 7,5 Hz, 1 H), 3,63 - 3,52 (m, 3H), 3,52 - 3,37 (m, 5H), 3,37 - 3,28 (m, 2H), 3,28 - 3,21 (m, 5H), 1,65 - 1,49 (m, 8H), 1,42 - 1,24 (m, 8H); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 138,8, 138,7, 138,5, 138,4, 128,5, 128,5, 128,4, 128,3, 128,3, 128,3, 128,3, 128,1, 127,9, 127,7, 127,7, 127,7, 127,6, 127,6, 97,9, 92,0, 82,3, 80,9, 78,8, 76,7, 75,2, 74,9, 74,8, 74,7, 73,8, 73,7, 73,6, 73,1, 73,1, 71,5, 71,4, 69,6, 69,6, 69,5, 51,5, 29,5, 28,9, 26,6, 25,8; HR ESI Calculado para C₃₃H₄₁N₃O₆ [M + Na⁺]: 598.2883 encontró: 598.2869.

[0206] Los compuestos siguientes se prepararon de acuerdo con el procedimiento sintético anterior con los correspondientes compuestos 17 en buenos rendimientos medios:

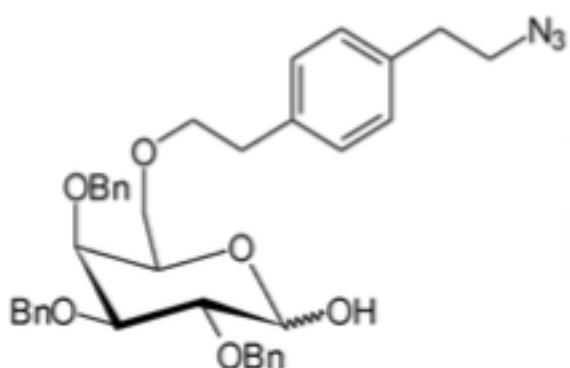
comp.
18a

Estructura

Masa
espec.

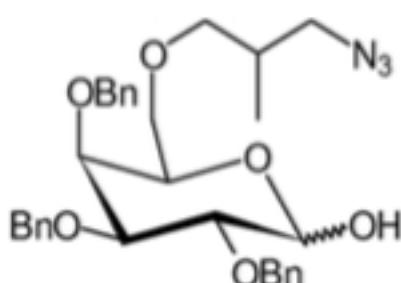
$C_{35}H_{46}N_3O_9$
Calc.: 653.7638 $[M+H^+]$
encontrado : 653.7601

18b



$C_{33}H_{42}N_3O_6$
Calc.: 577.7124 $[M+H^+]$
encontrado : 577.7193

18c



$C_{31}H_{38}N_3O_6$
Calc.: 549.6592 $[M+H^+]$
encontrado : 549.6556

comp.	Estructura	Masa espec.
18d		$C_{39}H_{54}N_3O_6$ Calc.: 661.8721 [M+H ⁺] encontrado : 661.8791
18e		$C_{35}H_{46}N_3S_2O_6$ Calc.: 669.8978 [M+H ⁺] encontrado 669.9003
18f		$C_{29}H_{34}N_3S_2O_6$ Calc.: 585.7381 [M+H ⁺] encontrado : 585.7323

Galactopyranosil de N-fenil-trifluoro acetimidato (19) 6- (6'-Azidohexyl) 2,3,4-tri-O-bencil - β -D-

[0207] A una solución de 6- (6'-azidohexyl) 2,3,4-tri-O-bencil- α / β -D-galactopyranosa 18 (400 mg, 0,70 mmol) en CH₂Cl₂ (7 ml) se añadió cesio de carbonato (340 mg, 1,04 mmol). A la mezcla se añadió cloruro de 2,2,2-trifluoro-N-phenylacetimidoyl 24 (216 mg, 1,04 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a t a durante 3,5 h, después de lo cual se filtró sobre celite y se lavó con CH₂Cl₂. El disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 10: 1 → 1: 1) para producir el imidato 19 (490 mg, 94%) como un aceite incoloro. [α] D t.a. = 60,8 (c = 0,4, CHCl₃); R_f = 0,80 (hexanos / EtOAc = 2: 1); IR (película) v_{max} 3064, 2934, 2865, 2094, 1717, 1598, 1454, 1321, 1207, 1099, 1027, 910, 734, 696 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45 - 6,60 (m, 20H), 5,56 (s, 1 H), 4,90 (d, J = 11,5 Hz, 1 H), 4,75 (s, J = 1,5 Hz, 2H), 4,68 (s, J = 12,4 Hz, 2H), 4,58 (d, J = 11,6 Hz, 1 H), 4,00 (t, J = 8,7 Hz, 1 H), 3,84 (d, J = 2,4 Hz, 1 H), 3,58 - 3,39 (m, 4H), 3,34 (dt, J = 9,3, 6,5 Hz, 1 H), 3,23 (dt, J = 9,3, 6,5 Hz, 1 H), 3,14 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 1,52 - 1,38 (m, 4H), 1,32 - 1,16 (m, 4H); 13C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 138,6, 138,3, 138,2, 128,8, 128,6, 128,5, 128,4, 128,4, 128,3, 128,0, 127,9, 127,8, 127,7, 124,3, 119,4, 82,3, 78,3, 77,4, 77,2, 76,8, 75,7, 74,9, 74,6, 73,4, 73,2, 71,4, 68,7, 51,5, 29,7, 28,9, 26,7, 25,8; HR ESI Calculado para C₄₁H₄₅F₃N₄O₆ [M + Na⁺]: 769.3183 encontró: 769.3239.

[0208] Los compuestos siguientes se prepararon de acuerdo con el procedimiento sintético anterior con los correspondientes compuestos 18 en promedio moderados a buenos rendimientos:

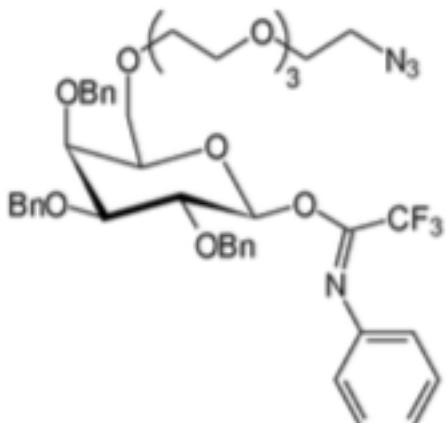
20

25

30

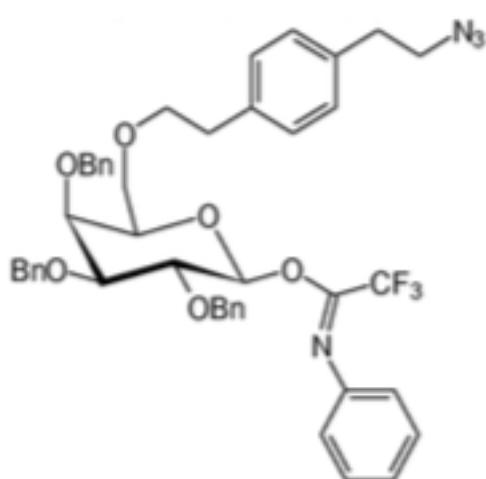
comp.
19a

Estructura



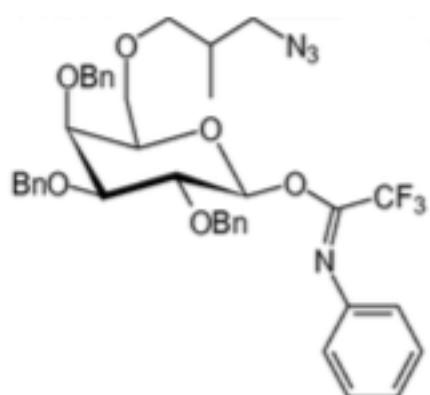
Masa
espec.
 $C_{43}H_{50}F_3N_4O_9$
Calc.: 824.8834 $[M+H^+]$
encontrado : 824.8804

19b



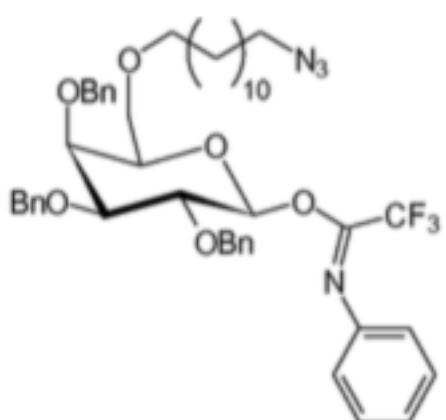
$C_{41}H_{46}F_3N_4O_6$
Calc.: 748.8320 $[M+H^+]$
encontrado : 748.8299

19c



$C_{39}H_{42}F_3N_4O_6$
Calc.: 720.7788 $[M+H^+]$
encontrado : 720.7712

19d



$C_{47}H_{58}F_3N_4O_6$
Calc.: 832.9917 $[M+H^+]$
encontrado : 832.9977

comp.	Estructura	Masa espec.
19e		$C_{43}H_{50}F_3N_4S_2O_6$ Calc.: 841.0174 [M+H ⁺] encontrado 841.0108
19f		$C_{37}H_{38}F_3N_4S_2O_6$ Calc.: 756.8577 [M+H ⁺] encontrado 756.8506

Metilbencenosulfonato 6-hidroxihexil 4- (21)

[0209] A una solución de hexano-1,6-diol 20 (10,0 g, 85 mmol) en CH₂Cl₂ (200 ml) se añadió 4-metilbenceno-1-cloruro de sulfonilo (17,8 g, 93 mmol) disuelto en piridina (100 ml) a 5 °C gota a gota durante 15 min. La mezcla de reacción se calentó a t.a. durante el período de 5 h. Los disolventes se eliminaron a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 1: 0 → 1: 1) para dar hexanodiol monotosylated 21 (6,5 g, 28%) como un aceite incoloro. R_f = 0,55 (hexanos / EtOAc = 1: 1); IR (película) v_{max} 3381, 2935, 2862, 1598, 1461, 1352, 1172, 959, 921, 813, 661 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,76 - 7,71 (m, 2H), 7,29 (dt, J = 4,3, 1,2 Hz, 2H), 3,97 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 3,55 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,40 (s, 3H), 1,65 - 1,56 (m, 2H), 1,55 (s, 1 H), 1,52 - 1,41 (m, 2H), 1,36-1,18 (m, 4H); 13C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 144,7, 133,1, 129,8, 127,8, 70,5, 62,6, 32,4, 28,7, 25,1, 25,0, 21,6; HR ESI Calculado para C₁₃H₂₀O₄S [M + Na⁺]: 295.0975 encontró: 295.0968.

6-Azidohexan-1-ol (22)

[0210] Metilbencenosulfonato 6-hidroxihexil 4- 21 (4,3 g, 15,79 mmol) se disolvió en DMF (23 ml) y azida de sodio (1,75 g, 26,8 mmol) se añadió. La mezcla se calentó a 55 °C y después de 16 h, se enfrió a t.a. y se diluyó con agua (150 ml). La mezcla se extrajo tres veces con CH₂Cl₂ y se lavó con una solución sat. aq. Solución de NaCl. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y los disolventes se eliminaron a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 1: 0 → 1: 1) para dar 6-azidohexan 1-ol 22 (2,2 g, 97%) como un aceite incoloro. R_f = 0,50 (hexanos / EtOAc = 2: 1); IR (película) v_{max} 3329, 2935, 2891, 2090, 1256, 1349, 1258, 1055, 910, 731 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,63 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 3,25 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 1,64 - 1,51 (m, 4H), 1,43 - 1,32 (m, 4H); 13C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 62,8, 51,5, 32,6, 28,9, 26,6, 25,4; HR ESI Calculado para C₆H₁₃N₃O [M + Na⁺]: 166.0951 encontró: 166.0945.

6-Azidohexyl 4-metilbencenosulfonato (23)

[0211] A una solución de 6-azidohexan-1-ol 22 (2,7 g, 18,9 mmol) en piridina (70 ml) se añadió cloruro de 4-metilbenceno-sulfonilo 1- (4,0 g, 21,0 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 5 h a t.a. después de lo cual el disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto se disolvió en CH₂Cl₂, se lavó con agua y se secó sobre MgSO₄. Los disolventes se eliminó a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 1: 0 → 1: 1) para proporcionar la azida 23 (5,0 g, 89%)

25

30

como un aceite incoloro. $R_f = 0,50$ (hexanos / EtOAc = 3: 1); IR (película) ν_{max} 2938, 2863, 2092, 1598, 1455, 1356, 1258, 1174, 1097, 956, 919, 813, 724, 662 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 7,85 - 7,67 (m, 2H), 7,33 (dd, $J = 8,5, 0,6$ Hz, 2H), 4,01 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,21 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 2,43 (s, 3H), 1,71 - 1,57 (m, 2H), 1,52 (dd, $J = 9,1, 4,9$ Hz, 2H), 1,38 - 1,12 (m, 4H); 13C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 144,8, 133,2, 129,9, 127,9, 70,4, 51,3, 28,7, 28,7, 26,1, 25,0, 21,7; HR ESI Calculado para C₁₃H₁₉N₃O₃S [M + Na⁺]: 320,1045 encontró: 320,1057.

[0212] De acuerdo con la ruta sintética que se ha indicado anteriormente para los compuestos 20 a compuestos 23 diversos materiales de partida se han ensayado con éxito y convertirse en compuestos correspondientes 23. Para estas síntesis tetraetilenglicol se compró en Merck, Alemania; 2- (4- (2-hidroxiet-1-il) fenil), etanol se adquirió en Sigma Aldrich; 2-metil-1,3-propanol fue comprado en Sigma Aldrich; dodecandiol fue comprado en Sigma Aldrich; 2-bis-1,3- Methylpropane (2-hidroxyethylsulfide) se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en US2012 / 0295228.

