

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 825**

51 Int. Cl.:

C07H 15/26 (2006.01)

C07H 15/10 (2006.01)

C07H 15/18 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008 E 08848559 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2483287**

54 Título: **Análogos de glicolípidos útiles como inmunoadyuvantes**

30 Prioridad:

12.10.2007 US 979785 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.06.2016

73 Titular/es:

**PANZA, LUIGI (100.0%)
Via Vittorio Veneto 19
22073 Fino Mornasco, IT**

72 Inventor/es:

PANZA, LUIGI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 574 825 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

5 Análogos de glicolípidos útiles como inmunoadyuvantes.

ÁREA DEL INVENTO

10 **[0001]** Este invento se refiere a análogos de glicolípidos que son ligandos para células NKT (células T eliminadoras naturales), que podrían ser utilizadas como inmuno - adyuvantes para incrementar el nivel de título de anticuerpos en el momento de la vacunación.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

15 **[0002]** Los glicolípidos revelaron recientemente una variedad de diferentes propiedades inmunológicas. Entre ellas, se ha demostrado que pueden actuar como antígenos cuando se presentan por moléculas CD1, así como que pueden mejorar la respuesta inmunológica cuando se administran en combinación con una vacuna.

20 **[0003]** Las moléculas CD1 son una familia de antígenos altamente conservados que presentan proteínas similares funcionalmente a moléculas bien conocidas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC - Major Histocompatibility Complex). Mientras que las proteínas MHC presentan a péptidos, las proteínas CD1 enlazan y muestran una variedad de lípidos y glicolípidos para los linfocitos T.

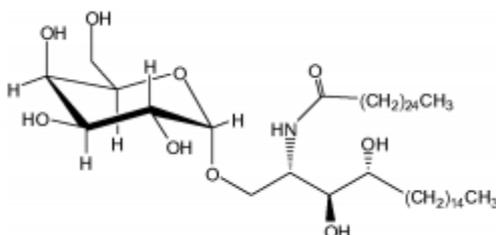
25 **[0004]** En los humanos, las varias isoformas son categorizadas como el grupo I (CD1a, b, c y e) y el grupo II (CD1d) basándose en la similitud secuencial [Calabi, F.; Jarvis, J. M.; Martin, L.; Milstein, C., Two classes of CD1 genes (Dos clases de genes CD1), Eur. J. Immunol. 1989, 19, (2), 285-92]. Las estructuras de cristal del CD1 humano a [Zajonc, D. M. et al, Nat. Immunol. (2003), 4, 808-815], hCD1b [Gadola, S. D. et al., Nat. Immunol. (2002), 3, 721-726], hCD1d [Koch, M.; et al Nat. Immunol. (2005), 6, 819-826.] Y CD1d de ratón (mCD1d - mouse CD1d) [Zeng, Z.-H. et al Science (Ciencia) (1997), 277, 339-345; Zajonc, D. M. et al. J. Exp. Med. (2005), 202, 1517-1526], algunos en complejos con sus antígenos pertinentes, han revelado como las diferencias en la topología de sus respectivas ranuras de enlace les permiten tener un nivel de especificidad de ligandos, mientras se mantiene la capacidad de presentar un conjunto diverso de lípidos antígenicos.

35 **[0005]** En particular, el mCD1d reveló una flexión general similar a las proteínas de clase I de MHC. La cadena α se dobla entre los dominios ((α 1, α 2, y α 3) y está asociada de cerca con β 2m. Los dominios distales α 1 y α 2 de la membrana forman a la ranura de enlace, que es compuesta de un piso de láminas β anti-paralelo de 8 hebras atravesada por 2 hélices α anti-paralelo [Zeng, Z.-H. et al Science (Ciencia) (1997), 277, 339-345]. Se demostró además que el mCD1d podría acomodar a colas largas de lípidos en 2 bolsillos hidrofóbicos, designados A' y F', ubicados en la ranura de enlace. Además, las estructuras de hCD1b y hCD1a demostraron que CD1, cuando está cargado con glicolípidos antígenos, enlaza a la porción lípida en una ranura hidrofóbica mientras facilita a la partícula hidrofílica de azúcar para hacer contacto con el receptor de la célula T.

40 **[0006]** Los lípidos de mamíferos y de micobacterias son conocidos por ser presentados por los CD1a, CD1b, CD1c y Co1d humanos [Porcelli, S. A. y Modlin, R. L. (1999) Annu. Rev. Immunol. 17, 297-329]. La ceramida de alfa-galactosilo (α -GalCer - Alpha-galactosyl ceramide), un lípido encontrado en la esponja marina *Agelas mauritanus*, ha sido, hasta la fecha, el ligando que ha sido más estudiado para CD1d. La α -GalCer, cuando se enlaza a CD1d, estimula una producción rápida de la citocinas Th1 y Th2 por las células T eliminadas naturales de V α 14z (células V α 14z NKT - V α 14z natural killer T cells) en ratones, y los homólogos humanos las células V α 24z NKT y pueden ser ahora considerados como un modelo antígeno. Sin embargo, la significancia fisiológica en mamíferos permanece siendo un misterio, puesto que es enigmático porque una ceramida de α -galactosilo de origen marino es un agonista tan potente.

α -GalCer:

55 **[0007]**



65 **[0008]** Las células Eliminadoras Naturales (NK - Natural Killer) comúnmente comprenden aproximadamente del 10

al 15% de la fracción celular mononuclear en la sangre periférica normal. Históricamente, las células NK fueron identificadas por primera vez por su capacidad de lisar a ciertas células tumorales sin una inmunización o una activación previa. Las células NK también realizan un rol crítico en la producción de citocina, lo cual podría estar involucrado con el control del cáncer, de infecciones y posiblemente en la implantación fetal.

[0009] La administración de α -GalCer junto con proteínas inmunogénicas resultó en una respuesta celular mejorada del NKT de CD4+ y CD8+ a antígenos solubles a través de la interacción con células dendríticas [Ian F. Hermans, 1. F. et al., J. Immunol. (2003), 171, 5140-5147]. La administración de α -GalCer también mejoró la respuesta de los linfocitos B, provocando frecuencias más altas de las células B de la memoria y niveles más altos de anticuerpos en respuesta a inmunizaciones de refuerzo [Galli G. et al, PNAS, (2007), 104; 3984-3989]. Se ha utilizado para mejorar la eficacia de ciertos antígenos peptídicos. WO 2005/000348.

[0010] US 2007/238871 A1 describe análogos de glicolípidos que sirven como ligandos para las células NKT y a métodos de su uso en la regulación de respuestas inmunológicas.

[0011] WO 2006/026389 A2 describe a alfa-galactosilceramidas y a glicosilceramidas que regulan a las células NKT. También se presentan a composiciones farmacéuticas de estos compuestos y métodos para utilizarlas en vacunas, para activar a las células NKT, para estimular al sistema inmunológico, y para tratar a mamíferos.

[0012] Wu D et al. (PNAS, 2006, 103 (11) 3972-3977) describe la estructura y función de glicosfingolípidos enlazados al CD1d de ratones.

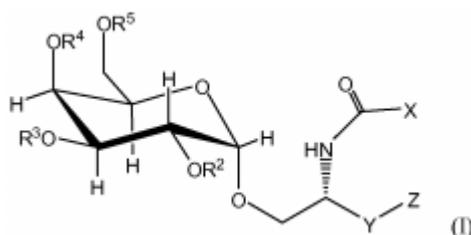
[0013] Masakazu et al. (J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 9022-9023) describe el descubrimiento que se basa en estructuras de glicolípidos para la activación de las células NKT reguladas por CD1d.

[0014] EP 1 776 963 A1 describe a hexosilceramidas como adyuvantes y sus usos en composiciones farmacéuticas, tales como en vacunas.

RESUMEN DEL INVENTO

[0015] Este invento se refiere a una nueva clase de compuestos inmunogénicos que son análogos de α -GalCer, correspondiendo a la estructura general que se muestra más adelante y métodos sintéticos nuevos para su preparación y su uso para mejorar la efectividad de vacunas. Estos compuestos suministran propiedades farmacocinéticas mejoradas por sobre α -GalCer, y son similarmente efectivos para incrementar las respuestas inmunológicas cuando un antígeno o vacuna es administrada.

[0016] En un sentido, el invento se refiere a compuestos de la fórmula I y a composiciones que contienen a aquellos compuestos:



Donde R^2 , R^3 , R^4 y R^5 representan cada uno independientemente H o a un grupo protector;

X es un grupo hidrocarbilo C4-C30 que puede ser sustituido;

Y es un alquileo C1-C6 que puede ser sustituido con hasta 2 grupos seleccionados independientemente de un enlazador halo, alquilo C1-C6, alcoxi C1-C6, haloalquilo e hidroxilo C1-C6, o alquenileno C2-C6 que puede ser sustituido con hasta 2 grupos; y Z es $-OR^1$, donde R^1 es un grupo hidrocarbilo C4-C20 que puede contener a un heteroátomo dentro de su estructura, y es opcionalmente sustituido;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

[0017] Las composiciones que contienen a un compuesto de la fórmula I podrían ser composiciones farmacéuticas, y a menudo incluyen a un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas secciones, las composiciones incluyen además a por lo menos un antígeno, que es seleccionado por su capacidad para provocar una respuesta inmunológica deseada. En ciertas secciones del invento se incluye a un compuesto de la fórmula I mezclado con una vacuna.

[0018] También se presentan a métodos para elaborar compuestos de la fórmula I, y a intermedios nuevos útiles para hacer a los compuestos de la fórmula I.

[0019] En un aspecto, el invento se refiere a compuestos de la fórmula I para su uso en un método para mejorar una respuesta inmunológica a un antígeno, donde dicho método comprende la administración de un compuesto de la fórmula I en un sujeto que es expuesto al antígeno. Este método podría ser útil para incrementar la efectividad de una vacuna para su administración a sujetos humanos.

5

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0020]

10 La **figura 1** demuestra la actividad de los compuestos sintéticos a través de la activación de hibridomas FF13 de células T cuando son presentados por APC (THP1). Como una medida de la activación de las células T, se determinó la liberación de IL2 en el medio de cultivo después de 48 horas de cultivo por medio de un ensayo ELISA. El eje Y muestra niveles de IL2 en pg/ml. El eje X es el monto de glicolípidos en microgramos/mililitro.

15 La **figura 2** resume la información de la actividad para 4 compuestos sintéticos tal como fue probado en un ensayo que mide la liberación de IL/2 por células de hibridomas de NKT contactadas con un APC expuesto a los compuestos o a a-GalCer.

20 La **figura 3** resume la información de la actividad in vivo para a-Gal GG y a-Gal LP sintéticos tal como se probó en un ensayo que midió la titulación HI en ratones Balb/C. Se muestran las titulaciones Anti-H3N2 HI.