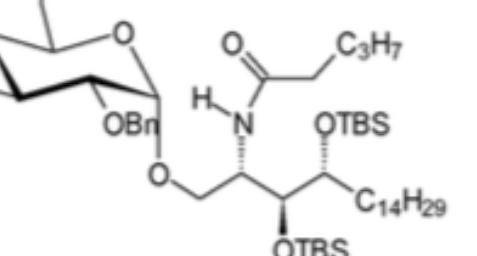
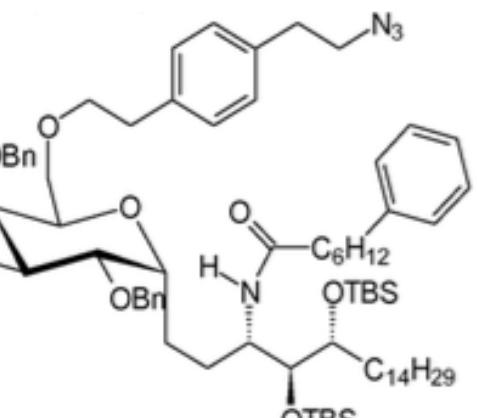
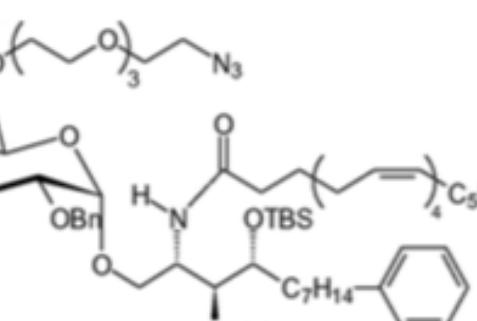
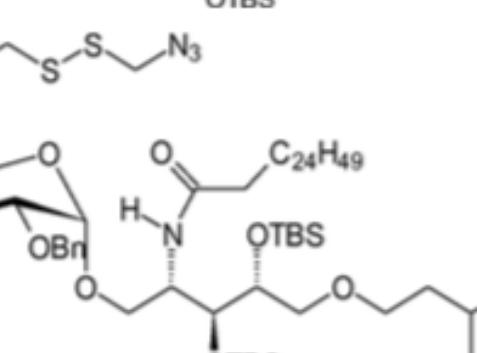
comp.	Estructura	Masa espec.
23a		C ₁₅ H ₂₃ N ₃ SO ₆ Calc.: 374,4344 [M+H ⁺] encontrado 374,4388
23b		C ₁₇ H ₁₉ N ₃ SO ₃ Calc.: 346,4259 [M+H ⁺] encontrado 346,4212
23c		C ₁₁ H ₁₅ N ₃ SO ₃ Calc.: 270,3297 [M+H ⁺] encontrado 270,3229
23d		C ₁₉ H ₃₁ N ₃ SO ₃ Calc.: 382,5426 [M+H ⁺] encontrado 382,5461
23e		C ₁₅ H ₂₃ N ₃ S ₃ O ₃ Calc.: 390,5683 [M+H ⁺] encontrado 390,5662
23f		C ₉ H ₁₁ N ₃ S ₃ O ₃ Calc.: 306,4086 [M+H ⁺] encontrado 306,4041

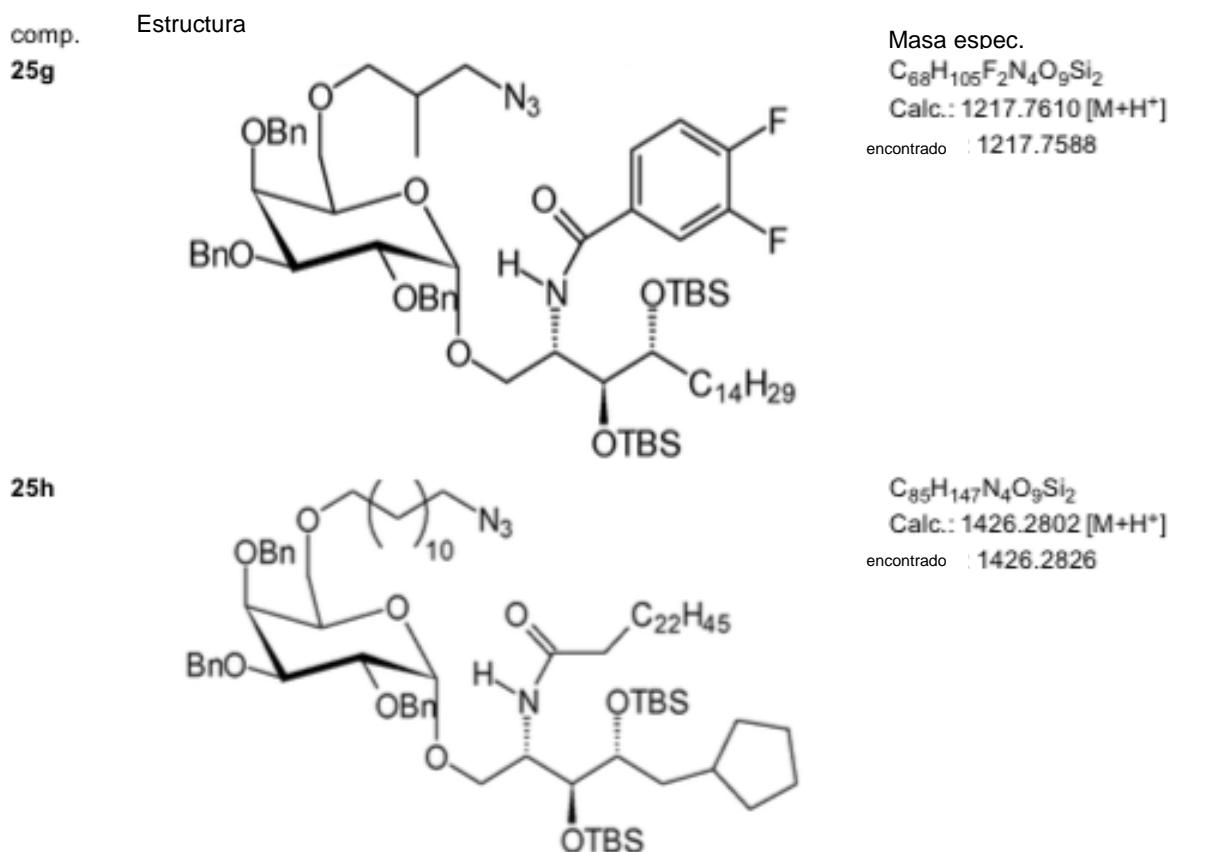
(2S,3S,4R)-3,4-Bis-tert-butildimethylsilioxi-2-hexacosanoilamino-1-(6-(6'-azidohexil)-2,3,4-tri-O-benzil)- α -galactopiranosil (25)

D-

[0213] El nucleófilo 10 (156 mg, 0,169 mmol) y glicosilar agente 19 (189 mg, 0,253 mmol) se co-evaporó con tolueno tres veces y se secó en alto vacío durante 3 h después de lo cual se disolvieron en Et₂O (2 ml) y THF (0,4 ml) y se enfrió a - 40 ° C. A la mezcla se añadió TMSOTf (9,0 ml, 0,051 mmol) y la solución se calentó a -10 ° C durante el período de 3 h. La reacción se inactivó mediante la adición de NEt₃ (0,05 ml) y los disolventes se eliminaron a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 10: 1 → 4: 1) para dar glicósido 25 (180 mg, 72% α -anómero) como una espuma blanca. $[\alpha]$ Dr.t. = + 18,9 (c = 1, CHCl₃); $R_f = 0,46$ (hex anes / EtOAc = 6,5: 1); IR (película) ν_{max} 3328, 2925, 2854, 2096, 1731, 1656, 1452, 1348, 1246, 1156, 1099, 1058, 835, 777, 696 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,64 - 7,09 (m, 15H), 6,07 (d, $J = 7,1$ Hz, 1 H), 4,94 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H), 4,82 (d, $J = 3,7$ Hz, 1 H), 4,80 - 4,56 (m, 5H), 4,09 (td, $J = 7,6, 4,2$ Hz, 1 H), 4,03 (dd, $J = 10,1, 3,6$ Hz, 1 H), 3,97 - 3,85 (m, 5H), 3,82 (dd, $J = 10,9, 8,2$ Hz, 1 H), 3,66 - 3,61 (m, 1 H), 3,50 - 3,42 (m, 1 H), 3,38 (ddd, $J = 13,6, 8,1, 6,2$ Hz, 2H), 3,29 (dt, $J = 9,4, 6,8$ Hz, 1 H), 3,22 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 1,99 (dd, $J = 16,6, 9,2$ Hz, 2H), 1,60 - 1,45 (m, 8H), 1,39 - 1,15 (m, 70H), 0,91 - 0,84 (m, 26H), 0,06 (s, 3H), 0,05 (s, 3H), 0,02 (s, 6H). 13C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 173,2, 138,6, 138,5, 138,0, 128,6, 128,6, 128,4, 128,3, 128,3, 128,1, 127,8, 127,8, 127,6, 99,3, 79,5, 76,4, 76,2, 74,9, 74,6, 74,4, 73,5, 72,9, 71,56, 70,1, 70,0, 69,4, 51,5, 49,6, 36,9, 33,5, 32,1, 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,5, 28,9, 26,7, 26,1, 25,9, 25,9, 22,8, 14,3; HR ESI Calculado para C₈₉H₁₅₆N₄O₉Si₂ [M + Na⁺]: 1505,1333 encontró: 1505,1388.

[0214] Los compuestos abajo de 25c-h se prepararon de acuerdo con el procedimiento sintético anterior con los correspondientes compuestos 10 y 19 en promedio moderados a buenos rendimientos:

comp.	Estructura	Masa espec.
25c		$C_{70}H_{119}N_4O_9S_2Si_2$ Calc.: 1282.0290 [M+H ⁺] encontrado 1282.0317
25d		$C_{76}H_{123}N_4O_9Si_2$ Calc.: 1293.9930 [M+H ⁺] encontrado 1293.9903
25e		$C_{84}H_{131}N_4O_{12}Si_2$ Calc.: 1446.1406 [M+H ⁺] encontrado 1446.1458
25f		$C_{80}H_{137}N_4O_{10}S_2Si_2$ Calc.: 1436.2787 [M+H ⁺] encontrado 1436.2744

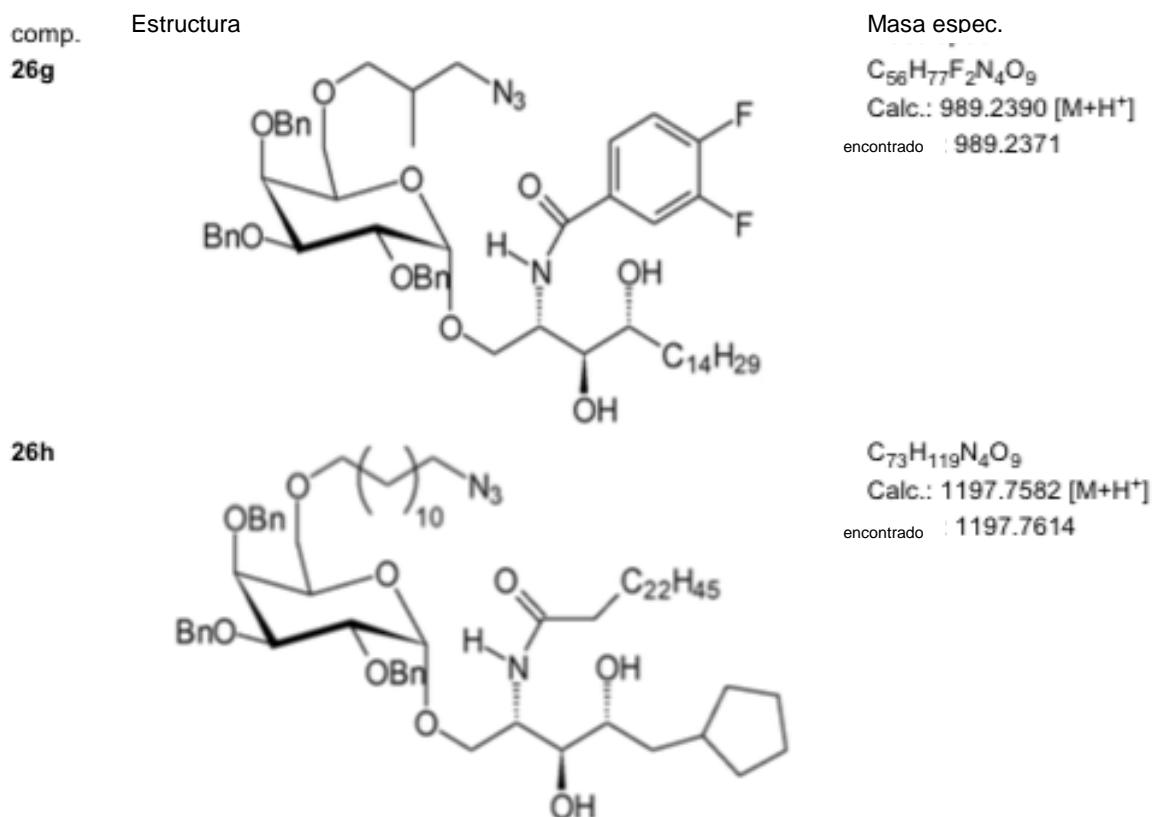


(2S,3S,4R)-2-Hexacosanoilamina-1-(6-(6'-azidohexyl)-2,3,4-tri-O-bencil- α -D-galactopyranosyl)octadecano-3,4-diol (26)

5 [0215] A una solución de éter 25 bis-TBS (16,0 mg, 10,8 mmol) en THF (1 ml) se añadió una solución de TBAF (1 M en THF, 0,150 mL, 0,15 mmol) lentamente. Después de 3,5 h la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (10 ml). Los disolventes se eliminaron a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 1: 0 → 1: 1) para proporcionar diol 26 (10,5 mg, 78%) como un aceite claro. [α] Dr.t. = 121,9 (c = 0,2, CHCl₃); R_f = 0,40 (hexanos / EtOAc = 2: 1); IR (película) v_{max} 3329, 2919, 2851, 2096, 1640, 1543, 1467, 1455, 1350, 1094, 1046, 907, 730, 696 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,58 - 7,08 (m, 15H), 6,37 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 4,94 (d, J = 11,4 Hz, 1 H), 4,88 (d, J = 11,6 Hz, 1 H), 4,85 (d, J = 3,8 Hz, 1 H), 4,82 - 4,73 (m, 2H), 4,68 (d, J = 11,6 Hz, 1 H), 4,60 (d, J = 11,5 Hz, 1 H), 4,22 (dq, J = 6,8, 3,3 Hz, 1 H), 4,05 (dd, J = 10,0, 3,8 Hz, 1 H), 3,95 (d, J = 1,8 Hz, 1 H), 3,88 (d, J = 2,7 Hz, 2H), 3,87 - 3,75 (m, 2H), 3,55 - 3,36 (m, 5H), 3,31 (dt, J = 9,4, 6,7 Hz, 1 H), 3,25 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 2,20 - 2,11 (m, 3H), 1,70 - 1,44 (m, 8H), 1,41 - 1,17 (m, 73H), 0,88 (t, J = 6,9 Hz, 6H); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 173,2, 138,6, 138,5, 130,0, 128,6, 128,6, 128,4, 128,3, 128,2, 128,1, 127,8, 127,8, 127,6, 99,3, 79,5, 76,4, 76,2, 74,9, 74,6, 74,4, 73,5, 72,9, 71,6, 70,1, 70,0, 69,4, 51,5, 49,6, 36,9, 33,5, 32,1, 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,6, 29,5, 29,5, 28,9, 26,7, 26,1, 25,9, 25,9, 22,8, 14,3; HR ESI Calculado para C₇₇H₁₂₈N₄O₉ [M + Na⁺]: 1275.9574 encontró: 1275.9536.

10 [0216] Los compuestos abajo de 26c-h se prepararon de acuerdo con el procedimiento sintético anterior para el compuesto 26 en promedio moderados a buenos rendimientos:

comp.	Estructura	Masa espec.
26c		$C_{58}H_{91}N_4O_9S_2$ Calc.: 1053.5070 [M+H ⁺] encontrado 1053.5046
26d		$C_{64}H_{95}N_4O_9$ Calc.: 1065.4710 [M+H ⁺] encontrado 1065.4677
26e		$C_{72}H_{103}N_4O_{12}$ Calc.: 1217.6187 [M+H ⁺] encontrado 1217.6203
26f		$C_{68}H_{109}N_4O_{10}S_2$ Calc.: 1207.7567 [M+H ⁺] encontrado 1207.7532

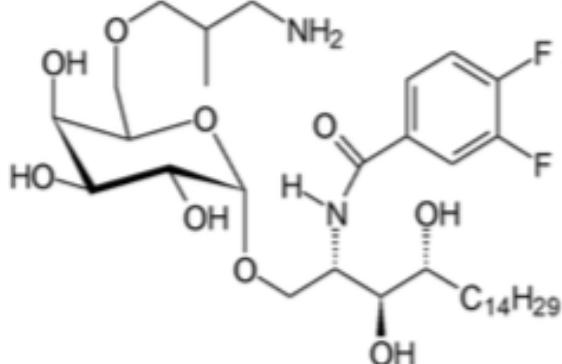


(2S, 3S, 4R) -1- (6- (6'-aminohexil) - α -D-galactopiranosil) -2-hexacosanoylaminoctadecano-3,4-diol (27)

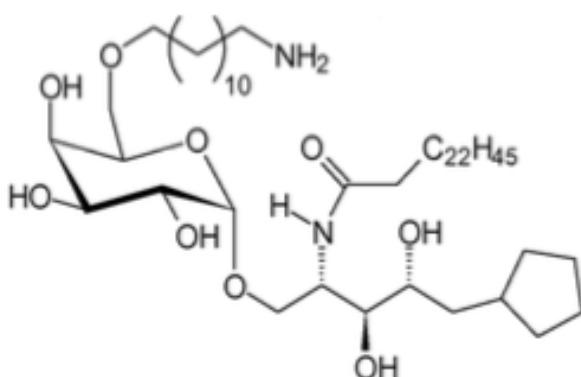
[0217] A una solución de diol 26 (55 mg, 0,044 mmol) en EtOH (0,5 ml) y cloroformo (0,15 ml) se añadió Pd (OH) 2 en carbón (10% w / w, mojado 38 mg). La solución se agitó a t.a. bajo una atmósfera de Ar durante 15 min. después de lo cual el gas H₂ se insertó en la suspensión y la mezcla se hidrogenó durante 12 h. La mezcla se filtró sobre celite y se lavó a fondo con CH₂Cl₂, THF y MeOH. Los disolventes se eliminaron a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice de sílice (CH₂Cl₂ / MeOH = 4: 1) para dar enlazador equipado GSL 27 (38 mg, 90%) como un polvo de color amarillo pálido. [α]_Dt. = 66,1 (c = 1,0, piridina); R_f = 0,44 (CH₂Cl₂ / MeOH = 4: 1); IR (película) v_{max} 3292, 2918, 2850, 1640, 1539, 1468, 1304, 1073, 1038, 970, 721cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, d-pyr) δ 8,66 (d, J = 8,6 Hz, 1 H), 5,48 (d, J = 3,8 Hz, 1 H), 4,59 (dd, J = 10,6, 5,9 Hz, 1 H), 4,49 (dd, J = 9,7, 3,8 Hz, 1 H), 4,39 - 4,15 (m, 1 H), 3,91 (ddd, J = 15,3, 10,4, 5,9 Hz, 1 H), 3,74 (q, J = 7,0 Hz, 1 H), 3,44 - 3,31 (m, 2H), 3,17 (dd, J = 13,1, 5,2 Hz, 2H), 2,42 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,17 (s, 1 H), 1,89 (s, 2H), 1,84 - 1,65 (m, 4H), 1,65 - 0,97 (m, 75H), 0,75 (t, J = 6,7 Hz, 6H); 13C RMN (101 MHz, d-pyr) δ 171,9, 99,7, 75,5, 70,9, 70,1, 70,0, 69,6, 68,7, 66,7, 55,9, 49,9, 38,4, 35,4, 33,1, 30,7, 30,7, 29,0, 28,8, 28,6, 28,6, 28,6, 28,5, 28,4, 28,4, 28,2, 28,2, 26,8, 25,3, 25,1, 25,1, 24,7, 21,5, 17,8, 12,9; HR ESI Calculado para C₅₆H₁₁₂N₂O₉ [M + H⁺]: 957.8441 encontró: 957.8468.

[0218] Los compuestos abajo de 26c-h se prepararon de acuerdo con el procedimiento sintético anteriormente para el compuesto 27 en promedio moderados a buenos rendimientos:

comp. 27c	Estructura		Masa espec. $C_{37}H_{75}N_2O_9S_2$ Calc.: 757.1410 [M+H ⁺] encontrado 757.1437
27d			$C_{43}H_{79}N_2O_9$ Calc.: 769.1050 [M+H ⁺] encontrado 769.1078
27e			$C_{51}H_{87}N_2O_{12}$ Calc.: 921.2527 [M+H ⁺] encontrado 921.2500
27f			$C_{47}H_{93}N_2O_{10}S_2$ Calc.: 911.3907 [M+H ⁺] encontrado 911.3934

comp. Estructura
27gMasa espec.
 $C_{35}H_{61}F_2N_2O_9$
Calc.: 692.8730 [M+H⁺]
encontrado 692.8707

27h

 $C_{52}H_{103}N_2O_9$
Calc.: 901.3922 [M+H⁺]
encontrado 901.3958

[0219] Se preparó 2,3-Di-O-bencil-4,6-O-bencilideno-D-galactosa (33) de acuerdo con ChemBioChem 2012, 1.349.

2,3-di-O-bencil-4,6-O-bencilideno- α -D-galactosil trifluoroacetimidato (34)

[0220] A una solución de 2,3-Di-O-bencil-4,6-O-bencilideno-D-galactosa (800 mg, 1,786 mmol, coevaporó 3 veces con tolueno seco) 33 en CH₂Cl₂ (7 ml) se añadió (867 mg, 2,65 mmol). A la mezcla se añadió cloruro de 2,2,2-trifluoro-N-phenylacetimidoyl 24 (551 mg, 2,65 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a ta durante la noche después de lo cual se filtró sobre celite y se lavó con CH₂Cl₂. El disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 8: 1 → 1: 1) para producir el imidato 34 (1,02 g, 92%) como un aceite incoloro. HR ESI Calculado para C₃₅H₃₂F₃NO₆ [M + H⁺]: 620.6362 encontró: 620.6327.

(2S,3S,4R)-3,4-Bis-tert-butildimethylsiloxy-2-hexacosanoilamino-1-(2,3-di-O-benzil-4,6-O-benzilideno- α -D-galactopiranosil) octadecano (35)

[0221] El nucleófilo 10 (150 mg, 0,162 mmol) y glicosilar agente 34 (151 mg, 0,243 mmol) se co-evaporó con tolueno tres veces y se secó en alto vacío durante 3 h después de lo cual se disolvieron en Et₂O (2 ml) y THF (0,4 ml) y se enfrió a - 40 ° C. A la mezcla se añadió TMSOTf (8,0 ml, 0,043 mmol) y la solución se calentó a -10 ° C durante el período de 3 h. La reacción se inactivó mediante la adición de NEt₃ (0,05 ml) y los disolventes se eliminaron a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 10: 1 → 4: 1) para dar glicósido 35 (140 mg, 64% α -anómero) como un aceite blanco. HR ESI Calculado para C₈₃H₁₄₃NO₉Si₂ [M + H⁺]: 1356.2067 encontró: 1356.2098.

(2S,3S,4R)-3,4-Bis-tert-butildimethylsiloxy-2-hexacosanoilamino-1-(2,3,4-tri-O-benzil-6-hidroxi- α -D-galactopiranosil) octadecano (36)

[0222] A una solución de 35 (80 mg, 0,06 mmol) en CH₂Cl₂ anhídro (2 ml) bajo atmósfera de argón se añadieron (II) triflato (2 mg, 0,006 mmol) y BH₃ · THF (0,30 mL, 0,30 mmol). Despues de agitar durante 2 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción amarilla se inactivó con metanol. Posteriormente, la mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con una solución sat. NaHCO₃, agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc: 8,5 / 1,5) para producir glucósido 36 (62 mg, 78%) como una espuma amarillenta. HR ESI Calculado para C₈₃H₁₄₅NO₉Si₂ [M + H⁺]: 1358.2226 encontró: 1358.2196.

[0223] El PEG protegido con Boc derivado 38 fue comprado en Creative PEGWorks, Winston Salen, NC, EE.UU..

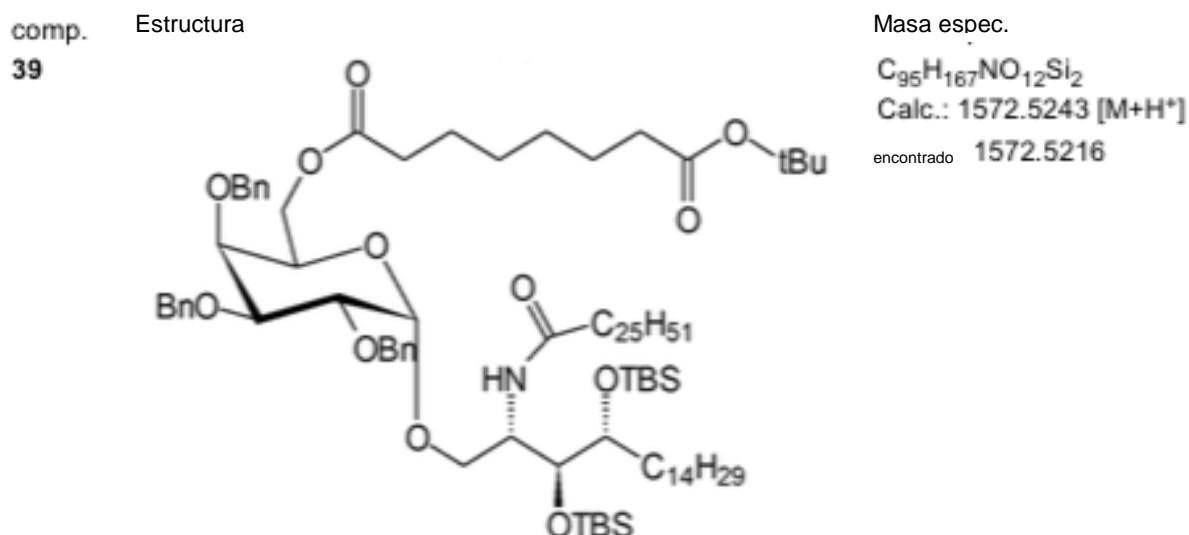
35

(2S,3S,4R)-3,4-Bis-tert-butildimethylsiloxy-2-hexacosanoilamino-1-(2,3,4-triO-bencil-6-(carbonil-1-ethyl- 2- (tri (1- etanoil) 1- etanoil-2- (terc-butoxi-carbonil) amino) - α -D-galactopiranosil) octadecano (37)

[0224] A una solución de 38 (18 mg, 0,05 mmol) en DMF (5 ml) se añadió O- (benzotriazol-1-il) -N, N, N', N'- tetrameth- yluronium TBTU tetrafluoroborato (16,1 mg, 0,05) y diisopropiletilamina (12,9 mg, 17 ml, 0,1 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, una mezcla de 36 (50 mg, 0,04 mmol) en DMF (1 ml) se añadió a la mezcla de reacción y se agitó durante 5 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (15 ml) y la mezcla resultante se lavó con HCl al 5% (2 x 3 ml), NaHCO₃ 1 M (3 x 3 ml) y agua (2 x 3 ml). La capa orgánica se recogió, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró para dar el producto del éster bruto que se purificó por columna ultrarrápida cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 8: 1 → 1: 1) para producir el enlazador glicolípido -Equipado 37 (40 mg, 63%) como un aceite incoloro. HR ESI Calculado para C₉₉H₁₇₄N₂O₁₆Si₂ [M + H⁺]: 1705.6272 encontró: 1705.6231

[0225] Ácido subérico mono-terc-butilo se preparó de acuerdo con Chem. Commun. 1999, 823.

[0226] Se preparó el compuesto 37a de acuerdo con el procedimiento de reacción anterior con un rendimiento del 53%.

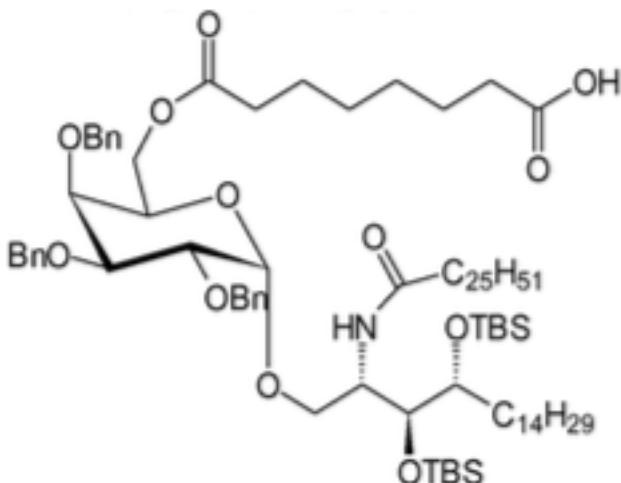


[0227] (2S,3S,4R)-3,4-Bis-tert-butildimethylsiloxy-2-hexacosanoilamino-1-(2,3,4-triO-bencil-6-(carbonil-1-ethyl- 2- (1- etanoil) 1- etanoil-2-amino) - α -D-galactopiranosil) octadecano (25a)

[0227] 37 (40 mg, 0,02 mmol) se disolvió en TFA (1 ml) y se agitó a rt durante 30 min. La solución se diluyó con CH₂Cl₂ (2 ml) y después se neutralizó cuidadosamente (pH ~ 8 a) con una solución sat. aq. Solución de NaHCO₃ (8 ml). CH₂Cl₂ adicional se añadió y la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc: 10: 1 → 1: 1) para dar el 25a glicolípido enlazador-equipada (33 mg, 89%) como un aceite amarillento. HR ESI Calculado para C₉₄H₁₆₆N₂O₁₄Si₂ [M + H⁺]: 1605.5112 encontró: 1605.5088. [0228] Se preparó el compuesto 25b en consecuencia a partir del compuesto 39:

comp. Estructura

25b



Masa espec.

 $C_{91}H_{159}NO_{12}Si_2$ Calc.: 1516.4179 [M+H⁺]

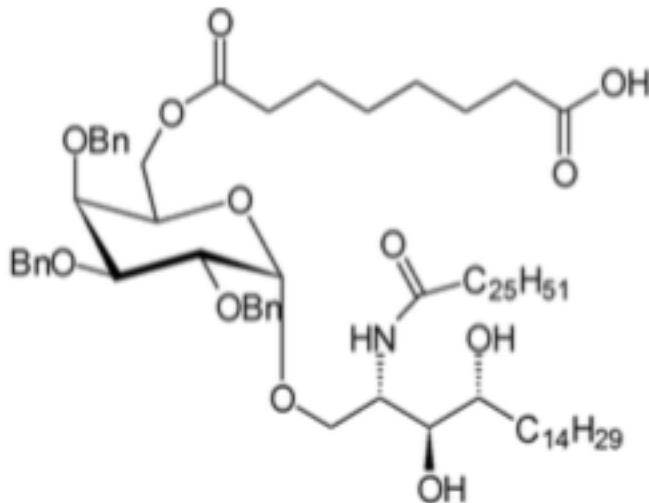
encontrado 1516.4223

(2S,3S,4R)-2-Hexacosanoilamino-1-(2,3,4-tri-O-bencil-6-(carbonil-1-etyl-2-(tri(1-ethanoil) 1-etyl-2-(tri(1-ethanoil)1-ethanoil-2-amino) - α -D-galactopiranosil) octadecano-3,4-diol (26a)

5 [0229] A una solución de bis-TBS éter 25a (33,0 mg, 20,7 mmol) en THF (1 ml) se añadió una solución de TBAF (1 M en THF, 0,150 mL, 0,15 mmol) lentamente. Después de 3,5 h la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (10 ml). Los disolventes se eliminaron a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna de sílice (gradiente de hexanos / EtOAc = 1: 0 → 1: 1) para dar 26a diol (24,5 mg, 86%) como un aceite claro. HR ESI Calculado para C₈₂H₁₃₈N₂O₁₄ [M + H⁺]: 1376.9893 encontró: 1376.9876.

comp. Estructura

26b



Masa espec.

 $C_{79}H_{131}NO_{12}$ Calc.: 1287.8959 [M+H⁺]

encontrado 1287.8914

10

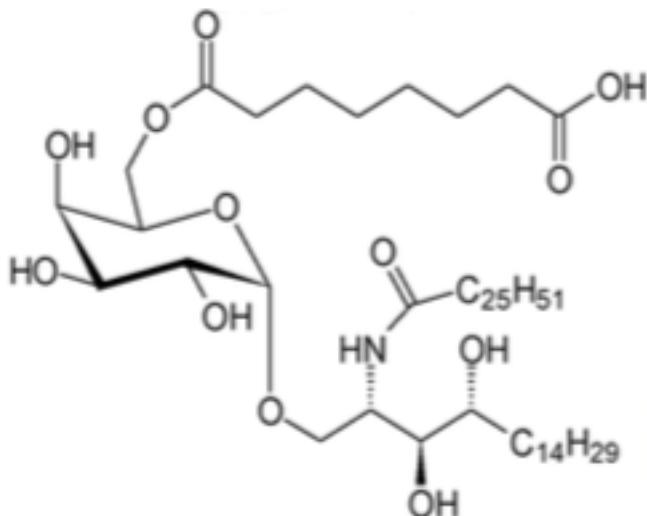
(2S,3S,4R)-1-(6-(Carbonil-1-etyl-2-(tri(1-ethanoil)1-ethanoil-2-amino)- α -D-galactopiranosil)-2-hexacosanoilaminoctadecano-3,4-diol (27 bis)

15 [0231] A una solución de diol 26a (25 mg, 17,7 mmol) en EtOH (0,5 ml) y cloroformo (0,15 ml) se añadió Pd (OH) 2 en carbón (10% w / w, mojado 35 mg). La solución se agitó a t.a. bajo una atmósfera de Ar durante 15 min. después de lo cual el gas H₂ se insertó en la suspensión y la mezcla se hidrogenó durante 12 h. La mezcla se filtró sobre celite y se lavó a fondo con CH₂Cl₂, THF y MeOH. Los disolventes se eliminaron a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice de sílice (CH₂Cl₂ / MeOH = 4: 1) para dar enlazador equipado 27a GSL (18 mg, 92%) como un aceite incoloro. HR ESI Calculado para C₆₁H₁₂₀N₂O₁₄ [M + H⁺]: 1106.6209 encontró: 1106.6177.