25 La **figura 4** resume la información de la actividad in vivo para a-Gal GG y a-Gal LP sintéticos tal como se probó en un ensayo que midió las titulaciones IgG en ratones Balb/C. Las titulaciones IgG se muestran en EU/ml. Para cada triplete en el gráfico la columna representa, desde la izquierda a la derecha, B, H1N1 y H3N2.

30 La **figura 5** resume la información de la actividad in vivo para a-Gal GG y a-Gal LP sintéticos tal como se probó en un ensayo que midió las titulaciones IgG2a/IgG1 en ratones Balb/C. Las titulaciones IgG se muestran en EU/ml. Para cada pareja en el gráfico, las columnas representan, de la izquierda a la derecha, a IgG2a y IgG1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS SECCIONES

35 Los Compuestos del Invento

[0021] Tal como se utiliza aquí, el término “residuo hidrocarbilo” se refiere a un residuo que contiene solamente carbono e hidrógeno, a menos que se especifique otra forma. El residuo podría ser alifático o aromático, de una cadena lineal, cíclico, ramificado, saturado o insaturado, o cualquiera de sus combinaciones. El residuo hidrocarbilo, cuando se lo declara de esa forma, sin embargo, podría contener a heteroátomos adicionalmente a, o en vez de, los miembros carbonos e hidrógeno del grupo hidrocarbilo en sí. Por lo tanto, cuando se menciona específicamente que contiene heteroátomos, el grupo hidrocarbilo podría contener a heteroátomos dentro de la “estructura” del residuo hidrocarbilo, y cuando es sustituido opcionalmente, el residuo hidrocarbilo también podría tener uno o más grupos de carbonilos, grupos aminos, grupos hidroxilos y similares en vez de uno o más hidrógenos del residuo hidrocarbilo padre.

[0022] Tal como se utiliza en este documento, el término “residuo inorgánico” se refiere a un residuo que no contiene carbonos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, halo, hidroxilo, NO₂ o NH₂.

50 [0023] Tal como se utiliza en este documento, los términos “alquilo”, “alquenilo”, y “alquinilo” incluyen a radicales de cadenas lineales, de cadenas ramificadas e hidrocarbilos cíclicos monovalentes, y combinaciones de estos, que contienen solamente a C y a H cuando no son sustituidos. Ejemplos incluyen a metilo, etilo, isobutilo, ciclohexilo, ciclopentiletilo, 2-propenilo, 3-butilo, y similares. El número total de átomos carbonos en cada uno de esos grupos es a veces descrito en este documento, por ejemplo, cuando el grupo puede contener hasta 10 átomos carbonos puede ser representado como 1-10C o como C1-C10 o como C-10. Cuando a los heteroátomos (comúnmente N, O y S) se les permite reemplazar a átomos carbonos tal como en los grupos heteroalquilos, por ejemplo, los números que describen al grupo, aunque todavía se describen como, por ejemplo, C1-C6, representan la suma del número de átomos carbonos en el grupo más el número de aquellos heteroátomos que están incluidos en calidad de reemplazos de los átomos carbonos en el anillo o en la cadena que está siendo descrita.

60 [0024] Comúnmente, los sustituyentes de alquilos, alquenilos, y alquinilos del invento contienen a 1-10C (alquilos) o a 2-10C (alquenilo o alquinilo). Preferiblemente contienen a 1-8C (alquilo) o a 2-8C (alquenilo o alquinilo). A veces contienen a 1-4C (alquilo) o a 2-4C (alquenilo o alquinilo). Un sólo grupo puede incluir más de un tipo de enlaces múltiples, o más de un enlace múltiple; aquellos grupos están incluidos dentro de a la definición del término “alquenilo” cuando contienen a por lo menos un enlace doble carbono-carbono, y están incluidos dentro del término “alquinilo” cuando contienen a por lo menos un enlace triple carbono-carbono.

65

[0025] Los grupos alquilos, alqueniilos y alquinilos a menudo son sustituidos en la medida en que aquella sustitución haga sentido químicamente. Sustituyentes comunes incluyen, pero no se limitan a, halo, =O, =N-CN, =N-OR, =NR, OR, NR₂, SR, SO₂R, SO₂NR₂, NRSO₂R, NRCONR₂, NRCOOR, NRCOR, CN, COOR, CONR₂, OOCR, COR, y NO₂, donde R es independientemente H, un alquilo C1-C8, un heteroalquilo C2-C8, un acilo C1-C8, un heteroacilo C2-C8, un alqueniilo C2-C8, un heteroalqueniilo C2-C8, un alquiniilo C2-C8, un heteroalquiniilo C2-C8, un arilo C6-C10, o un heteroarilo C5-C10, y R es sustituido opcionalmente con halo, =O, =N-CN, =N-OR', =NR', OR', NR'₂, SR', SO₂R', SO₂NR'₂, NR'SO₂R', NR'CONR'₂, NR'COOR', NR'COR', CN, COOR', CONR'₂, OOCR', COR', y NO₂, donde cada R' es sustituido independientemente con H, alquilo C1-C8, heteroalquilo C2-C8, acilo C1-C8, heteroacilo C2-C8, arilo C6-C10 o heteroarilo C5-C10. Los grupos alquilo, alqueniilo y alquiniilo también pueden ser sustituidos por acilo C1-C8, heteroacilo C2-C8, arilo C6-C10 o heteroarilo C5-C10, cada uno de los cuales pueden ser sustituidos por los sustituyentes que son apropiados para el grupo específico.

[0026] Los términos "heteroalquilo", "heteroalqueniilo" y "heteroalquiniilo" y similares son definidos similarmente a los grupos hidrocarbilos (alquilo, alqueniilo y alquiniilo) correspondientes, pero los términos "hetero" se refieren a grupos que contienen 1-3 heteroátomos de O, S o N o sus combinaciones dentro del residuo estructural; por lo tanto, por lo menos un átomo carbono de un grupo alquilo, alqueniilo y alquiniilo correspondiente es reemplazado por uno de los heteroátomos especificados para formar a un grupo heteroalquilo, heteroalqueniilo o heteroalquiniilo. Los tamaños comunes y preferidos para los heteroátomos de los grupos alquilos, alqueniilos y alquiniilos son generalmente los mismos que para los grupos hidrocarbilos correspondientes, y los sustituyentes que podrían estar presentes en las heteroformas son los mismos que aquellos descritos anteriormente para los grupos hidrocarbilos. Por razones de estabilidad química, también se entiende que, a menos que se especifique de otra forma, aquellos grupos no incluyen más de 2 heteroátomos contiguos excepto cuando un grupo oxo está presente en N o S, tal como un grupo nitro o sulfonilo.

[0027] Mientras que el término "alquilo" tal como se utiliza en este documento incluye a los grupos cicloalquilo y cicloalquilalquilo, el término "cicloalquilo" podría ser utilizado en este documento para describir a un grupo aromático carbocíclico que está conectado por medio de un átomo carbono, y el término "cicloalquilalquilo" podría ser utilizado para describir a un grupo no aromático carbocíclico que está conectado a la molécula a través de un enlazador alquilo. Asimismo, el término "heterociclilo" podría ser utilizado para describir a un grupo cíclico no aromático que contiene por a lo menos un heteroátomo como un miembro anular y que está conectado a la molécula por medio de un átomo anular, que podría ser C o N; y el término "heterocicilalquilo" podría ser utilizado para describir un grupo que está conectado a otra molécula a través de un enlazador. Los tamaños y sustituyentes que son adecuados para los grupos cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo y heterocicilalquilo son los mismos que aquellos descritos anteriormente para los grupos alquilos. Tal como se utiliza en este documento, estos términos también incluyen anillos que contienen 1 o 2 enlaces dobles, siempre y cuando el anillo no sea aromático.

[0028] Tal como se utiliza en este documento, el término "acilo" abarca a grupos que contienen a radicales alquilos, alqueniilos, alquiniilos, arilos o arilalquilos adheridos a uno de las 2 posiciones disponible de valencia de un átomo carbono carbonilo, y heteroacilo se refiere a los grupos correspondientes donde por lo menos un carbono aparte del carbono carbonilo ha sido reemplazado por un heteroátomo escogido de N, O y S. Por lo tanto, los heteroacilos incluyen, por ejemplo, a -C(=O)OR y -C(=O)NR₂ así como los -C(=O)-heteroarilos.

[0029] Los grupos acilos y heteroacilos están enlazados a cualquier grupo o molécula a la cual estén adheridos a través de una valencia abierta del átomo carbono carbonilo. Comúnmente, son grupos acilos C1-C8, que incluyen a los grupos formilos, acetilos, pivaloilos y benzoilos, y heteroacilos C2-C8, que incluyen a metoxiacetilos, etoxicarbonilos, y 4-piridinilois. Los grupos hidrocarbilos, los grupos arilos y las heteroformas de aquellos grupos que comprenden a grupos acilos y heteroacilos pueden ser sustituidos con los sustituyentes descritos en este documento como sustituyentes adecuados generalmente para cada uno de los componentes correspondientes del grupo acilo o heteroacilo.

[0030] Las partículas "aromáticas" o partículas "arilas" se refieren a partículas monocíclicas o bicíclicas fusionadas que tienen características bien conocidas de aromaticidad; ejemplos incluyen al fenilo y al naftilo. Asimismo, el término "heteroaromático" y "heteroarilo" se refieren a aquellos sistemas anulares monocíclicos o bicíclicos fusionados que contienen como miembros anulares a uno o más heteroátomos seleccionados de O, S y N. La inclusión de un heteroátomo habilita la aromaticidad en anillos de 5 miembros, así como en anillos de 6 miembros. Sistemas comunes heteroaromáticos incluyen a grupos aromáticos C5-C6 monocíclicos tales como piridilos, pirimidilos, piraciniilos, tienilos, furanilos, pirrolilos, pirazolilos, tiazolilos, oxazolilos, e imidazolilos y partículas bicíclicas fusionadas formadas al fusionar a uno de estos grupos monocíclicos con un anillo fenilo o con cualquiera de los grupos monocíclicos heteroaromáticos para formar un grupo bicíclico C8-C10 tal como el indolilo, bencimidazolilo, indazolilo, benzotriazolilo, isoquinolilo, quinolilo, benzotiazolilo, benzofuranilo, pirazolopiridilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, cinnolinilo, y similares. Cualquier sistema monocíclico o bicíclico anular fusionado que tiene las características de aromaticidad en términos de distribución de electrones a través del sistema anular está incluido en esta definición. También incluye a grupos bicíclicos cuando por lo menos el anillo que está directamente adherido al resto de la molécula tiene las características de aromaticidad. Comúnmente, el sistema anular contiene a 5-12 átomos miembros anulares. Preferiblemente, los heteroarilos monocíclicos contienen a 5-6 miembros anulares,

y los heteroarilos bicíclicos contienen a 8-10 miembros anulares.

[0031] Las partículas arilas y heteroarilas podrían ser sustituidas con una variedad de sustituyentes incluyendo a alquilo C1-C8, alqueno C2-C8, alquino C2-C8, arilo C5-C12, acilo C1-C8, y heteroformas de estos, cada una de las cuales puede por sí misma ser sustituida aún más; otros sustituyentes para partículas arilas y heteroarilas incluyen a halo, OR, NR2, SR, SO2R, SO2NR2, NRSO2R, NRCONR2, NRCOOR, NRCOR, CN, COOR, CONR2, OOCR, COR, y NO2, donde R es independientemente H, alquilo C1-C8, heteroalquilo C2-C8, alqueno C2-C8, heteroalqueno C2-C8, alquino C2-C8, heteroalquino C2-C8, arilo C6-C10, heteroarilo C5-C10, arilalquilo C7-C12, o heteroarilalquilo C6-C12, y cada R es sustituida opcionalmente tal como se describió anteriormente para los grupos alquilos. Los grupos sustituyentes en un grupo arilo o heteroarilo podrían, desde luego, ser sustituidos aún más con los grupos descritos en este documento como adecuados para cada tipo de aquellos sustituyentes o para cada componente del sustituyente. Por lo tanto, por ejemplo, un sustituyente arilalquilo podría ser sustituido en la porción arila con los sustituyentes aquí descritos como comunes para los grupos arilos, y podría ser sustituido aún más en la porción alquila con los sustituyentes aquí descritos como comunes y adecuados para los grupos alquilos.

[0032] Asimismo, el término "arilalquilo" y "heteroarilalquilo" se refiere a sistemas anulares aromáticos y heteroaromáticos que son enlazados a sus puntos de adherencia a través de un grupo de enlace tal como un alqueno, incluyendo a enlazadores cíclicos o acíclicos, saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos. Comúnmente, el enlazador es un alquilo C1-C8 en una de sus heteroformas. Estos enlazadores podrían incluir además a un grupo carbonilo, facilitándolos, por lo tanto, para suministrar sustituyentes como una partícula acila o heteroacila. Un anillo arilo o heteroarilo en un grupo arilalquilo o heteroarilalquilo podría ser sustituido con los mismos sustituyentes descritos anteriormente para los grupos arilos. Preferiblemente, un grupo arilalquilo incluye a un anillo fenilo sustituido opcionalmente con los grupos definidos anteriormente para los grupos arilos y un alqueno C1-C4 que no ha sido sustituido o que ha sido sustituido con 1 o 2 grupos alquilos C1-C4 o grupos heteroalquilos, donde los grupos alquilos o heteroalquilos pueden ciclar para formar a un anillo tal como un ciclopropano, dioxolano, u oxaciclopentano. Asimismo, un grupo heteroarilalquilo incluye preferiblemente a un grupo heteroarilo monocíclico C5-C6 que es sustituido opcionalmente con los grupos descritos anteriormente como sustituyentes típicos de grupos arilos y un alqueno C1-C4 que no es sustituido o que es sustituido con 1 o 2 grupos alquilos o grupos heteroalquilos C1-C4, o incluye un anillo fenilo sustituido opcionalmente o un heteroarilo monocíclico C5-C6 y un heteroalqueno C1-C4 que es no sustituido o sustituido con 1 o 2 grupos alquilos o heteroalquilos C1-C4, donde los grupos alquilos o heteroalquilos pueden ciclar opcionalmente para formar un anillo tal como el ciclopropano, el dioxolano o el oxaciclopentano.

[0033] Cuando un grupo arilalquilo o heteroarilalquilo es descrito como sustituido opcionalmente, los sustituyentes podrían estar en la porción alquila o heteroalquila o en la porción arila o heteroarila del grupo. Los sustituyentes que se presentan opcionalmente en la porción alquila o heteroalquila son los mismos que aquellos descritos anteriormente para los grupos alquilos generalmente; los sustituyentes opcionalmente presentes en la porción arila o heteroarila son los mismos que aquellos descritos anteriormente para los grupos arilos generalmente.

[0034] Los grupos "arilalquilos" tal como se utilizan en este documento son grupos hidrocarbilos si no son sustituidos, y son descritos por el número total de átomos carbonos en el anillo y en el alqueno o en un enlazador similar. Por lo tanto, un grupo bencilo es un grupo arilalquilo C7-, y el feniletilo es un arilalquilo C8-.

[0035] El término "heteroarilalquilo" tal como se describió anteriormente se refiere a una partícula que comprende a un grupo arilo que es adherido a través de un grupo enlazador, y se diferencia del "arilalquilo" en que por lo menos un átomo anular de la partícula arila o un átomo en el grupo enlazador es un heteroátomo seleccionado de N, O y S. Los grupos heteroarilalquilos son descritos en este documento de acuerdo al número total de átomos en el anillo y en el enlazador combinados, y ellos incluyen a los grupos arilos enlazados a través de un enlazador heteroalquilo; a los grupos heteroarilos enlazados a través de un enlazador hidrocarbilo tal como un alqueno; y a grupos heteroarilos enlazados a través de un enlazador heteroalquilo. Por lo tanto, por ejemplo, un heteroarilalquilo C7- incluiría a piridimetilos, fenoxis y N-pirrolinotoxi.

[0036] El término "alqueno" tal como se utiliza en este documento se refiere a un grupo hidrocarbilo bivalente; puesto que es bivalente, puede enlazar a otros 2 grupos entre sí. Comúnmente, se refiere a $-(CH_2)_n$ donde n es 1-8 y preferiblemente n es 1-4, donde cuando se ha especificado, un alqueno también puede ser sustituido por otros grupos, y puede tener otras longitudes, y las valencias abiertas no necesitan estar en extremos opuestos de una cadena. Por lo tanto, $-CH(Me)-$ y $-C(Me)_2-$ también podría ser denominados alquenos, así como un grupo cíclico tal como ciclopropan-1,1-diilo. En los casos en los que un grupo alqueno es sustituido, los sustituyentes incluyen aquellos comúnmente presentes en los grupos alquilos tal como se describe en este documento.

[0037] En general, cualquier grupo alquilo, alqueno, alquino, acilo o arilo o arilalquilo o cualquier heteroforma de uno de estos grupos que es contenida en un sustituyente podría, en sí, ser sustituida opcionalmente por sustituyentes adicionales. La naturaleza de estos sustituyentes es similar a aquellos mencionados en referencia a los sustituyentes primarios per se, sí los sustituyentes no son descritos de otra forma. Por lo tanto, en los casos en los que una modalidad de, por ejemplo, R^7 es alquilo, el alquilo podría ser sustituido opcionalmente por los sustituyentes remanentes listados como modalidades de R^7 en los casos en los que esto hace sentido químico, y

donde esto no reduce el límite de tamaño suministrado para el alquilo per se; por ejemplo, un alquilo sustituido por un alquilo o por un alqueno simplemente extendería el límite superior de los átomos carbonos para estas modalidades, y eso no está incluido dentro del enfoque del invento. Sin embargo, un alquilo sustituido por un arilo, un amino, un alcoxi, =O, y similares estaría incluido dentro del enfoque del invento, y los átomos de estos grupos sustituyentes no están contados en el número utilizado para describir al grupo alquilo, al alqueno, etcétera que se está describiendo. Cuando ningún número de sustituyentes es especificado, cada uno de aquellos grupos como alquilos, alquenos, alquinos, acilos o arilos podrían ser sustituidos con un número de sustituyentes de acuerdo a sus valencias disponibles; en particular, cualquiera de estos grupos podría ser sustituido con, por ejemplo, átomos de flúor en cualquiera o en todas sus valencias disponibles.

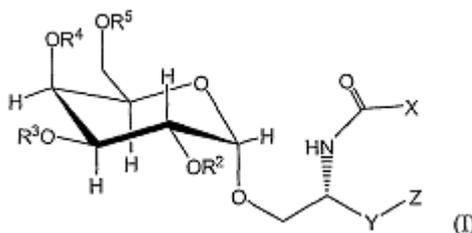
[0038] El término "heteroforma" tal como se utiliza en este documento se refiere a un derivado de un grupo tal como un alquilo, un arilo o un acilo, donde por lo menos un átomo carbono del grupo carbocíclico designado ha sido reemplazado por un heteroátomo seleccionado de N, O y S. Por lo tanto, los heteroátomos de alquilos, alquenos, alquinos, acilos, arilos, y arilalquilos son heteroalquilos, heteroalquenos, heteroalquinos, heteroacilos, heteroarilos y heteroarilalquilos, respectivamente. Debe entenderse que no más de 2 átomos de N, O o S son conectados ordinariamente en una forma secuencial, excepto cuando un grupo oxo está adherido a N o S para formar un grupo nitro o sulfonilo. En los casos en que un grupo que está descrito puede contener a heteroátomos opcionales dentro de la estructura o de, por ejemplo, la cadena alquila, los heteroátomos son seleccionados de N, O y S, a menos que se especifique de otra forma.

[0039] El término "opcionalmente sustituidos" tal como se utiliza en este documento indica que el grupo o los grupos particulares que se están describiendo podrían tener sustituyentes no hidrógenos, o el grupo o los grupos podrían tener uno o más sustituyentes no hidrógenos. Si no se especifica de otra forma, el número total de aquellos sustituyentes que podrían estar presentes es igual al número de átomos H presentes en la forma no sustituida del grupo que se está describiendo. Cuando un sustituyente opcional está adherido por medio de un enlace doble, tal como un oxígeno carbonilo (=O), el grupo absorbe a 2 valencias disponibles, así que el número total de sustituyentes que podrían incluirse es reducido de acuerdo al número de valencias disponibles.

[0040] El término "halo", tal como es utilizado en este documento incluye a flúor, cloro, bromo y yodo. Lo que se prefiere a menudo es flúor y cloro.

[0041] El término "aminos" tal como se utiliza en este documento se refiere a NH_2 , pero en los casos en los que un amino es descrito como "sustituido" u "opcionalmente sustituido", el término incluye a $\text{NR}'\text{R}''$ donde cada R' y R'' es independientemente H, o es un grupo alquilo, alqueno, alquino, acilo, arilo o arilalquilo o una heteroforma de uno de estos grupos, y cada uno de los grupos alquilo, alqueno, alquino, acilo, arilo o arilalquilo o las heteroformas de uno de estos grupos es sustituido opcionalmente con los sustituyentes descritos en este documento tal como sea adecuado para el grupo correspondiente. El término también incluye formas donde R' y R'' están enlazados en conjunto para formar un anillo de 3-8 miembros que podría ser saturado, insaturado o aromático y que contiene a 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O y S como miembros anulares, y que es sustituido opcionalmente con los sustituyentes descritos como adecuados para los grupos alquilos o, si $\text{NR}'\text{R}''$ es un grupo aromático, es sustituido opcionalmente con los sustituyentes descritos como comunes para los grupos heteroarilos.