20 [0232] Se preparó el compuesto 27b consecuencia de 26b compuesto:

comp.
27b

Estructura



Masa espec.

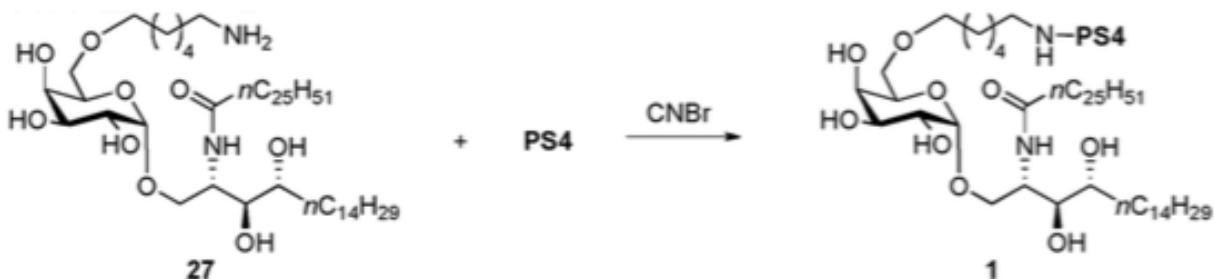
 $C_{58}H_{113}NO_{12}$ Calc.: 1017.5275 [M+H⁺]

encontrado 1017.5231

5-((6-(((2R,3R,4S,5R,6S)-6-(((2S,3S4R)-2-hexacosanamido-3,4-dihydroxyoctadecyl)oxy)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-piran-2-il) metoxi) hexil) amino)-5-oxopentanoico (40)

5 [0233] Para glicolípido 27 (10 mg, 10,44 mmol) en cloroformo: metanol: mezcla de trietilamina (1: 1: 0,1, 7 ml) se añadió un exceso de anhídrido glutárico (14,9 mg, 131 mmol) en eportion y se dejó agitar a temperatura ambiente. After tres días de la finalización de la reacción se indica por el desaparición de la masa material de partida en LCMS. Después, la reacción se evaporó a sequedad y el residuo resultante se trituró con diclorometano para dar el producto deseado 40 (8 mg, 72%) como un sólido blanco.

10 **Síntesis del conjugado glicolípido antígeno carbohidrato:**
[0234]

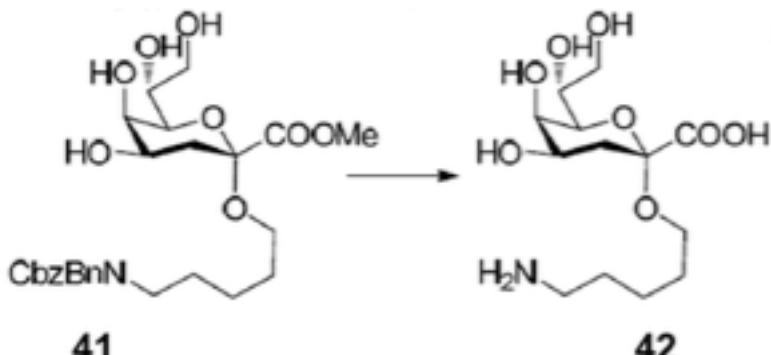


15 [0235] La PS4 (1 mg) se disolvió en HCl ac. solución de NaOH (pH 10,95) a una concentración final de 10 mg / mL. La PS4 se activó con 15 ml de bromuro de cianógeno (10 mg / ml en acetonitrilo) y se dejó en agitación a la temperatura ambiente durante 10 min. Para la PS4 activada, se añadió 20 ml de 27 (10 mg / 2 ml en DMSO: THF, 1: 1) y la mezcla se incubó durante 18 h a temperatura ambiente. Después de ajustar el pH a 6 con 0,1 M aq. HCl, la mezcla se dializa (12-14k MWCO) frente a agua doblemente destilada, se concentró a través de ultrafiltración (MWCO 10k) después se liofilizó.

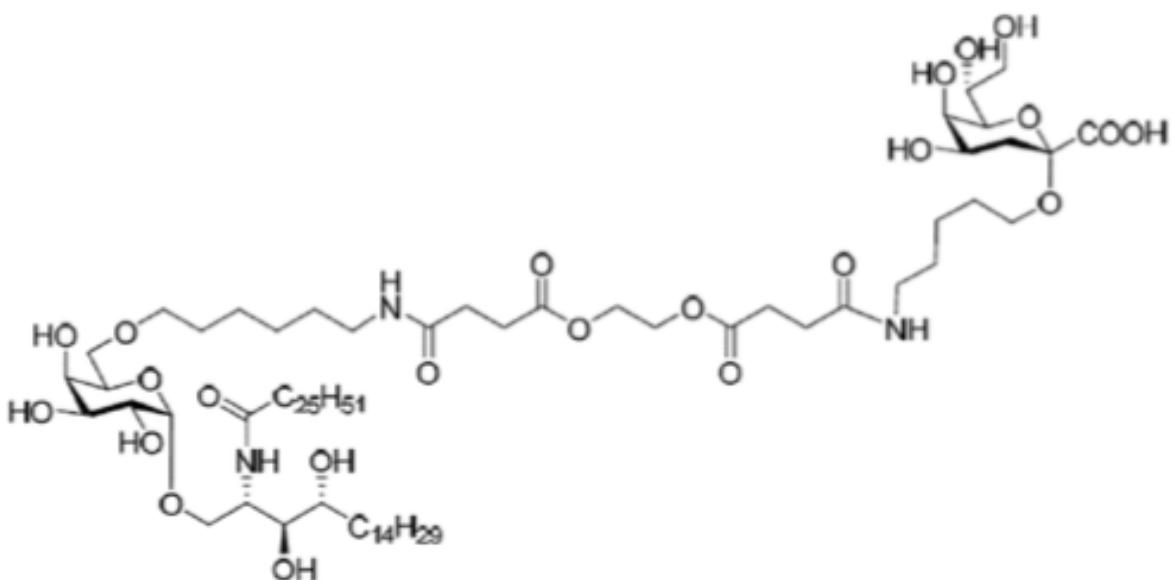
20 [0236] Los compuestos 27a y 27c-h se han conjugado con PS4 en consecuencia y también mostró actividad inmunogénica.

25

30



[0237] Éster metil 4,57 (proporcionado por el Dr. M. Oberli) (10 mg, 0,018 mmol) se disolvió en una mezcla de THF (1,0 ml) y NaOH (0,1 M, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 h después de lo cual se neutralizó mediante la adición de Amberlite IR-120 de resina (H⁺). La resina se eliminó por filtración y los disolventes se eliminaron a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice (20% de MeOH en CH₂Cl₂) para dar un polvo blanco que se disolvió en THF (1,0 ml), agua (1,0 ml) y MeOH (1,0 ml). A la mezcla se le añadió Pd sobre carbón (20 mg). Una corriente de hidrógeno se hizo pasar por la suspensión durante 20 min.. Despues de lo cual la suspensión se agitó durante otros 18 h bajo una atmósfera de H₂. La suspensión se filtró sobre celite y se lavó con MeOH y agua (2 x). Los disolventes se eliminaron a vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño Sephadex G25 (eluyente: 5% EtOH en agua) para producir ácido 4,13 (5,0 mg, 85% en dos etapas) de un polvo blanco. [α] D t.a. = -14,2 (C = 1,0, agua); R_f = 0,67 (aq isopropanol / 1M NH₄OAc = 2: 1); IR (película) v_{max} 3256, 2938, 1571, 1410, 1050, 830 cm⁻¹; 1H RMN (400 MHz, D₂O) δ 4,00 - 3,84 (m, 3H), 3,74 (dd, J = 19,7, 9,9 Hz, 3H), 3,63 (d, J = 8,9 Hz, 1 H), 3,46 (dd, J = 15,8, 6,5 Hz, 1H), 3,01 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,43 (dd, J = 12,1, 4,6 Hz, 1 H), 1,79 (t, J = 12,3 Hz, 1 H), 1,67 (dd, J = 14,0, 6,5 Hz, 2H), 1,63 - 1,57 (m, 2H), 1,44 (dd, J = 15,2, 7,9 Hz, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, D₂O) δ 181,4, 173,9, 101,1, 73,3, 69,0, 67,4, 65,2, 64,1, 39,3, 34,7, 28,2, 26,3, 23,2, 22,0; HR ESI Calculado para C₁₃H₂₅NO₈ [M-H⁺]: 322,1507 encontró: 322,1502.



(2S, 3S, 4R) -1- (6- (6'-hexanilo succinamido succinimidamido etilenglicol 5 "-pentanil α-3" - desoxi-D-Hombre- no-oct-2" - piranósido ácido ulosonic) - α-D-galactopiranosil) -2-hexacosanoilaminoctadecano-3,4-diol (glicoconjungado 43)

[0238] A una solución equipada de enlazador- KDO 42 (1,5 mg, 4,6 mmol) y glicolípido 27 (4,4 mg, 4,6 mmol) en DMSO / piridina (0,1 ml, ratio = 1: 1 v / v) bissuccinimidil etilenglicol se añadió succinato (EGS) (2,1 mg, 4,6 mmol) disuelto en DMF (0,1 ml). La mezcla de reacción se agitó a t.a. para 24 h después de lo cual disolventes se eliminaron por liofilización. El producto en bruto se purificó por cromatografía de exclusión de tamaño LH-20 (eluyente: MeOH / CH₂Cl₂ = 1: 1) para dar el conjugado 43 (3,0 mg, 42%) como un polvo de color amarillo pálido. [α]_D t.a. = 43,9 (c = 0,2, piridina); R_f = 0,54 (CH₂Cl₂ / MeOH = 85:15); IR (película) v_{max} 3308, 2918, 2850, 1781, 1709, 1645, 1548, 1467, 1378, 1211, 1157, 1071, 1020, 952, 816, 719 cm⁻¹; 1 H RMN (400 MHz, d-pyr) 8,52 (m, 2H), 8,44 (d, J = 8,7 Hz, 1 H), 5,56 (d, J = 3,9 Hz, 1 H), 5,26 (s, 1 H), 4,88 (s, 1 H), 4,66 (ddd, J = 13,1, 9,9, 4,4 Hz, 2H), 4,55 (d, J = 4,6 Hz, 1 H), 4,52 - 4,39 (m, 5H), 4,39 - 4,31 (m, 7H), 4,20 - 3,93 (m, 2H), 3,85 (d, J = 7,3 Hz, 1 H),

3,79 - 3,72 (m, 1 H), 3,47 (ddd, $J = 20,0, 14,8, 8,3$ Hz, 3H), 3,39 - 3,32 (m, 1 H), 3,22 (dd, $J = 11,9, 4,5$ Hz, 1 H), 3,08 (ddd, $J = 6,7, 5,8, 2,5$ Hz, 1 H), 2,94 - 2,84 (m, 4H), 2,79 (dd, $J = 8,5, 5,0$ Hz, 3H), 2,73 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 2,53 - 2,49 (m, 18H), 2,33 (t, $J = 6,9$ Hz, 1 H), 1,99 - 1,66 (m, 4H), 1,66 - 1,47 (m, 6H), 1,42 - 1,20 (m, 7H), 0,89 (t, $J = 6,3$ Hz, 6H). δ ; 13C RMN (151 MHz, d-pyr) δ 173.6, 171.7, 170.5, 169.3, 101.9, 101.0, 77.1, 76.8, 72.9, 71.9, 71.9, 71.6, 5 71.4, 71.2, 71.1, 70.6, 69.5, 69.1, 67.8, 66.5, 64.4, 63.4, 63.3, 62.9, 62.8, 61.9, 51.7, 43.5, 41.5, 40.2, 40.1, 37.2, 37.2, 34.8, 32.6, 32.5, 31.3, 30.8, 30.6, 30.5, 30.5, 30.5, 30.4, 30.4, 30.4, 30.4, 30.3, 30.3, 30.3, 30.2, 30.0, 30.0, 29.3, 27.6, 27.0, 26.5, 26.5, 24.3, 23.4, 14.7; HR ESI Calculado para C79H147N3O23 [M + Na +]: 1529.0318 encontró: 1529.0363

10 Descripción de las figuras:

[0239]

Figura 1. Modelo de acción de vacuna glicoconjuguado.

15 El modo de acción se ilustra por el antígeno de la enfermedad neumocócica invasiva: la cápsula neumocócica polisacárido (CPS) se une covalentemente a un glicolípido. Las células B específicas para el CPS se internalizan el conjugado por endocitosis mediada por receptor y el conjugado se escinde en endosomas tardíos, generando α GalCer gratuita. En el compartimiento endosomal tarde, α GalCer será complejo con CD1d moléculas presentadoras de antígeno y sobre el reciclaje plasmamembrane de CD1d se presentará a las células asesinas naturales invariantes T (iNKT).

20 La estimulación de las células iNKT por el α GalCer: Complejo de CD1d sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno B induce la liberación de citoquinas solubles necesarias para la ayuda de las células B y la generación de memoria. Por esta estrategia una memoria inmunológica a largo plazo definitiva es inducida, lo que lleva a la producción de células B de memoria y el suministro de alta afinidad anticuerpos IgG.

25 **Figura 2.** Vacuna de glicoconjuguado 1 que contiene la porción de polisacárido capsular antigénico PS4.

Figura 3. Actividad *in vitro* de la vacuna conjugada. α GalCer pulsado de CPS APC CD1d-positivo estimulan células iNKT. Los diferentes lotes de vacuna conjugada tipo 4 α GalCer-CPS (diamantes) son activos *in vitro* cuando α GalCer se libera de CPS en las células vivas (A). α GalCer está completamente conjugado con CPS como la actividad restante no se encuentra cuando activación de las células iNKT en un sistema libre de células (B). Tipo CPS 4 no conjugados (círculos abiertos) o α GalCer (círculos cerrados) solo como control.

30 **Figura 4.** La actividad *in vivo* de la vacuna conjugada. Sólo α GalCer-CPS aumenta la respuesta Abs en ratones C57BL / 6 y la respuesta Abs depende de las células NKT / CD1d. (A) WT C57BL / 6 ratones vacunados con α GalCer-CPS (símbolos cerrados) o CPS solos (símbolos abiertos) se sangran después de la inmunización y los Abs CPS-específicos son evaluados por ELISA. (B) WT C57BL / 6 (WT, símbolos cerrados) o CD1d-deficiente (CD1d -, símbolos abiertos) ratones inmunizados con α GalCer-CPS se sangran después de la vacunación y los Abs CPS-específicas son medidos por ELISA.

35 **Figura 5.** En la respuesta de anticuerpos *in vivo* después de la vacunación. La respuesta Abs incluye subclases de IgG y muestra la reactividad de epítopos comunes en diferentes *S. pneumoniae* CPS. (A) WT C57BL / 6 (WT, símbolos cerrados) o CD1d- deficiente (CD1d -, símbolos abiertos) ratones inmunizados con α GalCer-CPS se sangran después de la vacunación y las subclases Abs específicos cps- son medidos por ELISA (IgG1 dado como ejemplo representativo). (B) C57BL / 6 ratones vacunado con α GalCer-CPS se sangran después de la inmunización y la CPS tipo 4 (símbolos cerrados) o tipo 2 CPS (símbolos abiertos) Abs específicos de son evaluados por ELISA.

40 **Figura 6.** Híbridomas específicos de CPS 6. expresan IgM madurado por afinidad y subclases de IgG con cierta preferencial V, el uso del segmento D, J. Los híbridomas de ratones inmunizados con α GalCer-CPS se establecieron y se clasificaron por ELISA y secuenciación. * Sustituciones de aminoácidos (aa) o nucleótidos (NUC) en comparación con la secuencia de la línea germinal.

45 **Figura 7.** Protección de la infección con *S. pneumoniae* en un modelo de ratón. MAbs CSP-específicas promueven la opsonización de bacterias. La captación de la etiqueta fluorescente *S. pneumoniae* serotipo 4 en APC solo, en presencia de complemento (C') y / o mAb 12F10 (hibridoma CPS-específica purificada) o C15 (TCRAV24 anti-humano). Porcentaje de células positivas de acuerdo con el fondo (marcador OPA) se da en una tabla.

50 **Figura 8.** Ratones C57BL/6 vacunado de α GalCer-CPS - muestran una protección a largo plazo para desafiar con *S. pneumoniae*. Los ratones vacunados con α GalCer-CPS (A: cerrado símbolos; B: de línea) o CPS solos (A: Símbolos abiertos; B: línea discontinua) están infectados con *S. pneumoniae* una semana (A) o hasta 3 meses (B) después de la última inmunización. Los ratones se puntuán para la enfermedad, el peso y la supervivencia durante varios días (dado en horas). Todos los ratones inyectados de α GalCer-CPS sobrevivieron (B) y sin síntomas de la enfermedad. La pérdida de peso severa (A) sólo se observó para la condición CPS por sí sola independientemente de la supervivencia del animal (B).

55 **Figuras 9 y 10.** Isotipo y especificidad de Abs anti-polisacárido (IgG, Figura 9, IgM, Figura 10).

60 LISTADO DE SECUENCIAS

[0240]

<110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

<120> Vacunas Conjugadas Carbohidratos-glicolípidos

65 <130> GAR-P03475WO (III)

<160> 57

<170> PatentIn versió 3.3

<210> 1

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser
1 5

10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Cualquier aminoácido

20

<400> 2

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Xaa Tyr Gly
1 5

<210> 3

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser
1 5

30

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

35 <400> 4

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser
1 5

<210> 5

<211> 9

40 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223> Cualquier aminoácido

45

<400> 5

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Xaa Tyr Gly
1 5

50 <210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

5 <400> 6

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Xaa Tyr Gly
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus

<220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 15 <223> Cualquier aminoácido

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Xaa Tyr Tyr
 1 5

<210> 8
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 25 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 8

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Xaa Tyr Asn
 1 5

30 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

40 <400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Xaa Tyr Gly
 1 5

45 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 10

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Xaa Tyr Gly
 1 5

5 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 11

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Xaa Tyr Gly
 1 5

15 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Asp Tyr Ala
 1 5

25 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Cualquier aminoácido

30 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

35 <400> 13

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Xaa Tyr Gly
 1 5

40 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

45 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 14

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Xaa Tyr Trp
 1 5

50 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 15

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Xaa Tyr Gly
 1 5

10 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Xaa Tyr Trp
 1 5

20 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

30 <400> 17

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Xaa Tyr Asn
 1 5

35 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 18

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Xaa Tyr Asn
 1 5

45 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <400> 19

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala
 1 5

5 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 20

Ile Xaa His Tyr Xaa Xaa Ser Gly Tyr Thr
 1 5 10

15 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido
 25 <400> 21

Ile Xaa Xaa Trp Xaa Ser Asp Gly Ser Thr
 1 5 10

30 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 22

Ile Xaa His Tyr Xaa Xaa Ser Gly Tyr Thr
 1 5 10

40 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 23

Ile Xaa His Tyr Xaa Xaa Ser Gly Ser Thr
 1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(5)

10 <223> Cualquier aminoácido

<400> 24

Ile Xaa Xaa Trp Xaa Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5 10

<210> 25

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

20 <221> Xaa

<222> (2)..(5)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 25

Ile Xaa Xaa Trp Xaa Gly Asp Gly Ser Thr
 1 5 10

25

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

35 <223> Cualquier aminoácido

<400> 26

Ile Xaa Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr
 1 5 10

<210> 27

40 <211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa

45 <222> (5)..(6)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 27

Ile Asp Pro Tyr Xaa Xaa Tyr Gly Gly Thr
 1 5 10

5 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 28

Ile Xaa Ser Xaa Ser Gly Gly Ser Tyr Thr
 1 5 10

15 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 29

Ile Xaa Xaa Trp Xaa Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5 10

25 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido
 35 <400> 30

Ile Xaa Xaa Trp Xaa Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5 10

40 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 31

Ile Ser Thr Tyr Xaa Xaa Tyr Gly Asn Thr
 1 5 10

5 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 32

Ile Xaa Xaa Trp Xaa Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5 10

15 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 33

Ile Xaa Xaa Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr
 1 5 10

25 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido
 35 <400> 34

Ile Xaa Xaa Trp Xaa Gly Gly Ser Thr
 1 5 10

40 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 35

Ile Xaa Xaa Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr
 1 5 10

5 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido
 10 <400> 36

Ile Asp Pro Tyr Xaa Xaa Tyr Gly Gly Thr
 1 5 10

15 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido
 20 <400> 37

Ile Asp Pro Tyr Xaa Xaa Tyr Gly Gly Thr
 1 5 10

25 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido
 35 <400> 38

Ile Xaa Ser Tyr Xaa Xaa Ser Gly Ser Thr
 1 5 10

39 <210> 39
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> Mus musculus

45 <220>
 <221> Xaa
 <222> (10)..(14)
 <223> Cualquier aminoácido
 45 <400> 39

Ala Arg Ser Ala Asn Tyr Gly Pro Met Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

50 <210> 40
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

Val Arg Asn Gly Val Tyr Arg Asp Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa

<222> (10)..(11)

10 <223> Cualquier aminoácido

<400> 44

Ala Lys Ile Tyr Tyr Gly Arg Asn Xaa Xaa Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa

<222> (10)..(12)

20 <223> Cualquier aminoácido

<400> 45

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Xaa Xaa Xaa Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa

<222> (10)..(14)

30 <223> Cualquier aminoácido

<400> 46

Ala Arg Ser Thr Gly Thr Ala Trp Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

<210> 47

<211> 20

40 <212> PRT

<213> Mus musculus

5 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(10)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 47

Ala Arg Leu Tyr Asp Xaa Gly Tyr Tyr Xaa Val Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

10 <210> 48
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> Xaa
 15 <222> (10)..(13)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 48

Ala Arg Asn Ser Gly Thr Gly Trp Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Val
 1 5 10 15

Trp Gly Ala Gly
 20

20 <210> 49
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> Xaa
 <222> (10)..(14)
 <223> Cualquier aminoácido

30 <400> 49

Ala Arg Asn Gly Asn Arg Ala Trp Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

35 <210> 50
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <220>
 <221> Xaa
 <222> (3)..(13)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 50

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asp Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa

<222> (10)..(14)

10 <223> Cualquier aminoácido

<400> 51

Ala Arg Asp Gly Tyr Pro Ala Trp Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

20 <221> Xaa

<222> (6)..(13)

<223> Cualquier aminoácido

25 <400> 52

Ala Arg Gly Arg Asn Xaa Xaa His Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Mus musculus

<220>

<221> Xaa

<222> (10)..(11)

35 <223> Cualquier aminoácido

<400> 53

Ala Lys Gln Gly Asn Trp Ala Asp Tyr Xaa Xaa Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

40 <213> Mus musculus

5 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(13)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 54

Ala Arg Leu Leu Arg Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

10 <210> 55
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> Xaa
 <222> (4)..(11)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 55

Ala Arg Ser Xaa Asn Trp Thr Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

20 <210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> Xaa
 <222> (3)..(12)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 56

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
 20

35 <210> 57
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 57

ES 2 551 599 T3

Ala Arg Ser Leu Xaa Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly
20

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula general (I):

A [L-CH-CA] p (I)

5 donde

A representa un antígeno de hidratos de carbono de 1 a 10.000 monómeros de hidratos de carbono y el antígeno de hidratos de carbono pertenece a la clase de polisacáridos, en el que los monómeros de hidratos de carbono del antígeno de hidratos de carbono están opcionalmente modificados para llevar amida, carbonato, carbamato, carbonilo, tiocarbonilo, carboxi, tiocarboxi, éster, éter, epoxi, hidroxialquilo, alquilenilo, fenileno, alquenilo, imino, imida, isourea, tiocarbamato, thiourea y / o restos de urea,

10 p es el número de residuos -L-CH-CA que están unidos a los hidratos de carbono antígeno A, y p es un número entero definido como sigue:

15	p es 1	<input type="radio"/>	2 si u es 1
	p es 1, 2, 3	<input type="radio"/>	4 si u es 2
	p es 1, 2, 3, 4, 5	<input type="radio"/>	6 si u es 3
	p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	<input type="radio"/>	8 si u es 4
20	1 . p . 10		si 5 . u . 10
	2 . p . 50		si 11 . u . 100
	20 . p . 200		si 101 . u . 1000
	50 . p . 400		si 1001 . u . 10000

25 u es el número de monómeros de carbohidratos del antígeno A
 L representa -L1-L2-, -L2-, -L2-L3 o -L1-L2-L3;
 L1 representa uno de los siguientes residuos:

30

35

40

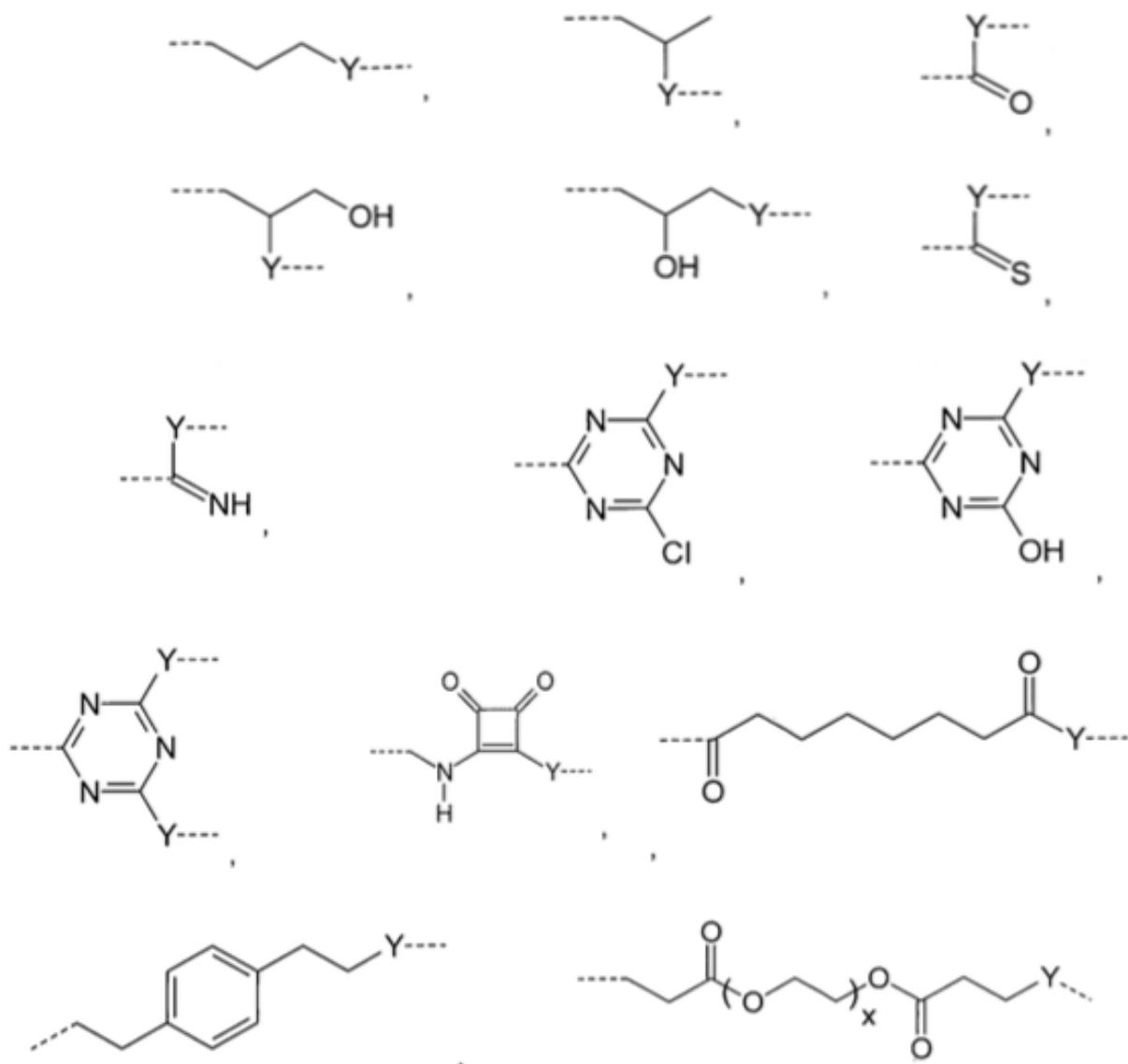
45

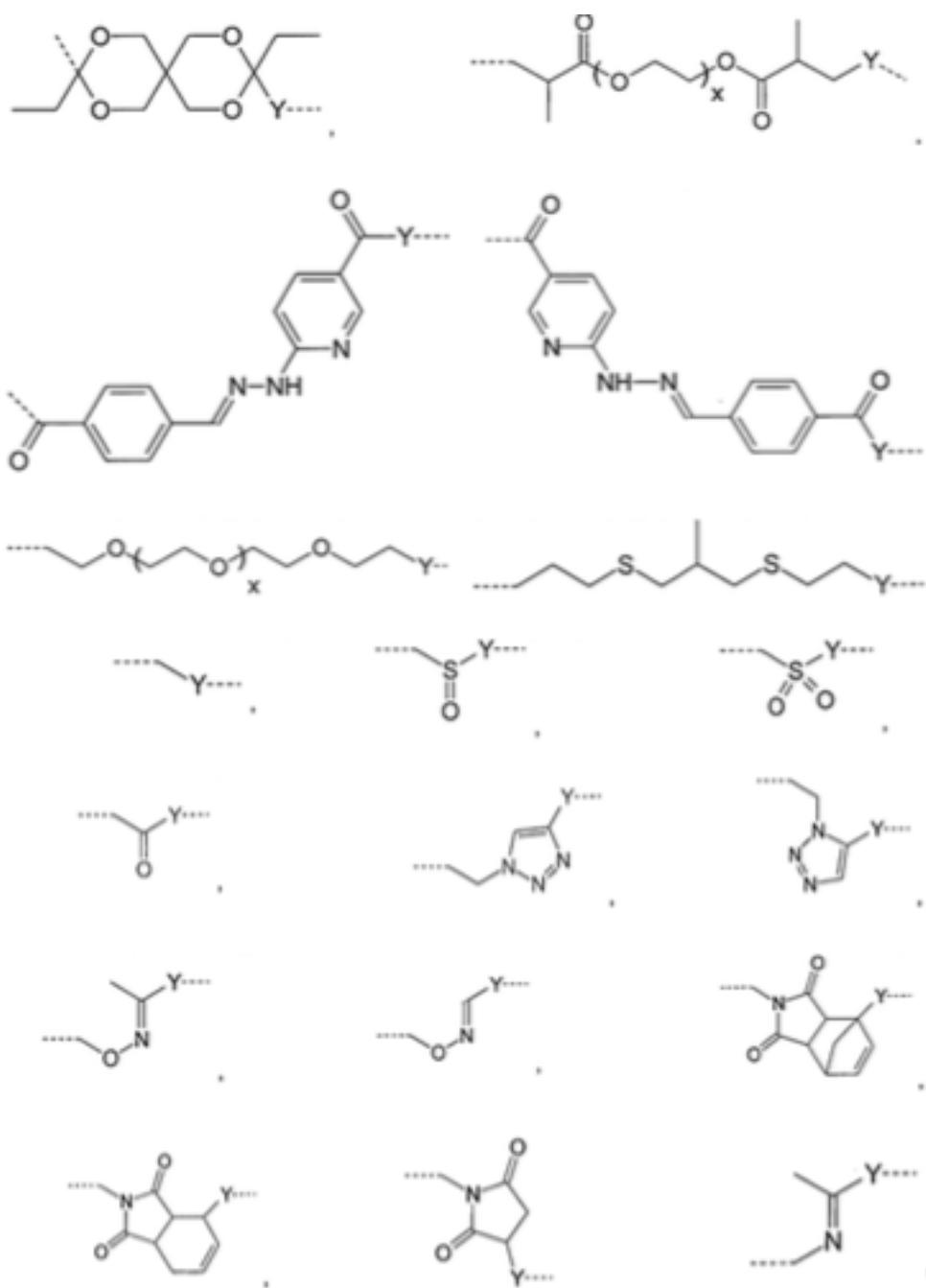
50

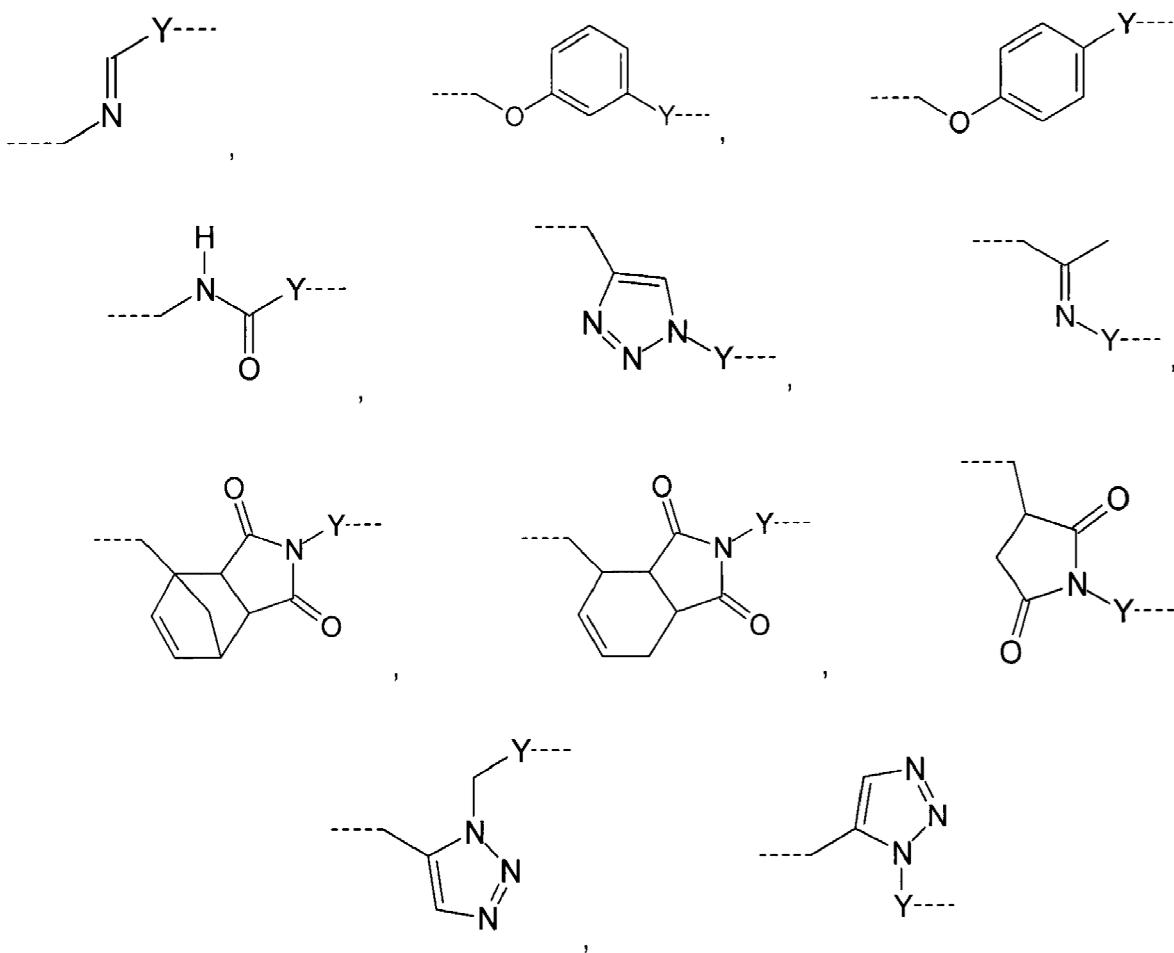
55

60

65







donde x es un número entero de 1 a 60;

Y representa un enlace, -NH-, -O-, -S-, -S-S-;

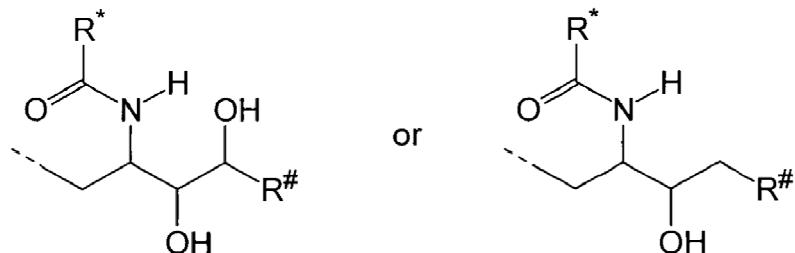
5 L2 representa -CH2-, -C2H4-, -C3H6-, -C4H8-, -C5H10-, -C6H12-, -C7H14-, -C8H16-, -C9H18-, -C10H20-, -CH (CH3) -, -C [(CH3) 2] -, -CH2-CH (CH3) -, -CH (CH3) -CH2-, -CH (CH3) -C2H4-, -CH2-CH (CH3) -CH2 -, -C2H4- CH (CH3) -, -CH2-C [(CH3) 2] -, -C [(CH3) 2] -CH2-, -CH (CH3) -CH (CH3) -, -C [(C2H5) (CH3)] -, -CH (C3H7) -, - (CH2-CH2-O) n-CH2-CH2-, -CO-CH2-, -CO-C2H4-, -CO-C3H6-, -CO-C4H8-, -CO-C5H10-, -CO-C6H12-, -CO- C7H14-, -CO-C8H16-, -CO-C9H18-, -CO-C10H20-, -CO-CH (CH3) -, -CO-C [(CH3) 2] -, -CO-CH2-CH (CH3) -, -CO- CH (CH3) 10 -CH2-, -CO-CH (CH3) -C2H4-, -CO-CH2-CH (CH3) - CH2-, -CO-C2H4-CH (CH3) -, -CO-CH2-C [(CH3) 2] -, -CO-C [(CH3) 2] -CH2-, -CO-CH (CH3) - CH (CH3) -, -CO-C [(C2H5) (CH3)] -, -CO-CH (C3H7) -, -CO- (CH2-CH2-O) n-CH2-CH2-;

n representa un número entero de 1 a 60;

15 L3 representa -CO-, -O-CO-, -NH-CO-, -NH (C = NH) -, -SO2-, -O-SO2-, -NH-, -NH-CO-CH2-;

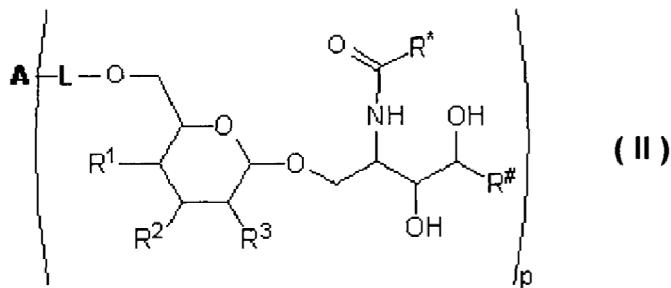
CH representa un monosacárido, un disacárido o un trisacárido;

CA representa



R * y R # representan independientemente el uno del otro un residuo de carbono lineal o ramificado o cíclico, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado que consta de 1 a 30 átomos de carbono; y tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 2. Compuesto según la reivindicación 1 de la fórmula general (II):



donde

A, L y p tienen los significados que se definen en la reivindicación 1;

R1, R2, R3 representan independientemente el uno del otro:

10 -H, -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -OC₃H₇, -O-SO₂-CH₃, -O-SO₂-C₂H₅, -O-SO₂-C₃H₇, -O-COOCH₃, -NHCOCH₃, -NH₂;

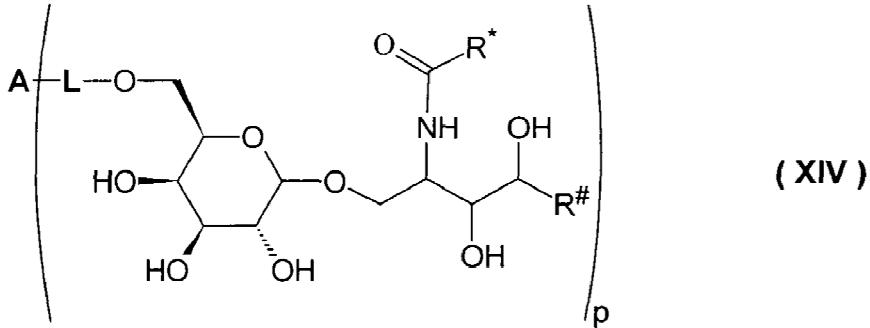
R * y R # representan independientemente el uno del otro:

-CH₃, -(CH₂) r-CH₃, -CH(OH) - (CH₂) s-CH₃, -CH = CH- (CH₂) t-CH₃, -CH(OH) - (CH₂) v-CH(CH₃) 2, -CH(OH) - (CH₂) w-CH(CH₃) -CH₂-CH₃, -(CH₂) a-CH = CH- (CH₂) b-CH₃, -(CH₂) c-CH = CH- (CH₂) d-CH = CH- (CH₂) e-CH₃, -(CH₂) f-CH = CH- (CH₂) g-CH = CH- (CH₂) h-CH = CH- (CH₂) i-CH₃, -(CH₂) j-CH = CH- (CH₂) k-CH = CH- (CH₂) l-CH = CH- (CH₂) o-CH = CH- (CH₂) q-CH₃,

15 donde a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, o, q son números enteros de 1 a 26 con la condición de que: (a + b) ≤ 27; (c + d + e) ≤ 25; (f + g + h + i) ≤ 23; (j + k + l + o + q) ≤ 21; y en el que r es un número entero de 1 a 29, s es un número entero de 1 a 28, t es un número entero de 1 a 27, v es un número entero de 1 a 26, w es un número entero de 1 a 24.

20

3. Compuesto según la reivindicación 1 de la fórmula general (XIV):



donde

25 A, L, R *, R # y p tienen los significados que se definen en la reivindicación 1.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que los monómeros de hidratos de carbono del antígeno hidrato de carbono pertenecen al grupo de hidratos de carbono que comprenden:

α-D-ribopyranose, α-D-arabinopyranose, α-D-xilopyranose, α-D-lyxopyranose, α-D-allopyranose, piranosa α-D-altro-, α-D-glucopyranose, α-D-mannopyranose, α-D-glucopyranose, α-D-idopyranose, α-D-galactopyranose, α-D-ribofuranose, α-D-arabinofuranose, α-D-xilofuranose, α-D-lyxofuranose, α-D-Allofuranose, α-D-Altrofuranose, α-D-glucofuranose, α-D-manofuranose, α-D-gulofuranose, α-D-idofuranose, α-D-galactofuranose, talofuranose α-D-, α-D-psicofuranose, α-D-fructofuranose, α-D-sorbofuranose, α-D-tagatofuranose, α-D-ribulofuranose, α-D-threofuranose, α-D-ramnopiranosa, α-D-erythrofuranose, α-D-glucofuranose, α-D-glucopyranurónico ácido, β-D-ribopyranose, β-D-arabinopyranose, β-D-xilopyranose, β-D-lyxopyranose, β-D-allopyranose, β-D-altropyranose, β-D-glucopyranose, β-D-mannopyranose, β-D-glucopyranose, β-D-idopyranose, β-D-galactopyranose, β-D-talopyranose, β-D-psicopyranose, β-D-fructopyranose, sorbopyranose β-D-, β-D-tagatopyranose, β-D-ribofuranose, β-D-arabinofuranose, β-D-xilofuranose, β-D-lyxofuranose, β-D-ramnopiranosa, β-D-allofuranose, β-D-altrofuranose, β-D-glucofuranose, β-D-manofuranose, β-D-gulofuranose, β-D-idofuranose, β-D-galactofuranose, β-D-talofuranose, β-D-psicofuranose, β-D-fructofuranose, β-D-sorbofuranose, β-D-tagatofuranose, β-D-xylofuranose, β-D-glucopyranurónico ácido, α-L-

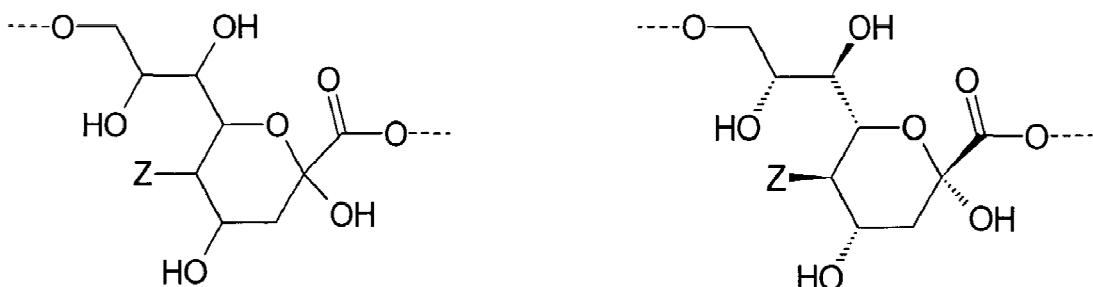
30

35

40

ribopyranose, α -L-arabinopyranose, α -D-xilopyranose, α -L-lyxopyranose, α -D-allopyranose, α -L-altropyranose, α -L-glucopyranose, α -L-mannopyranose, α -L-glucopyranose, α -L-idopyranose, α -L-galactopyranose, α -L-talopyranose, α -L-psicopyranose, α -L-fructopyranose, α -L-sorbofuranose, α -L-tagatopyranose, α -L-ramnopiranose, α -L-ribopyranose, α -L-ose arabinofuran-, α -L-xilofuranose, α -L-lyxofuranose, α -L-Allofuranose, α -L-Altrofuranose, α -L-glucopyranose, α -L-mano- furanose, α -L-gulopyranose, α -L-idoxyfuranose, α -L-galactofuranose, α -L-talofuranose, α -L-psicofuranose, α -L-fructofuranose- α L-, α -L-sorbofuranose, α -L-tagatopyranose, α -L-xylulofuranose, α -L-ribulofuranose, β α -L-treofuranose, α -L-erythropyranose, α -L-glucosamina, α -L-glucopyranurónico ácido, β -L-ribopyranose, β -L-árbabopyranose, β -L-xilopyranose, β -L-glucopyranose, β -L-idopyranose, β -L-galactopyranose, β -L-talopyranose, β -L-psicopyranose, β -L-fructopyranose, β -L-sorbofuranose, β -L- tagatopyranose, β -L-xylofuranose, β -L-allofuranose, β -L-Altrofuranose, β -L-glucopyranose, β -L-mannofuran- ose, β -L-gulopyranose, β -L-idoxyfuranose, β -L-galactofuranose, β -L-talofuranose, β -L-psicofuranose, β -L-fructofuranose, β -L-sorbofuranose, β -L- tagatopyranose, β -L-xylofuranose, β -L-ribulofuranose, β -L-threofuranose, β -L-erythropyranose, β -L-glucosamina, α ácido β -L-glucopyranurónico, β -L-ramnopiranose,

5 o derivados de ácido neuramínico de la siguiente fórmula N- u O-sustituidos:
10
15



donde Z representa $-NH_2$, $-NHAc$, o $-OH$.