[0042] En un aspecto, el invento suministra compuestos de la fórmula I:



donde R^2 , R^3 , R^4 y R^5 representan cada uno independientemente a H o a un grupo protector;

X es un grupo hidrocarbilo C₄-C₃₀ que puede ser sustituido;

Y es un alqueno C₁-C₆ que puede ser sustituido con hasta 2 grupos seleccionados independientemente de un enlazador halo, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, haloalquilo e hidroxilo C₁-C₆, o alqueno C₂-C₆ que puede ser sustituido con hasta 2 grupos;

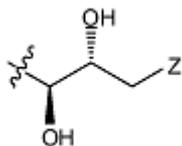
y Z es OR^1 , donde R^1 es un grupo hidrocarbilo C₄-C₂₀ que puede contener un heteroátomo dentro de su estructura, y es opcionalmente sustituido;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

[0043] En la fórmula I, cada uno de R^2 , R^3 , R^4 y R^5 puede ser H, o uno o más de estos pueden ser un grupo protector. En algunas secciones, R^2 y R^3 , o R^3 y R^4 , o R^4 y R^5 pueden estar unidos entre sí en un anillo; por ejemplo, cualquiera de estas parejas podría representar a un grupo protector acetónido. El 'grupo protector' incluye a los grupos convencionales acilos, alquilos, arilalquilos, sililos, y de otro tipo usados comúnmente para la protección de un hidroxilo durante síntesis orgánicas. Ejemplos específicos incluyen a metilos, formilos, acetilos, metoxiacetilos, trimetilsililos, t-butildimetilsililos, metoximetilos, 2-trimetilsililetoximetilos, bencilos, dimetoxibencilos, alilos, metoxycarbonilos, aliloxycarbonilos, tricloroetoxycarbonilos, benciloxycarbonilos, y similares. En particular, cada uno de R^2 , R^3 , R^4 y R^5 pueden ser un grupo acilo C1-C10 sustituido opcionalmente, tal como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, benzoilo, metoxycarbonilo, benciloxycarbonilo o bencil-oxycarbonilo, t-butoxycarbonilo sustituidos o un grupo arilmetilo opcionalmente sustituido tal como un bencilo, un metoxibencilo o undimetoxibencilo. Los compuestos donde uno o más de R^2 , R^3 , R^4 y R^5 representan a uno de estos grupos protectores, y los restantes son cada uno H, son particularmente preferidos, porque pueden servir como intermedios para la síntesis de compuestos adicionales del invento, por medio de modificaciones que son bien conocidas en la industria incluyendo más desprotecciones; y también pueden ser administrados como inmuno-adyuvantes que actúan ya sea directamente o después de una conversión in vivo a un compuesto donde cada uno de R^2 , R^3 , R^4 y R^5 es H.

[0044] En la fórmula I, X es preferiblemente una cadena lineal o un hidrocarburo ramificado que tiene 4-30 carbonos, y preferiblemente contiene a 10-30 carbonos. Los grupos alquilos de cadenas lineales que tienen 20-30 carbonos son preferidos, y un grupo alquilo de 25 carbonos a veces es preferido. Frecuentemente, X es un grupo alquilo, pero en algunas secciones es un grupo alqueno o un grupo alquino. X puede no ser sustituido o puede ser sustituido con uno o más sustituyentes adecuados para un grupo alquilo. Sustituyentes preferidos para X incluyen a halos, particularmente a F; y alcoxis, particularmente a alcoxis C1-C6 tales como metoxis, etoxis, isopropoxis y similares.

[0045] Y puede ser un alqueno C1-C6 o un alqueno C 2-C6, y puede ser no sustituida o puede ser sustituida con uno o más grupos que a menudo son seleccionados de halo, alquilo C1-C6, alcoxi C1-C6, haloalquilo C1-C6, e hidroxilo cuando Y es un alqueno. Cuando Y es un alqueno, los sustituyentes preferidos incluyen a halo, a alquilo C1-C6, a alcoxi C1-C6 y a haloalquilo C1-C6. En los casos en los que 2 sustituyentes están presentes en Y, ya sea en un carbono individual o en carbonos conectados adyacentemente, los sustituyentes pueden ser apuntados entre sí para formar un anillo que tenga de 5-6 miembros y opcionalmente tenga hasta 2 heteroátomos seleccionados de N, O y S en calidad de miembros anulares. En algunas secciones, Y es CH_2 o CH_2CH_2 o $(\text{CH}_2)_3$ o $(\text{CH}_2)_4$, o una versión en la cual el hidroxilo ha sido sustituido de uno de estos. En otras secciones, Y es $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$. En ciertas secciones, -Y-Z es representado por esta fórmula:



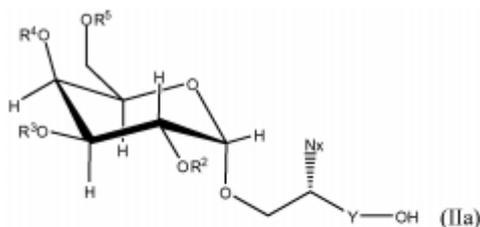
donde Z es tal como se definió anteriormente.

[0046] Z es un grupo $-\text{OR}^1$, donde R^1 es un grupo hidrocarburo C4-C20 que puede contener a un heteroátomo dentro de su estructura, cuyo heteroátomo es a veces O y a veces N o S, y R^1 puede ser no sustituido o puede ser sustituido. Preferiblemente R^1 es un grupo alquilo C4-C20 que puede ser no sustituido o puede ser sustituido, o es un grupo de la fórmula general $-(\text{CH}_2)_m-\text{OR}^{1b}$, donde m es 1-6 y R^{1b} es un grupo alquilo, un cicloalquilo, o un cicloalquilalquilo C1-C16, y R^{1b} puede ser no sustituido o puede ser sustituido con los grupos presentes comúnmente en los grupos alquilos, tales como un hidroxilo, un alcoxi C1-C6, un halo, y similares.

[0047] En ciertas modalidades de Z, R^1 es una cadena alqueno C1-C6 enlazada a un anillo cicloalquilo, arilo o heteroarilo, por ejemplo, un grupo de la fórmula $-(\text{CH}_2)_r-\text{Rg}$ donde r es un número entero desde 1-6 y Rg representa un anillo que puede ser un anillo alicíclico o heterocíclico de 3-8 miembros, o un grupo aromático o heteroaromático de 5-10 miembros; y Rg puede ser sustituido. Ejemplos adecuados incluyen a $-(\text{CH}_2)_2-4-\text{Rg}$, donde Rg es un grupo monocíclico de 3-8 miembros, tal como ciclopropilos, ciclopentilos, ciclohexilos, furanilos, tetrahidrofuranilos, piranilos, tetrahidropiranilos, fenilos, piridilos, pirimidinilos, tienilos, y similares.

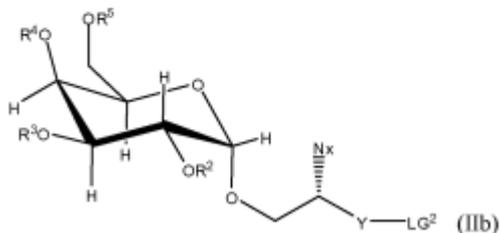
[0048] La presentación también suministra un método sintético nuevo que involucra formar al enlace glucosídico entre la galactosa y la porción aglicona que adhiere al carbono anomérico del anillo galactosilo antes de la formación de la porción lipida de la porción esfingosina. También suministra intermedios útiles de la fórmula (IIa) e (IIb) para elaborar a compuestos del invento. Por lo tanto, la presentación suministra métodos para elaborar a los compuestos de la fórmula I tal como se describe anteriormente, utilizando intermedios de la fórmula general IIa o IIb:

5



10

15



20

25 donde N_x es un grupo nitrógeno protegido, tal como en N_3 , $NHC(O)X$, $NHC(O)J$, o una imida tal como una succinimida o unaftalimida; donde J puede ser un grupo alquilo C1-C10 sustituido opcionalmente o un alcoxi C1-C10 sustituido opcionalmente o benciloxi sustituido opcionalmente; y Y y R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son tal como se definen en la fórmula I.

30 **[0049]** Para los compuestos de la fórmula IIa e IIb, cada uno de R^2-R^6 es preferiblemente un grupo protector, y no H. Grupos protectores preferidos incluyen a grupos removidos fácilmente bajo condiciones reductoras o hidrogenolíticas, tales como el bencilo, el difenilmetilo, el benciloximetilo, el benciloxicarbonilo, y similares.

35 **[0050]** Ciertos compuestos del invento pueden ser obtenidos de intermedios comunes de este tipo, tal como se ilustra con los compuestos 7 y 10, utilizando métodos que son conocidos generalmente en la industria. Los intermedios que se muestran como ejemplo por los compuestos 7 y 10 son entregados convenientemente de un disacárido protegido apropiadamente de α -D-galactopiranosil-(1-5)-lixofuranosa, en el cual la partícula lixosa es la precursora de la parte polar del análogo de esfingosina, tal como se muestra más adelante. Otros compuestos del invento pueden ser hechos similarmente, utilizando materiales iniciales alternativos en vez de la lixofuranosa, para suministrar intermedios tales como IIa e IIb. Estos contienen un grupo N_x que puede ser acilamina - $NHC(O)X$ de la fórmula I, o puede ser un nitrógeno protegido tal como azida ($-N_3$) o una succinimida o una amina acilada - $NHC(O)J$ que puede ser cubierta en una amina libre ($-NH_2$) o en la acilamina - $NHC(O)X$ de la fórmula I por medio de métodos convencionales. En estas aminas aciladas, J puede ser un grupo alquilo C1-C10 sustituido opcionalmente, tal como metoxi, etoxi, 2,2,2-tricloroetoxi, o t-butoxi; o puede ser un grupo benciloxi sustituido opcionalmente tal como benciloxi, metoxibenciloxi, dimetoxibenciloxi y similares. Éstos pueden ser removidos del nitrógeno para suministrar a una amina libre (NH_2) por medio de métodos ampliamente conocidos en la industria, y la amina libre (NH_2) puede ser acilada usando condiciones convencionales de acilación para introducir al grupo $-C(O)X$ de la fórmula I. La azida puede ser reducida y acilada similarmente tal como se muestran en los ejemplos de este documento. En los casos en que N_x es una imida, esta puede ser convertida a la amina libre por métodos conocidos tales como el tratamiento con hidracina.