;

5. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que los monómeros de hidratos de carbono del resto de CH-pertenecen al grupo de hidratos de carbono que comprenden:
20 α -D-ribopyranose, α -D-arabinopyranose, α -D-xilopyranose, α -D-lyxopyranose, α -D-allopyranose, piranosa α -D-altropyranose, α -D-glucopyranose, α -D-mannopyranose, α -D-glucopyranose, α -D-idopyranose, α -D-galactopyranose, α -D-talopyranose, α -D-psicopyranose, α -D-fructopyranose, α -D-sorbofuranose, α -D-tagatopyranose, α -D-ribopyranose, α -D-arabinofuranose, α -D-xilofuranose, α -D-lyxofuranose, α -D-Allofuranose, α -D-Altrofuranose, α -D-glucopyranose, α -D-mano- furanose, α -D-gulopyranose, α -D-idoxyfuranose, α -D-galactofuranose, talofuranose α -D-, α -D-psicofuranose, α -D-fructofuranose, α -D-sorbofuranose, α -D-tagatopyranose, α -D-xylulofuranose, α -D-árbabopyranose, α -D-ribulofuranose, α -D-threofuranose, α -D-erythropyranose, α -D-glucosamina, α -D-glucopyranose, α -D-ramnopiranose, β -D-ribopyranose, β -D-arabinopyranose, β -D-xilopyranose, β -D-lyxopyranose, β -D-allopyranose, β -D-altropyranose, β -D-glucopyranose, β -D-mannopyranose, β -D-glucopyranose, β -D-idopyranose, β -D-galactopyranose, β -D-talofuranose, β -D-psicofuranose, β -D-fructofuranose, β -D-sorbofuranose, β -D-tagatopyranose, β -D-xylulofuranose, β -D-árbabopyranose, β -D-ribulofuranose, β -D-threofuranose, β -D-erythropyranose, β -D-ramnopiranose, β -D-glucosamina, α -D-glucopyranurónico ácido, α -L-ribopyranose, α -L-arabinopyranose, α -L-xilopyranose, α -L-lyxopyranose, α -L-allopyranose, α -L-altropyranose α -L-, α -L-glucopyranose, α -L-mannopyranose, α -L-glucopyranose, α -L-idopyranose, α -L-galactopyranose, α -L-talopyranose, α -L-psicopyranose, α -L-fructopyranose, α -L-sorbofuranose, α -L- tagatopyranose, α -L-xylulofuranose, α -L-ribulofuranose, α -L-ramnopiranose α -L- threofuranose, α -L-erythropyranose, α -L-glucosamina, α ácido α -L- glucopyranurónico, β -L-ribopyranose, β -L-arabinopyranose, β -L-xilopyranose, β -L-lyxopyranose, β -L-allopyranose, β -L-altropyranose, β -L-glucopyranose, β -L-mannopyranose, β -L-glucopyranose, β -L-idopyranose, β -L-galactopyranose, β -L-talopyranose, β -L-psicopyranose, β -L-fructopyranose, β -L-sorbofuranose, β -L- tagatopyranose, β -L-xylofuranose, β -L-ribulofuranose, β -L-arabinofuranose, β -L-xilofuranose, β -L-lyxofuranose, β -L-allofuranose, β -L-Altrofuranose, β -L-glucopyranose, β -L-mano- furanose, β -L-gulopyranose, β -L-idoxyfuranose, β -L-galactofuranose, β -L-talofuranose, β -L-psicofuranose, β -L-fructofuranose, β -L-sorbofuranose, β -L- tagatopyranose, β -L-xylofuranose, β -L-ribulofuranose, β -L-threofuranose, β -L-erythropyranose, β -L-glucosamina, α ácido nuronic β -L- glucopyranose, β -L-ramnopiranose.

25
30
35
40
45
50

6. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el antígeno de sacárido A es un sacárido capsular bacteriano, un sacárido de una glicoproteína viral, un antígeno de sacárido de sporozoa o parásitos, un antígeno de sacárido de hongos patógenos, o un antígeno de sacárido que es específico para las células cancerosas.

7. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 para su uso como agente farmacéuticamente activo en la medicina o para uso en la vacunación contra las enfermedades infecciosas.

8. Compuesto según la reivindicación 7, en el que la enfermedad infecciosa es causada por un patógeno seleccionado del grupo que comprende:

5 *Allochromatium vinosum, Acinetobacter baumanii, Bacillus anthracis, Campylobacter jejuni, Clostridium spp., Citrobacter spp., Escherichia coli, Enterobacter spp., Enterococcus faecalis., Enterococcus faecium, Francisella tularensis, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Klebsiella spp., Listeria monocytogenes, Moraxella catharralis, Mycobacterium tuberculosis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Proteus mirabilis, *Pro- teus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella spp., Serratia spp., Shigella spp., Stenotrophomonas maltophilia, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Yersina pestis, Yersina enterocolitica, virus de la gripe, virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH"), virus herpes simplex ("HSV", tipo 1 o 2), virus illoma PAP humano ("VPH", forma de 16 o 18), citomegalovirus humano ("HCMV") o la hepatitis B humana o virus C ("VHB", Tipo B; "VHC", tipo C).**

10 15 **9.** Compuesto según las reivindicaciones 6, en el que el sacárido capsular bacteriano pertenece a bacterias seleccionadas a partir de:

20 *Allochromatium vinosum, Acinetobacter baumanii, Bacillus anthracis, Campylobacter jejuni, Clostridium spp., Citrobacter spp., Escherichia coli, Enterobacter spp., Enterococcus faecalis., Enterococcus faecium, Francisella tularensis, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Klebsiella spp., Listeria monocytogenes, Moraxella catharralis, Mycobacterium tuberculosis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Proteus mirabilis, *Pro- teus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella spp., Serratia spp., Shigella spp., Stenotrophomonas maltophilia, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Yersina pestis, Yersina enterocolitica und.**

25 **10.** Compuesto según las reivindicaciones 6, en el que el sacárido de glicoproteínas virales pertenece a los virus seleccionado de:

30 *Los adenovirus, virus Ébola, virus de Epstein-Barr-virus, Flavivirus, FSME-virus, virus de la gripe, Hanta-virus, virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH"), virus del herpes simple ("HSV", tipo 1 o 2), herpes humano virus 6 (HHV-6), el virus del papiloma humano ("HPV", tipo 16 o 18), citomegalovirus humano ("HCMV"), la hepatitis B humana o virus C ("VHB", Tipo B; "VHC", Tipo C), Lassavirus, Lyssavirus (EBL 1 o EBL 2), Marburgvirus, Norovirus, parvovirus B19, Pestivirus, poliovirus, rinovirus, rotavirus, el SARS-assiated coronavirus, el virus de la varicela-zoster.*

35 **11.** Compuesto según las reivindicaciones 6, en el que el antígeno de sacárido de sporozoa o parásitos pertenece a Sporozoa o parásitos seleccionado de:

40 *Babesia, Balantidium, Besnoitia, Blastocystis, coccidios, Cryptosporidium, Cytauxzoon, Cyclospora, moeba Dienta-, Eimeria, Entamoeba, Enterocytozoon, Enzephalitozoon, Eperythrozoon, Giardia, Hammondia, *ra Isosporo-, Leishmania, microsporidios, Naegleria, Plasmodium, Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, Plasmodium knowlesi, Pneumocystis, Schistosoma, Sarcocystis, Theileria, Trichinella, Toxoplasma, Trichomonas, Trypanosoma, Unicaria, Cestoda, Dipylidium, Dranunculus, Echinococcus, Fasciola, Fasciolopsis, Taenia, Ancylostoma, Ascaris, Brugia, Enterobius, Loa loa, Mansonella, Necator, Oncocerca, Strongyloides, Strongylus, Toxocara, Trichuris oder Wuchereria.**

45 **12.** Compuesto según las reivindicaciones 6, en el que el antígeno de sacárido de los hongos pertenece a los hongos seleccionado de:

50 *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Trichophyton interdigitale, T. schöleinii, T. verrucosum, T. violaceum, T. tonsurans, Trichophyton spp., M. canis, Candida albicans, C. guillermondi, C. krusei, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. glabrata, Candida spp., Microsporum spp., Microsporum canis, Microsporum audonii, Microsporum gypseum, M. ferrugineum, Trichosporum beigelii, Trichosporum inkiin, Aspergillus niger, Alternari naria, Acremonium, Fusarium o Scopulariopsis.*

55 **13.** Compuesto según las reivindicaciones 6, en el que el antígeno de sacárido que es específico para células de cáncer pertenece al grupo de los cánceres seleccionados de:

60 *El cáncer de vejiga, cáncer de mama, de colon y cáncer rectal, cáncer endometrial, del riñón (células renales) Cáncer, leucemia, cáncer de pulmón del melanoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de tiroides.*

14. Compound according to any of claims 1-6, wherein the average ratio of the carbohydrate antigen A to the glycolipid (L-CH-CA) es de entre 1: 4 y 1: 100 (n / n).

15. Una formulación de vacuna que comprende un compuesto o una mezcla de diferentes compuestos de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14.

Figura 1

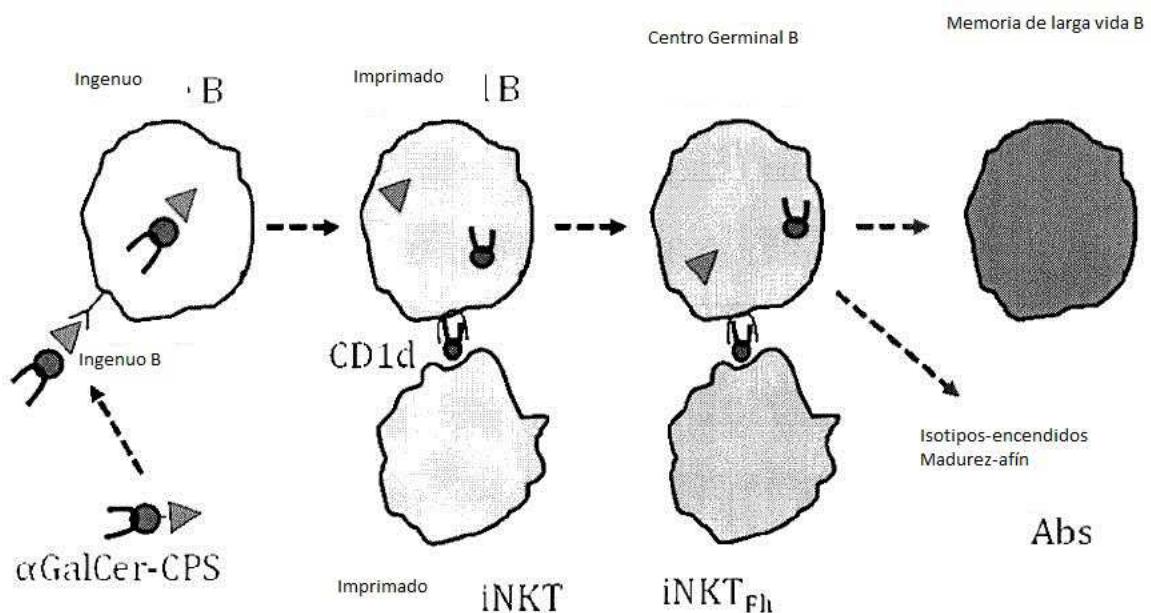


Figura 2

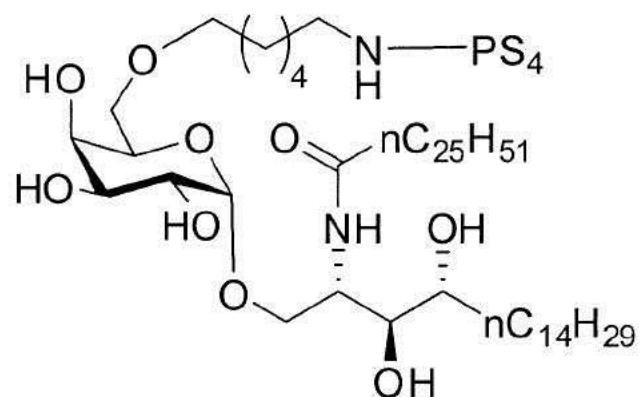
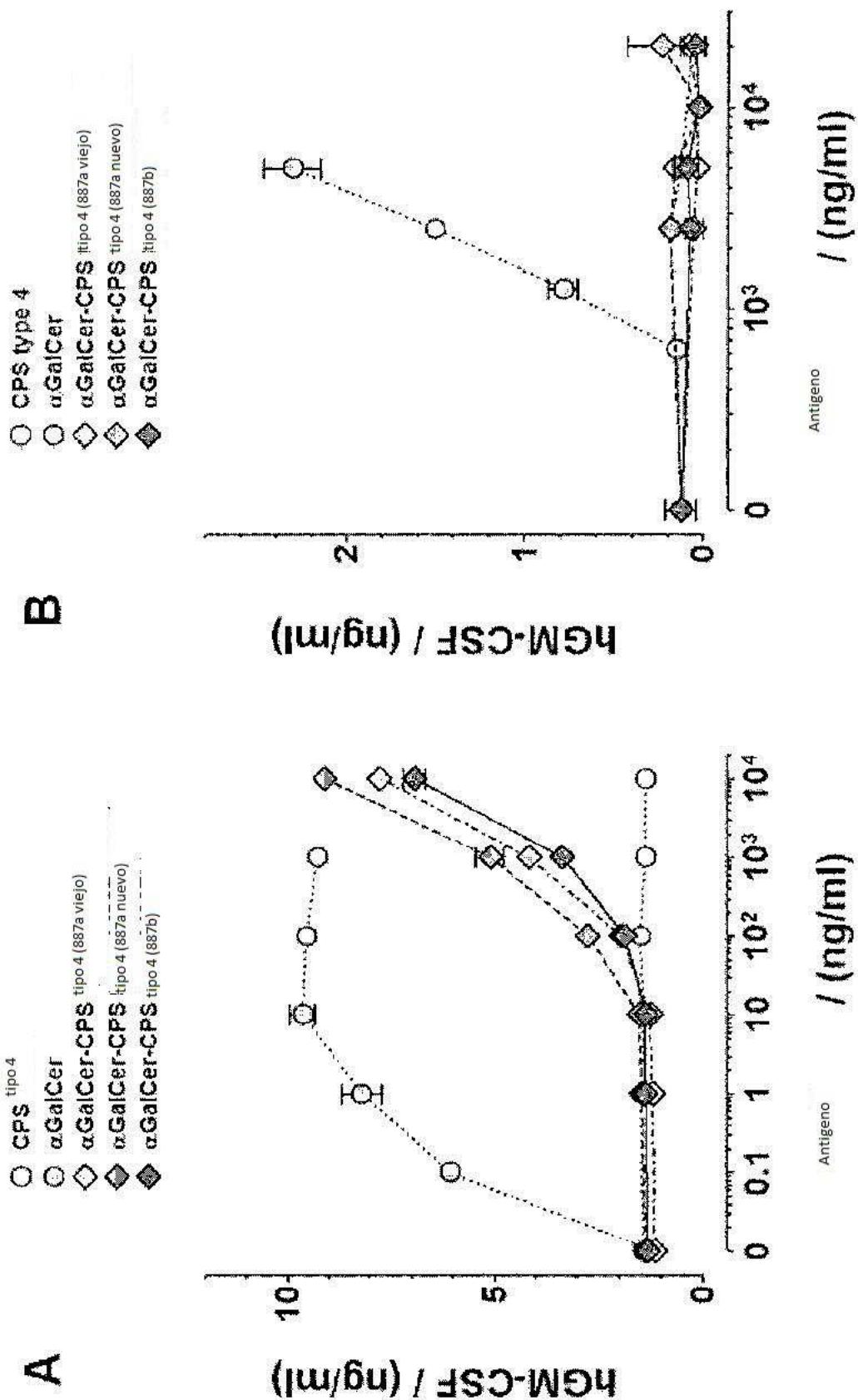