50 **[0051]** Los intermedios 7 o 10 puede ser aquilatados en el grupo hidroxilo libre o modificados en cualquiera de otras numerosas formas para generar a varios compuestos del invento, que contienen a varios grupos R^1 que pueden ser lineales o ramificados, saturados o insaturados, y pueden contener a anillos alifáticos o aromáticos, heteroátomos u otros grupos funcionales. Ejemplos representativos de aquellos métodos incluyen a la alquilación de un compuesto alcohólico de la fórmula IIa con un agente alquilante R^1-LG^1 , y la alquilación de un alcohol de la fórmula R^1-OH con un compuesto de la fórmula IIb, bajo condiciones conocidas tales como las condiciones de éter de Williamson, donde la base es utilizada para promover la reacción de alquilación, y las condiciones Mitsunobu, donde una fosfina y un azodicarboxilato son usados comúnmente para promover la reacción de alquilación.

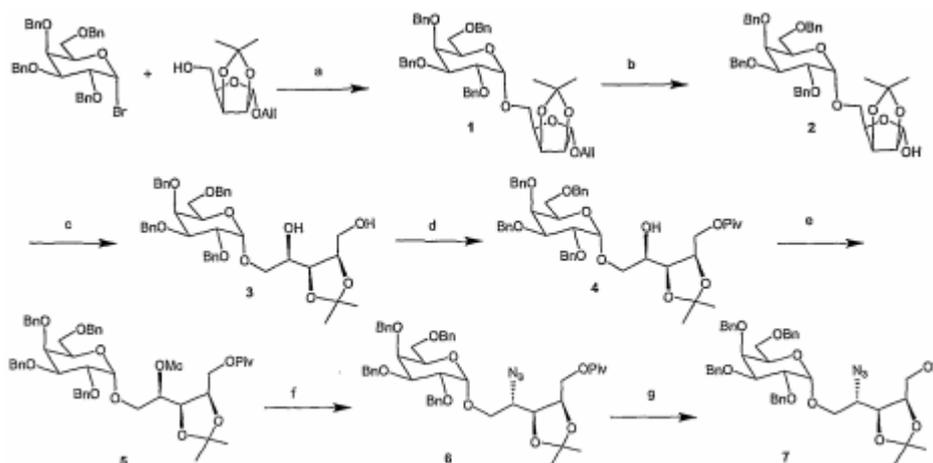
60 **[0052]** Un intermedio de la fórmula IIa podría ser O-alquilado con un agente alquilante LG^1-R^1 para producir un compuesto de la fórmula I. R^1 puede ser cualquiera de los grupos descritos anteriormente para R^1 en la fórmula I. Alternamente, un intermedio de la fórmula IIb que tiene un grupo que abandona LG^2 podría ser preparado, por ejemplo, de un compuesto de la fórmula IIa por medio de sistemas convencionales tales como una sulfonación con un cloruro de sulfonilo o anhídrido sulfónico, o una conversión a un alumno utilizando condiciones conocidas tales

65

como CBr₄ y trifenilfosfina. El compuesto de la fórmula IIb es utilizado entonces para alquilar un alcohol de la fórmula HBO-R¹, suministrando un compuesto de la fórmula I. R¹ en estas condiciones es tal como se definió anteriormente, y puede estar en una forma protegida, si comprende a un hidroxilo libre o a una amina libre. LG¹ y LG² en estas reacciones representan a grupos convencionales que abandonan, y a menudo son seleccionados de Cl, Br, I, y sulfonatos de alquilo o de arilos sustituidos opcionalmente, por ejemplo, -OSO₂-J', donde J' es un alquilo C1-C10 sustituido opcionalmente o un arilo sustituido opcionalmente. Sulfonatos de alquilo o arilos adecuados que LG¹ y/o LG² pueden representar incluyen, por ejemplo, a mesilato (metanosulfonato), tosilato (toluenesulfonato), fenilsulfonato, trifluorometilsulfonato (triflato), y similares.

[0053] Mientras se ilustra por medio de esquemas y de ejemplos utilizando a grupos protectores específicos en el grupo de galactosas, otros grupos protectores pueden ser utilizados tal como es conocido en la industria y tal como se debate en este documento brevemente. Grupos y métodos protectores adecuados para instalar y removerlos son descritos en Wuts y Greene, Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en Síntesis Orgánica), 4^a ed., Wiley Press (2006).

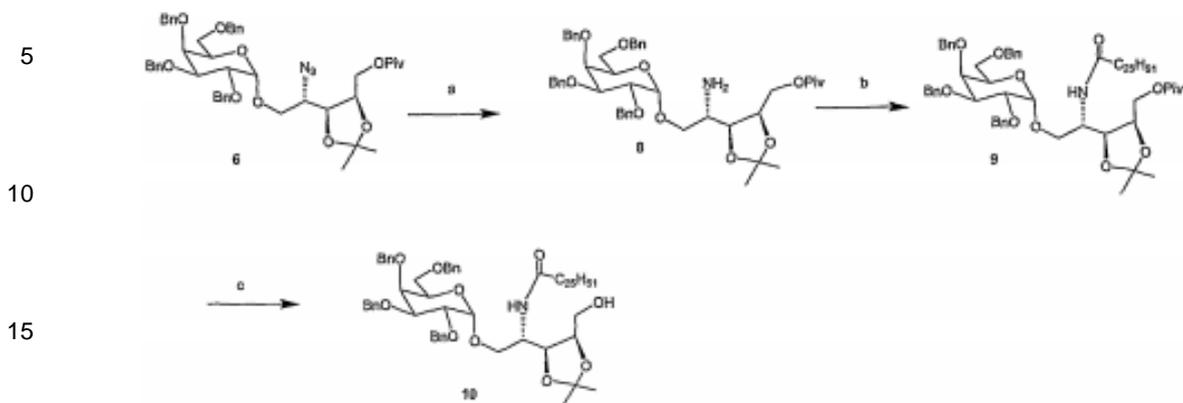
[0054] El esquema 1 ilustra la preparación de intermedios 7. Reactivos y condiciones: a) óxido de tri-(1-pyrrolidina)-fosfina, b) i. tBuOK, DMSO, 80°C; ii. I₂, piridina/H₂O; c) NaBH₄, EtOH; d) PivCl, piridina, DCM, temperatura del cuarto.; e) cloruro de clorometanosulfonilo, piridina; f) NaN₃, DMF, 85°C; g) Bu₄NOH (40%aq), dioxano. Esquema 1 tal como se muestra a continuación:



[0055] Tal como una persona con conocimiento normal en la industria podría apreciar, varios grupos Y para compuestos de la fórmula I pueden ser introducidos al utilizar otros alcoholes en vez de la lixosa protegida en el primer paso del esquema 1. En particular, el uso de otros azúcares protegidos puede ser utilizado para introducir variaciones de Y que tengan una estereoquímica relativa o absoluta diferente de aquella suministrada por la lixosa que se muestran los Esquemas.

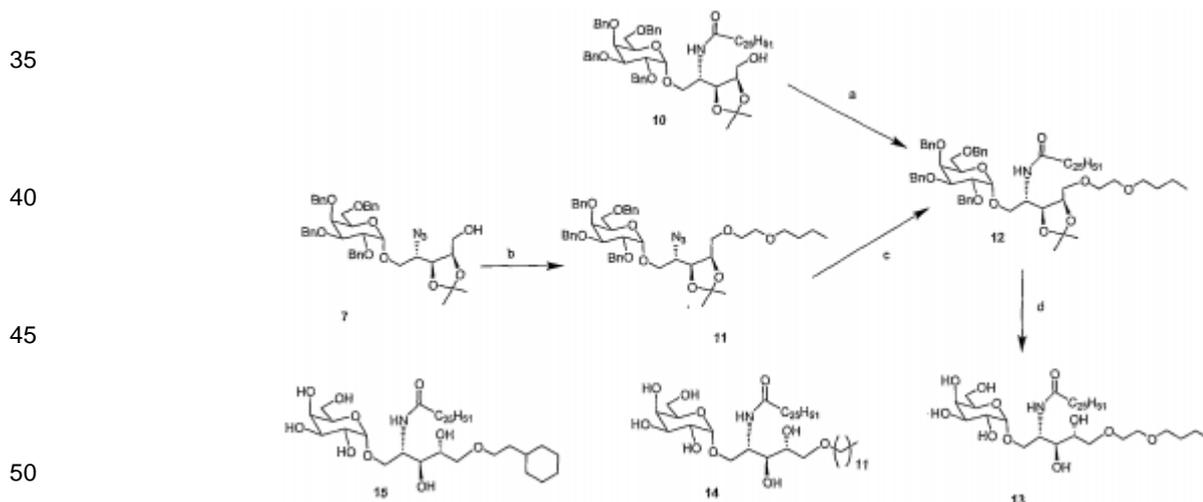
[0056] Varios compuestos del invento pueden ser preparados fácilmente a partir del compuesto 7 por medio de alquilación del grupo hidroxilo seguido por una reducción de la azida a una amina, donde la amina puede ser acilada por medio de métodos convencionales para instalar a la porción -C(O)-X del compuesto de la fórmula I. Los grupos protectores de bencilo en el anillo galactosilo pueden entonces ser removidos por hidrogenólisis o por otros medios tales como TMSI; y el grupo acetónido puede ser removido bajo condiciones ácidas acuosas moderadas tal como se ilustra más adelante y tal como es conocido en la industria. El orden de estos pasos de desprotección no es limitado al orden especificado. En los casos en los que otros grupos protectores son utilizados en vez del bencilo, estos pueden ser removidos por medios convencionales tal como se conoce en la industria.

[0057] El esquema 2 ilustra la preparación del intermedio 10. Reactivos y condiciones: a) catalizador Lindlar, H₂, EtOH; b) ácido hexacosanóico, EDC, HOBT, DIPEA; c) Bu₄NOH (40%aq), dioxano. Esquema 2 tal como se muestra continuación:

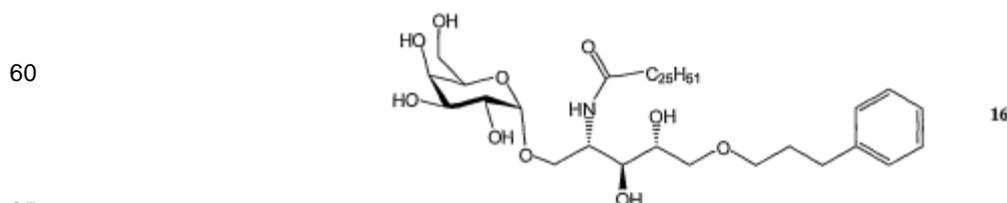


20 **[0058]** Asimismo, el compuesto **10** o un análogo del compuesto **10** que tenga un grupo X diferente puede ser
 utilizado como un precursor para la síntesis de los compuestos donde el grupo Z ha sido variado. Z puede ser
 introducido por medio de una variedad de métodos conocidos, más notablemente una alquilación directa del
 hidroxilo del compuesto **10** bajo condiciones básicas, utilizando agentes alquilantes convencionales tales como
 haluros de alquilo o sulfatos de alquilo o sulfonatos de alquilo (por ejemplo, el mesilato o el tosilato, etc.). Una vez
 25 que los grupos X y Z deseados han sido instalados, el compuesto puede ser desprotegido tal como se mencionó
 anteriormente. Por lo tanto, al utilizar a los métodos ilustrados en este documento, varios compuestos del invento
 pueden ser preparados.

30 **[0059]** El esquema 3 ilustra el uso de 2 intermedios comunes **7** y **10** para generar a ciertos oxa-análogos de α -
 GalCer por medio de la alquilación del grupo hidroxilo, la introducción del ácido graso (solamente para **11**) y la
 desprotección para suministrar a los compuestos seleccionados de la fórmula I.



55 **[0060]** Reactivos y condiciones: a) KOH, 18-corona-6, nBuOCH₂CH₂OMs, THF; b) NaH, nBuOCH₂CH₂OMs, DMF;
 c) i. Catalizador Lindlar, H₂, EtOH; ii. Ácido hexacosánico, EDC, HOBT, DIPEA; c) i. 4 N HCl en dioxano, DCM-
 MeOH 5:1, ii.
 H₂, Pd(OH)₂/C, CHCl₃-MeOH 1:3.



[0061] Los compuestos 14-16 fueron elaborados similarmente, utilizando diferentes agentes de alquilación para el

paso (b). Otros compuestos de la fórmula I que tienen diferentes grupos X, Y y Z son preparados fácilmente por medio de estos métodos utilizando materiales de inicio que pueden encontrarse fácilmente en la industria.

[0062] En alguna sección, los compuestos del invento son solubles en agua y en soluciones acuosas. Por ejemplo, el compuesto 15 es soluble en agua. En algunas secciones, los compuestos del invento tienen una solubilidad de por lo menos alrededor de 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL, 7.5 mg/mL, 10 mg/mL, 12.5 mg/mL, 15 mg/mL, 17.5 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL o 200 mg/mL en una solución acuosa. En otras secciones, los compuestos del invento tienen una solubilidad acuosa mejorada por sobre otros compuestos comparables.

[0063] La evaluación biológica de los compuestos del invento usa células V α 14i NKT de ratón inmortalizadas por medio de una función celular para generar hibridomas FF13 a través de la presentación de APC (THP1). Como una medida de la activación de las células T, la liberación IL2 en el medio del cultivo fue determinada después de 48 horas de cultivo por medio de un ensayo ELISA.

[0064] Los resultados demostraron que los oxa-análogos de glucolípidos sintéticos de α -GalCer son capaces de estimular una liberación significativa de IL2 cuando son presentados por el APC a hibridomas de ratón. Una comparación con α -GalCer reveló que ellos tienen actividades similares, y algunos de los compuestos nuevos del invento son más eficientes. El reemplazo de un grupo metileno de α -GalCer por un átomo de oxígeno no interfiere con la función de estos compuestos una vez que están cargados en el CD Id, y pueden hacerlos más viables para cargarse en el CD Id y mejorar sus propiedades farmacocinéticas. Por lo tanto, los compuestos de la fórmula I pueden ser utilizados en conjunto con por lo menos un antígeno para incrementar la respuesta inmunológica provocada por el antígeno. Por lo tanto, los compuestos del invento pueden ser utilizados en combinación con uno o más antígenos que son utilizados para vacunaciones para incrementar la potencia del antígeno y de la vacuna.

Sistemas de entrega

[0065] Las composiciones del invento podrían incluir a por lo menos un compuesto de la fórmula 1 mezclado con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Aquellas composiciones podrían ser administradas con una vacuna para vacunar a un sujeto, o podrían ser entregadas en el mismo día que una vacuna es administrada al sujeto que va a ser vacunado. Frecuentemente el compuesto es mezclado con un antígeno o con una vacuna, y los 2 son administrados como una sola dosis, ya sea por inyección o por ingestión o de otra forma. Comúnmente el compuesto será administrado como parte de un sistema de entrega de antígenos, y más comúnmente es mezclado con un antígeno o una vacuna en una sola composición, que podría ser cualquier composición de vacuna adecuada. Sistemas adecuados incluyen a emulsiones, a liposomas y a micropartículas. Por lo tanto, una composición podría comprender, por ejemplo, a una emulsión de aceite en agua a la cual se han agregado los agonistas descritos anteriormente, a liposomas que contienen a los agonistas descritos anteriormente o micropartículas que contienen y/o presentan a los agonistas mencionados anteriormente.

Emulsiones

[0066] Las emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite son conocidas por su uso en vacunas. Las emulsiones O/W (aceite/agua - oil/water) son preferidas, y éstas comúnmente incluyen a por lo menos un aceite y a por lo menos un surfactante, con el o los aceites y el o los surfactantes siendo biodegradables (capaces de metabolizarse) y biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión son en general menores a 5 μ m de diámetro, y podrían incluso tener un diámetro de sub-micrones, con estos tamaños pequeños siendo alcanzados con un microfluidizador para suministrar emulsiones estables. Gotas con tamaños menores que 220 nm son preferidas puesto que pueden ser sujetas a una esterilización de filtros.

[0067] El invento puede ser utilizado con aceites tales como aquellos de una fuente animal (tales como de pescado) o vegetal. Las fuentes para aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de nuez, el aceite de soya, el aceite de coco, y el aceite de oliva, son los que pueden encontrarse más fácilmente, y son ejemplos de aceite de nuez. El aceite de jojoba también puede ser utilizado, por ejemplo, siendo obtenido del grano de la jojoba. Los aceites de semillas incluyen al aceite de cártamo, al aceite de semilla de algodón, al aceite de semilla de girasol, al aceite de semilla de sésamo, y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el que puede encontrarse más fácilmente, pero el aceite de otros granos de cereales tales como el trigo, de la avena, del centeno, del arroz, del teff, de triticale y similares podrían ser utilizados. Ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanediol, aunque no ocurren naturalmente en aceites de semillas, podrían ser preparados por medio de una hidrólisis, una separación y una esterificación de los materiales apropiados a partir de aceites de nueces y semillas. Grasas y aceites de leche de mamíferos son capaces de metabolizarse y podrían, por lo tanto, ser utilizadas en la práctica de este invento. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otras formas necesarias para obtener aceites puros de fuentes animales son conocidas en la industria. La mayoría de peces contienen aceites son capaces de metabolizarse que podrían ser recuperados fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburones, y aceites de ballenas tales como esperma de ballena son ejemplos de algunos de los aceites de pescados que podrían ser utilizados en este documento. Un número de aceites de cadenas ramificadas son sintetizados bioquímicamente en unidades de isopreno de 5-carbonos y son

generalmente denominadas de terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide ramificado y no saturado conocido como el escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, el cual es particularmente preferido en este documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluyendo al escualeno y al escualano, son fáciles de encontrar fuentes comerciales o podrían ser obtenidos por medio de métodos conocidos en la industria. Otros aceites preferidos que pueden utilizarse son los tocoferoles, incluyendo a los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero los que utilizan a tocoferoles α son los preferidos (por ejemplo, DL- α -tocoferol). También pueden utilizarse mezclas de aceites.

[0068] Los surfactantes pueden ser clasificados por su 'HLB' (balance hidrófilo/lipófilo - hydrophile/lipophile balance). Los surfactantes preferidos del invento tienen un HLB de por lo menos 10, preferiblemente por lo menos 15, y más preferiblemente por lo menos 16. El invento puede ser utilizado con surfactantes incluyendo, pero sin limitarse a: surfactantes de ésteres de sorbatano de polioxietileno (comúnmente denominados Tweens), especialmente políticsorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO - ethylene oxide), óxido de propileno (PO - propylene oxide), y/o óxido de butileno (BO - butylene oxide), vendidos bajo la marca comercial DOWFAX™, tal como copolímeros de bloqueo lineal de EO/PO; octoxinoles, que podrían variar de número de grupos repetitivos etoxi (oxi-1,2-etanedilo), con el octoxinol-9 (Triton X-100, o toctilfenoxipolietoxietanol) siendo de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como la fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonifenoles, tales como las series Tergitol™ NP; ésteres grasos de polioxietileno derivados de aceites de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como surfactantes Brij), tales como el éter de monolaurilo de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitano (conocidos comúnmente como SPANs), tales como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano. Surfactantes no iónicos son preferidos. Surfactantes preferidos para incluirse en emulsiones son el Tween 80 (monooleato de sorbitano de polioxietileno), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina o Tritón X-100.

[0069] Mezclas de surfactantes pueden ser utilizadas, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de sorbitano de polioxietileno tal como un monooleato de sorbitano de polioxietileno (Tween 80) y un octoxinol tal como el t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) también es adecuada. Otra combinación útil comprende a laureth 9 con un éster de sorbitano de polioxietileno y/o un octoxinol.