Figura 3



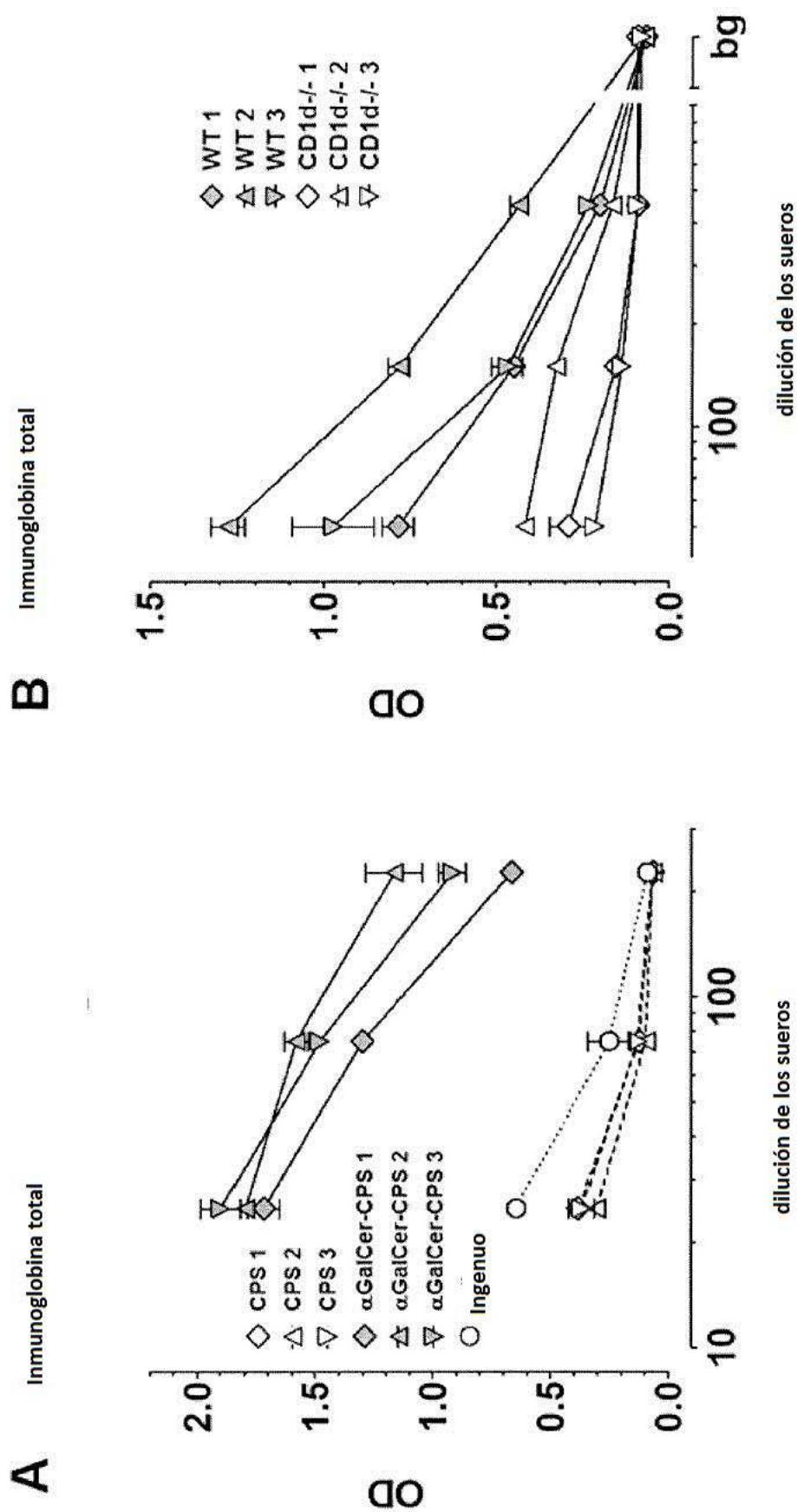


Figura 4

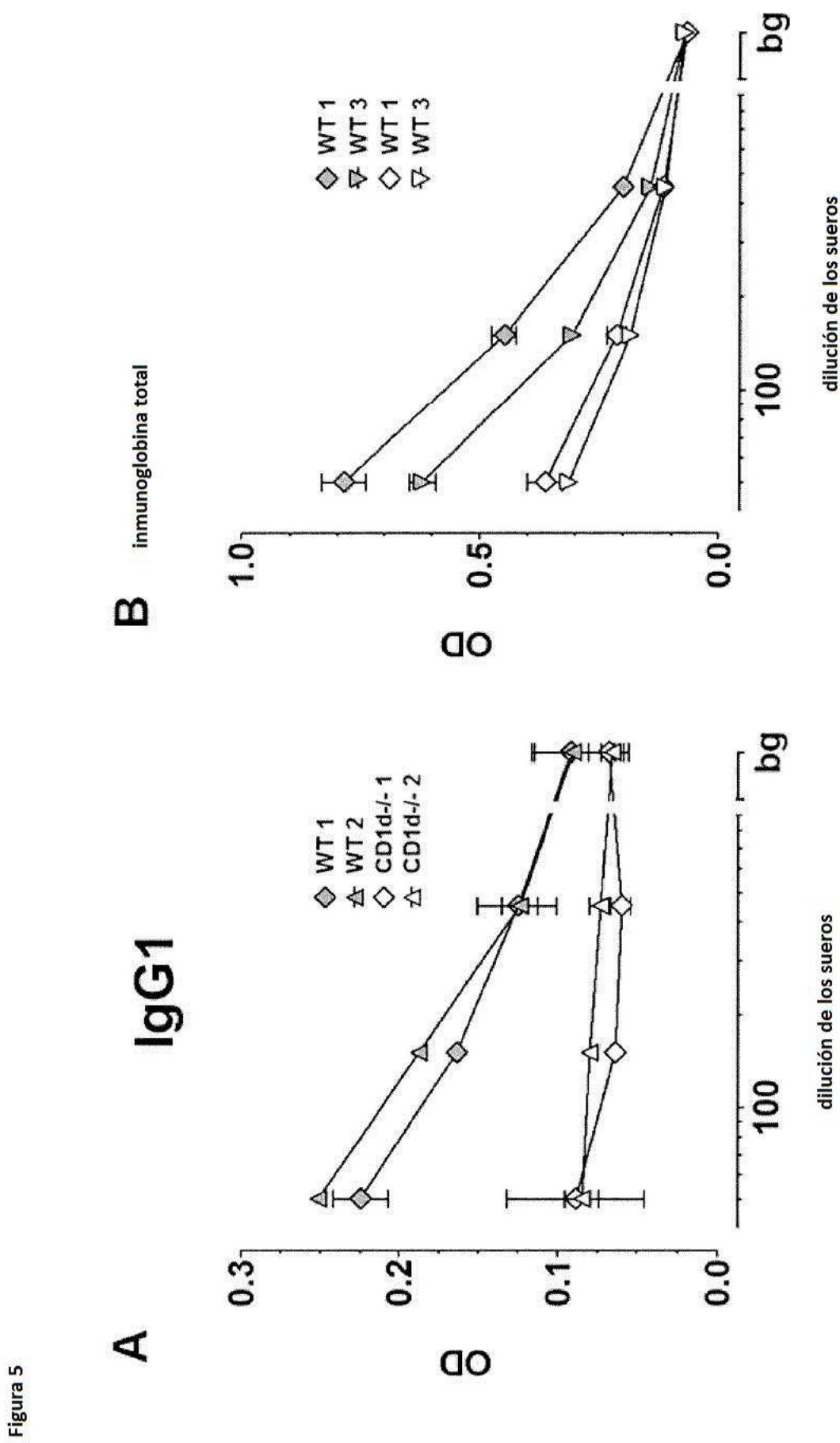


Figura 5

figura 6

Hibrídoma	Cadena pesada	CDR1	CDR2	CDR3	Mutaciones (aa/nuc)*
6C2	V1	GYSITSGYS	I-HY--SGYT	ARSANYGPM-----DYGQG	4/6
2F4	V1	GFSLTS-YG	I-W-SDGST	ARHSKLGQF-----AYWGQG	0/1
1B4	V1	GYSITSGYS	I-HY--SGYT	ARSANYGPM-----DYGQG	4/6
12F10	V1	GYSITSGYS	I-HY--SGST	ARSANYGPM-----DYGQG	2/5
2B5	V2a	GFSLTS-YG	I-W-SGGST	VRNGYVYRDF-----AYWGQG	0/0
26D2	V3	GFSLTS-YG	I-W-GDGST	AKIYYYGRN-----YAMDYWGQG	1/2
26H11	μ	GYTFTS-YY	I-IYPGNVNT	ARGGNYYYY-----AMDYWGQG	0/0
10B4	μ	GYSFTG-YN	IDPY--YGGT	ARSTGTAWF-----AYWGQG	0/0
5H3	μ	GFTFSS-YG	I-S-SGGSYT	ARLYD-GYY-VAWFAYWQG	0/0
14D3	μ	GFSLTS-YG	I-W-SGGST	ARNSGTTGWY-----FDVWQAG	0/0
18E4	μ	GFSLTS-YG	I-W-SGGST	ARNGNRAWF-----AYWGQG	0/0
16D9	μ	GYTFT-DYA	ISTY--YGN	AR-----GDW-----EDYWGQG	4/9
3E10	μ	GFSLTS-YG	I-W-SGGST	ARDGYPAWF-----AYWGQG	0/0
26F3	μ	GYTFTS-YW	I-NPSTGYT	ARGRN--HY-----FDYWGQG	0/1
25B7	μ	GFSLTD-YG	I-W-GGGST	AKQGNWADY-----YAMDYWGQG	0/0
25A8	μ	GYTFSR-YW	I-LPGSGTT	ARLIR-----Y-----FDYWGQG	3/5
21B6	μ	GYSFTG-YN	IDPY--YGGT	ARS-NWTTY-----YAMDYWGQG	0/0
18G6	μ	GYSFTG-YN	IDPY--YGGT	AR-----GY-----AMDYWGQG	0/0
18G6	μ	GYSITSDYA	I-SY--SGST	ARSIL-YGNYGDYAMDYWGQG	0/0

células	% positivo
APC alone	0
APC+C	47
APC+C + 12F10	60
APC+C + C15	37
APC+12F10	0
APC+C15	3

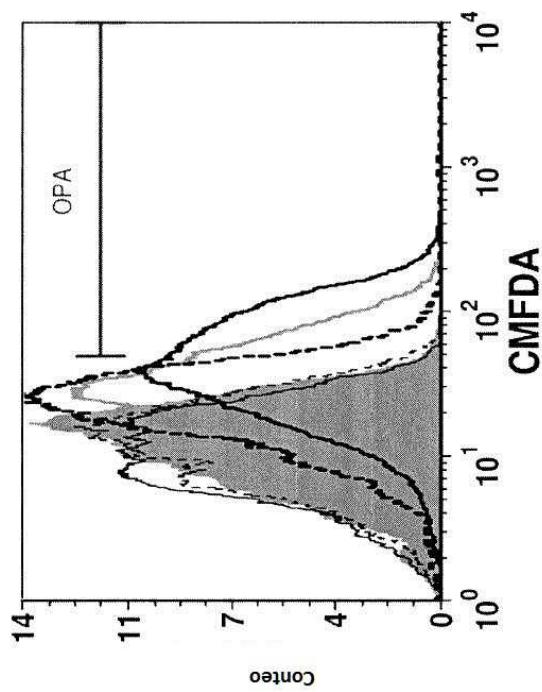


Figura 7

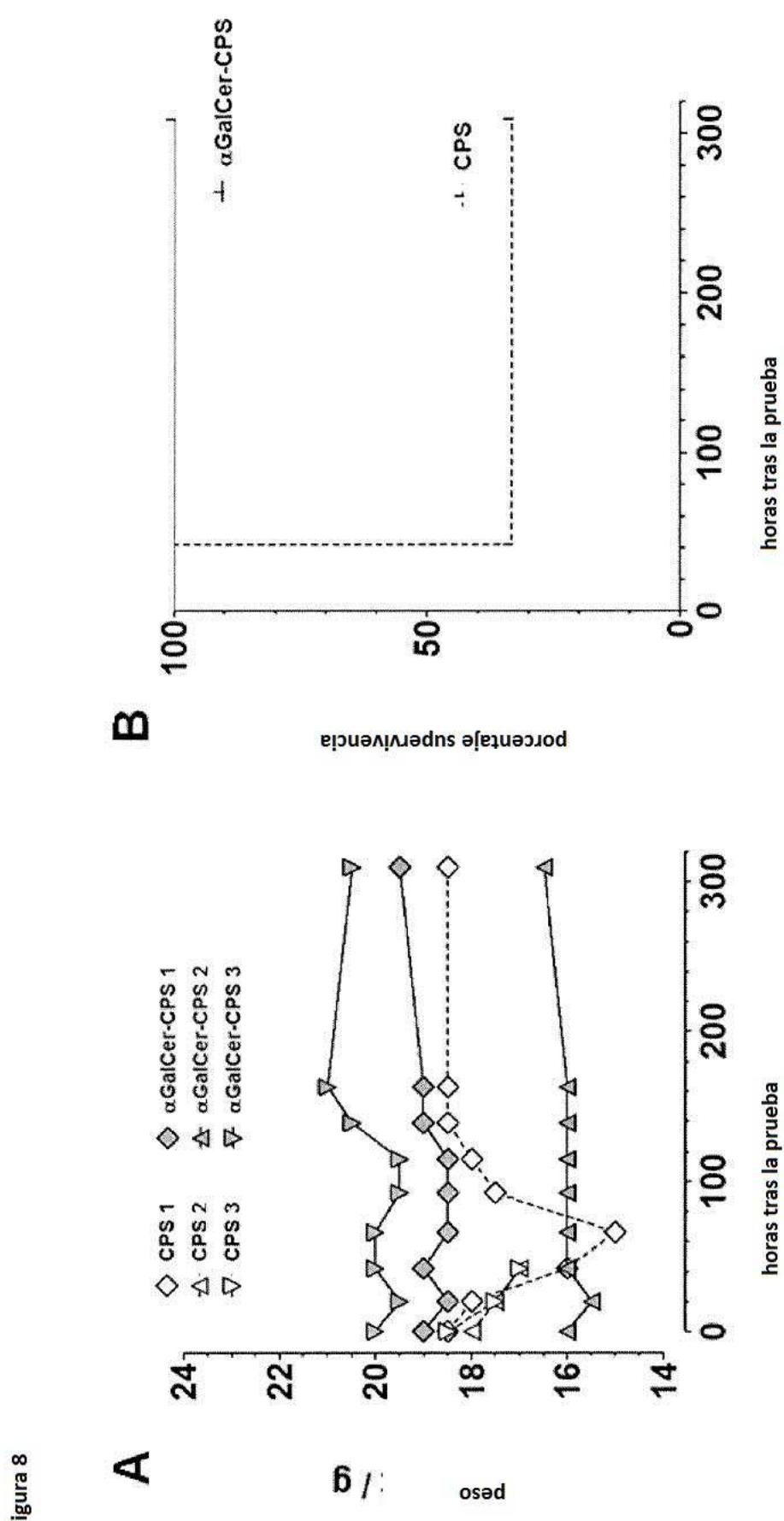


Figura 8