[0070] Montos preferidos de surfactantes (% masa) son: los ésteres de polioxietileno (tales como Tween 80) del 0.01 al 1%, en particular alrededor del 0.1 por ciento; octil- o polioxietanoles de nonilfenoxis (tales como el Tritón X-10, u otros detergentes en las series Tritón) del 0.001 al 0.1 por ciento, en particular del 0.005 al 0.02 por ciento; ésteres de polioxietileno (tales como laureth 9) del 0.1 a 20%, preferiblemente del 0.1 al 10% y en particular del 0.1 al 1% o alrededor de 0.5 por ciento. Adyuvantes específicos de emulsiones de aceite en agua útiles para el invento incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión de escualeno, Tween 80, y Span 85. La composición de la emulsión en lo que se refiere al volumen puede ser alrededor del 5% de escualeno, alrededor del 0.5 por ciento de polisorbato 80 y alrededor de 0.5 por ciento de Span 85. En términos de masa, estos índices se vuelven 4.3 por ciento de escualeno, 0.5 por ciento de polisorbato 80 y 0.48 por ciento de Span 85. El adyuvante es conocido como 'MF59'. La emulsión MF59 incluye ventajosamente a iones de citrato, por ejemplo, 10 mM de amortiguador de citrato de sodio.
- Una emulsión submicrónica de escualeno, un tocoferol, y Tween 80. La emulsión podría incluir a una sustancia salina amortiguada de fosfato. También podría incluir a Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones podrían tener desde el 2 al 10% de escualeno, desde el 2 al 10% de tocoferol y desde el 0.3 al 3% de Tween 80, y el índice de masa de escualeno:tocoferol es preferiblemente ≤ 1 puesto que suministra una emulsión aceptable. El escualeno y el Tween 80 podrían estar presentes a un índice de volumen de alrededor de 5:2. Una emulsión como esas puede ser hecha al disolver a Tween 80 en PBS para generar el 2% de la solución, luego mezclar a 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5ml scualeno), y luego microfluidizar a la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas submicrónicas de aceite, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente alrededor de 180 nm.
- Una emulsión conformada de un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Tritón (por ejemplo, Tritón X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión podría incluir estos 3 componentes a un índice de masa de alrededor de 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/mililitros de polisorbato 80, 100 μ g/mililitro de Tritón X-100 y 100 μ g/mililitro de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deberían incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también podría incluir a escualeno. La emulsión podría incluir a 3d-MPL. La fase acuosa podría contener a un amortiguador de fosfato.
- Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxamero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede ser formulada en una sustancia salina amortiguada de fosfato, pH 7.4. La emulsión es un portador útil de entrega para dipéptidos de muramilo, y ha sido utilizada con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" (0.05-1% de Thr-MDP, 5% de scualano, 2.5% de Pluronic L121 y 0.2% de polysorbate 80). También puede ser utilizado sin el Thr-MDP, tal como en el adyuvante "AF" (5% de escualeno, 1.25% de Pluronic L121 y 0.2% polisorbato 80). Se prefiere la micro-fluidización. Hariharan, et al., Cancer (Cáncer) Res. Vol 55, 3486-89 (1995).

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Tritón (por ejemplo, Tritón X-100). La emulsión tan bien podría incluir a un 3d-MPL. La emulsión podría contener a un amortiguador de fosfato.
- 5 • Una emulsión que tiene entre 0.5-50% de un aceite, entre 0.1-10% de fosfolípidos, y entre 0.05-5% de un surfactante no iónico. Tal como se describió en I WO 95/11700, componentes preferidos fosfolípidos son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol, el fosfatidilglicerol, el ácido fosfatídico, la esfingomielina y la cardiolipina. Tamaños submicrónicos de tienen ventajas.
- 10 • Una emulsión submicrónica de aceite en agua de un aceite que no puede metabolizarse (tal como un aceite mineral ligero) y por lo menos un surfactante (tal como la lecitina, el Tween 80 y el Span 80). Podrían incluirse aditivos, tal como la saponina de QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como el GPI-0100, producido al agregar a aminas alifáticas a desacilsaponina por medio del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o (2-hidroxietil)propanediamina de N,N-dioctadecil-N,N-bis.
- 15 • Una emulsión en la cual una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroles (por ejemplo, un colesterol) son asociados como micelas helicoidales. Refiérase a WO2005/097181.
- 20 • Una emulsión que comprende a un aceite mineral, a un alcohol graso no iónico lipofílico etoxilado y a un surfactante no iónico hidrofílico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloqueo de polioxietileno-polioxipropileno). Refiérase a WO2006/113373.
- 25 • Una emulsión que comprende a un aceite mineral, un alcohol etoxilado no iónico hidrofílico, y un surfactante no iónico lipofílico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloqueo de polioxietileno-polioxipropileno). Refiérase a WO2006/113373.

Emulsiones de aceite en agua que comprenden a escualeno, con un diámetro submicrónico de gotas de aceite, son ideales.

Liposomas

- 30 **[0071]** Los liposomas son estructuras vesiculares que se basan en bicapas líquidas que rodean a los compartimientos acuosos. Varios tipos de liposomas son conocidos en la industria. Pueden variar ampliamente en relación a sus propiedades físico - químicas tales como su tamaño, la composición lipídica, la carga superficial (catiónica, neutral o aniónica) y el número y fluidez de las bicapas de fosfolípidos. Por ejemplo, podrían estar
- 35 compuestas de solamente fosfolípidos (neutrales y/o cargados negativamente) y/o colesterol. Podrían ser mono- o multi-lamelares. Su utilización como adyuvantes es descrita en, por ejemplo, U.S. 6,090,406; US 5,916,588; EP-A-0626169.

Micropartículas

- 40 **[0072]** Las micropartículas han sido descritas para su uso como adyuvantes en, por ejemplo, refiérase a WO 98/33487 y a Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols, (Adyuvantes de Vacunas: Métodos de Preparación y Protocolos de Investigación) vol. 42 of Methods in Molecular Medicine (volumen 42 de Métodos en Medicina Molecular), O'Hagan, ed.. Micropartículas preferidas son hechas de polímeros biodegradables y no tóxicos. Por ejemplo, podrían ser hechas de un polímero seleccionado de un grupo que consiste de: un poli(ácido de α -hidroxi), un ácido butírico de polihidroxi, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido, y un policianoacrilato. Copolímeros de estos polímeros pueden ser utilizados, por ejemplo, un copolímero de D,L-lactida y caprolactona.
- 45 **[0073]** Polímeros preferidos son poli(ácidos de α -hidroxi), más preferiblemente aquellos seleccionados del grupo que consiste de poli(L-lactida), poli(D,L-lactida) y poli(D,L-lactida-co-glicólido). Los polímeros más preferidos son los polímeros de poli(D,L-lactida-co-glicólido), referidos como 'PLG'. Polímeros poli(D,L-lactida-co-glicólido) preferidos son aquellos que tienen una tasa molar lactida/glicólido en el rango de 25:75 a 75:25, más preferiblemente 40:60 a 60:40 por ejemplo, alrededor de 50:50. Un polímero PLG con una mezcla 50:50, que contiene el 50% de D,L-lactida y el 50% de glicólido, suministrará copolímeros de rápida reabsorción mientras que un PLG con una mezcla 75:25 se degradará más lentamente, y una mezcla 85:15 y 90:10, aún más lentamente, debido a la componente lactida incrementada.
- 50 **[0074]** Éstos polímeros están disponibles en una variedad de masas moleculares, y la masa molecular apropiada para un antígeno específico es determinada fácilmente por una persona con conocimiento en la industria. Para las polilactidas, por ejemplo, una masa molecular adecuada estará en alrededor de 2000 a 5000. Para los PLG, masas moleculares adecuadas generalmente estarán en el orden de alrededor de desde 10,000 a alrededor de 200,000, preferiblemente desde alrededor de 15,000 a alrededor de 150,000, y más preferiblemente desde alrededor de 50,000 a alrededor de 100,000. Un rango útil es desde 30,000 Daltons a 70,000 Daltons.
- 60
- 65

[0075] Las micropartículas pueden tener un diámetro en el rango de ~100nm a ~150 µm, más preferiblemente entre ~200nm a ~30 µm de diámetro, y más preferiblemente desde ~500nm a ~10 µm de diámetro. Comúnmente serán sustancialmente esféricas.

5 **[0076]** Las micropartículas pueden ser hechas en varias formas. Por ejemplo, técnicas de doble evaporación de emulsiones/solventes son conocidas, que involucran la formación de una emulsión primaria que consiste de gotas de una solución polimérica, que subsiguientemente es mezclada con una fase acuosa continua que contiene a un estabilizador/surfactante de partículas. Más particularmente, un sistema de evaporación de solventes de agua en aceite en agua (w/o/w - water- in-oil-in-water) puede ser utilizado para formar a las micropartículas. En esta técnica, el polímero particular es combinado con un solvente orgánico, tal como el acetato etílico, el dimetilcloruro (también llamado cloruro de metileno y diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroformo, y similares. El polímero será suministrado a alrededor de 2-15% más preferiblemente alrededor del 4-10% y más preferiblemente, una solución del 6%, en un solvente inorgánico. La solución polimérica es emulsionada entonces utilizando, por ejemplo, un homogeneizador. La emulsión es combina entonces con un volumen más grande de una solución acuosa de un estabilizador de emulsiones tales como el alcohol polivinílico (PVA - polyvinyl alcohol) o la pirrolidona de polivinilo. El estabilizador de emulsiones es suministrado comúnmente en alrededor del 2-15% de la solución, más comúnmente a alrededor del 4-10% de la solución. La mezcla es homogenizada entonces para producir una emulsión doble w/o/w estable. Los solventes orgánicos son evaporados entonces. Los parámetros de la formulación pueden ser manipulados para permitir la preparación de micropartículas pequeñas (inferiores a 5 µm) y grandes (superiores a 30 µm). Por ejemplo, una agitación reducida resulta en micropartículas más grandes, tal como lo hace un incremento en el volumen de la fase interna. El tamaño de las partículas puede ser determinado por medio de métodos rutinarios.

15 **[0077]** Así como el uso de técnicas de emulsiones dobles, las técnicas de emulsiones individuales también pueden ser utilizadas. Las micropartículas también puede ser formadas utilizando un secado de aerosol y coacervación, o por medio de técnicas de recubrimiento de suspensión neumática, tal como un revestimiento de bandeja y recubrimiento de Wurster. También se puede utilizar la gelificación iónica.

20 **[0078]** Después de la preparación, las micropartículas pueden ser almacenadas tal como están, o pueden ser congeladas-secadas para usos adicionales.

25 **[0079]** Las micropartículas pueden ser tratadas opcionalmente para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico, al como CTAB). Cambios en las características de la superficie pueden transformar las características de adsorción de acuerdo al antígeno que debe ser adsorbido.

30 Componentes inmunoactivos adicionales

[0080] Adicionalmente a los compuestos aquí descritos, composiciones del invento podrían incluir a componentes inmunoestimuladores adicionales. Por ejemplo, podrían incluir uno o más de los siguientes: una sal de aluminio; una sal de calcio; una citocina; un ligando de CD40; una saponina; y/o un complejo inmuneestimulador (ISCOM - immunostimulatory complex). En algunas secciones, sin embargo, la composición no contiene a aquellos componentes inmunesestimuladores adicionales.

35 Sales de aluminio

40 **[0081]** Las sales de aluminio podrían o no podrían estar incluidas en las composiciones del invento. Sales adecuadas incluyen a adyuvantes conocidos en la industria como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero son utilizados únicamente por conveniencia, puesto que una descripción precisa del compuesto químico real no está presente. El invento puede utilizar cualquiera de los adyuvantes "hidróxido" o "fosfato" que en general se los usa como adyuvantes.

45 **[0082]** Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son comúnmente sales de oxihidróxido de aluminio, que usualmente son por lo menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede ser representado por la fórmula $AlO(OH)$, puede ser distinguido de otros compuestos de aluminio, tales como el hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, por medio de espectroscopia de infrarrojo (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un arcén fuerte de $3090\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$. Diseño de las vacunas, ch. 9. El nivel de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio es reflejado por el ancho de la banda de difracción a una altura media (WHH - width of the diffraction band at half height), con partículas con una mala cristalinidad que muestran una mayor amplitud de línea debido a tamaños más pequeños de los granos. El área superficial se incrementa en la medida que se incrementa la WHH, y adyuvantes con valores de WHH más altos han demostrado tener una mayor capacidad para una adsorción de antígenos. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como la observada en los micro gráficos de transmisión de electrones) es común para adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pH de adyuvantes de hidróxido de aluminio es comúnmente alrededor de 11, es decir, el adyuvante si tiene una carga superficial positiva a un pH fisiológico.

50 **[0083]** Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son comúnmente hidroxifosfatos de aluminio, que a

menudo también contienen un monto pequeño de sulfato (es decir, sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Podrían obtenerse por medio de precipitaciones, y las condiciones y concentraciones de reacción durante la precipitación afectan al grado de fusión del fosfato para el hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos generalmente tienen una tasa molar de PO_4/Al de entre 0.3 y 1.2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse de AlPO_4 rígidos por la presencia de grupos hidroxilos. Por ejemplo, una banda del espectro IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se lo calienta a $200\text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales. VACCINE DESIGN: THE SUBUNIT AND ADJUVANT APPROACH (DISEÑO DE LAS VACUNAS: EL MÉTODO DE LA SUBUNIDAD Y DEL ADYUVANTE) (Powell y Newman, eds.), ch. 9, Plenum Press (1995).

[0084] La tasa molar $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio generalmente será de entre 0.3 y 1.2, preferiblemente de entre 0.8 y 1.2, y más preferiblemente 0.95 ± 0.1 . El fosfato de aluminio generalmente será amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un ayudante común es el hidroxifosfato amorfo de aluminio con una tasa molar PO_4/Al de entre 0.84 y 0.92, incluida a 0.6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio generalmente será específico (por ejemplo, morfología similar a placas tal como se ha observado en micrográficos de electrones de transmisión). Diámetros comunes de las partículas están en el rango de $0.5\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ (por ejemplo, alrededor de $5\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$) después de cualquier adsorción de antígenos.

[0085] El punto de carga cero (PZC - point of zero charge) de los fosfatos de aluminio tiene una relación inversa al nivel de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este nivel de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones y la concentración de reacción de los reactivos utilizados para preparar a la sal por medio de precipitaciones. El PZC también es alterado al cambiar la concentración de los iones de fosfato libres en la solución (más fosfato = más PZC ácido) o al agregar un amortiguador tal como el amortiguador de histidina (hace al PZC más básico). Los fosfatos de aluminio utilizados de acuerdo al invento generalmente tendrán un PZC de entre 4.0 y 7.0, más preferiblemente entre 5.0 y 6.5, por ejemplo, alrededor de 5.7.

[0086] Es posible utilizar una mezcla de un hidróxido de aluminio y un fosfato de aluminio. En este caso podría haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una tasa de masa de por lo menos 2:1, por ejemplo, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc.

[0087] La concentración de Al^{+++} en una composición para su administración a un paciente es preferiblemente menor que 10 mg/mililitro , por ejemplo, $\leq 5\text{ mg/ml}$, $\leq 4\text{ mg/ml}$, $\leq 3\text{ mg/ml}$, $\leq 2\text{ mg/ml}$, $\leq 1\text{ mg/ml}$, etc. Un rango preferido está entre 0.3 y 1 mg/mililitro . Un máximo de $0.85\text{ miligramos/dosis}$ es preferido.

Sales de calcio

[0088] Una composición del invento podría o no podría incluir a un adyuvante de fosfato de calcio. Varias formas adecuadas de fosfato de calcio son conocidas, tal como se describe en más detalle a continuación.

[0089] El Diseño de la vacuna, capítulo 8, explica cómo antígenos pueden ser adsorbidos al fosfato de calcio ya sea por precipitaciones in situ de la sal en la presencia de los antígenos o por medio de la adsorción a una sal pre-formada.

[0090] Otros adyuvantes conocidos incluyen al fosfato de calcio. En vez de ser estrictamente $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, se informa que los adyuvantes son hidroxiapatitas no estequiométricas de la fórmula $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ y una carga superficial que depende del pH con un punto de carga cero (PZC - point of zero charge) de 5.5. Los adyuvantes pueden formar partículas similares a agujas que tienen dimensiones de aproximadamente $10\text{ nm} \times 150\text{ nm}$, así como placas de formas irregulares que tienen diámetros de aproximadamente $20\text{-}30\text{ nm}$. Composiciones adecuadas de fosfato de calcio son descritas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos número 5,676,976; WO 00/46147; WO 03/051394; y en la patente de Estados Unidos número 6,355,271; y en la patente de Estados Unidos número 5,851,670.

[0091] La tasa molar de Ca en relación a P de los adyuvantes de fosfato de calcio puede variar, por ejemplo, de entre 1.35 y 1.83. Las propiedades de adsorción del adyuvante han demostrado variar dependiendo de las condiciones utilizadas durante la precipitación, por ejemplo, una mezcla lenta podría dar a un adyuvante con una capacidad más baja de adsorción que un adyuvante formado por medio de una mezcla rápida.

[0092] El monto de fosfato de calcio, medido como Ca^{++} , podría ser de entre $0.1\text{ miligramos/mililitro}$ y 10 mg/mililitro , por ejemplo, de entre $0.5\text{-}5\text{ mg/mililitro}$, preferiblemente de entre $0.75\text{-}3\text{ mg/mililitro}$, de entre $0.9\text{-}1.5\text{ miligramos/mililitro}$, o alrededor de 1 mg/mililitro .

[0093] El adyuvante de fosfato de calcio tiene la capacidad de adsorber antígenos. Para un antígeno específico, por lo menos el 80% (por ejemplo, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92.5\%$, $\geq 95\%$, $\geq 97.5\%$, $\geq 97.5\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99.5\%$, etc.) por masa del monto total de aquel antígeno es adsorbido. Puesto que los adyuvantes de fosfato de calcio son insolubles, comúnmente en las partículas, el nivel de adsorción puede ser medido convenientemente por medio de un método que involucra una centrifugación y luego la determinación del monto del antígeno en uno (o ambos) de los materiales solubles o sólidos.

Antígenos

5 [0094] El invento puede ser utilizado con una variedad de antígenos diferentes, incluyendo a antígenos bacterianos, antígenos virales, antígenos de hongos, antígenos de protozoos, antígenos relacionados con tumores, etcétera.

10 [0095] Los antígenos bacterianos podrían ser de bacterias incluyendo, pero sin limitarse a: *Neisseria* (tal como *N.meningitidis*, *N.gonorrhoeae*), *Streptococcus* (tal como *S.agalactiae*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *S.mutans*), *Staphylococcus* (tal como *S.aureus*), *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium* (tal como *C.difficile*, *C.tetani*), *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium* (tal como *M.tuberculosis*), *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia* (tal como *C.trachomatis*, *C.pneumoniae*), *Yersinia pestis*, *Porphyramonas gingivalis*, *Moraxella catarrhalis*.

15 [0096] Los antígenos de protozoos podrían ser de protozoos incluyendo, pero sin limitarse a: *Plasmodium* (tal como *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale*).

20 [0097] Los antígenos virales podrían ser de virus incluyendo, pero sin limitarse a: el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis E, el virus del polio, el virus de la rabia, el virus de las paperas, el virus del sarampión, el virus de la rubéola, el virus de la varicela, el virus de la influenza, el virus del Nilo occidental, el coronavirus SARS, el virus de inmunodeficiencia humana, el virus sincitial respiratorio, el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla, el virus de encefalitis japonesa, el virus de encefalitis originada por garrapatas, el virus del herpes simple, el virus de Epstein-barr, el citomegalovirus humano, el virus del papiloma humano.

25 [0098] Los antígenos podrían tomar varias formas, por ejemplo, de bacterias completas, de viriones completos, de bacterias desactivadas, de viriones desactivados, de proteínas purificadas, de sacáridos purificados, de glicoconjugados, etcétera. En vez de administrar una proteína, sin embargo, es posible administrar un ácido nucleico que será interpretado in vivo para suministrar a la proteína in situ.

30 [0099] Cuando se utiliza a un antígeno de sacáridos, es conjugado preferiblemente con una proteína portadora para mejorar la inmunogenicidad. Cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier enlazador cuando fuese necesario.

[0100] En algunas secciones, antígenos pueden ser conjugados con uno de los inmunopotenciadores.

35 **Composiciones farmacéuticas**

40 [0101] Las composiciones del invento son farmacéuticamente aceptables. Podrían incluir a componentes adicionalmente a los inmunopotenciadores de la fórmula I. Comúnmente incluyen a uno o más portadores farmacéuticos y/o excipientes. Una explicación detallada de aquellos componentes está disponible en REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (REMINGTON: LA CIENCIA Y LA PRÁCTICA DE LOS FÁRMACOS), 20^{ma} ed. (2000).

45 [0102] Las composiciones generalmente estarán en una forma acuosa, y frecuentemente serán isotónicas. Para controlar la tonicidad, es preferido incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), que podría estar presente en entre 1 y 20 mg/mililitros. Otras sales que podrían estar presentes incluyen a cloruro de potasio, fosfato de dihidrógeno de potasio, fosfato de sodio deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etcétera.

50 [0103] Las composiciones generalmente tendrán una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferiblemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferiblemente caerán dentro del rango de 290-310 mOsm/kg.

55 [0104] Las composiciones podrían incluir uno o más amortiguadores. Amortiguadores comunes incluirán a: un amortiguador de fosfato, un amortiguador de Tris; un amortiguador de borato; un amortiguador de succinato; un amortiguador de histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un amortiguador de citrato. Los amortiguadores comúnmente estarán incluidos en el rango de desde 5-20 mM.

[0105] El pH de una composición generalmente estará entre 5.0 y 8.1, y más comúnmente entre 6.0 y 8.0, por ejemplo, entre 6.5 y 7.5, o entre 7.0 y 7.8.

60 [0106] La composición es preferiblemente estéril. La composición es preferiblemente no pirogénica, por ejemplo, que contiene <1 EU (unidad de endotoxinas - endotoxin unit, una medida estándar) por dosis, y preferiblemente inferior a 0.1 EU por dosis. La composición es preferiblemente libre de gluten. La composición podría incluir a conservantes.

65 [0107] Las formulaciones podrían ser preparadas en una forma adecuada para su administración sistémica. Las formulaciones sistémicas incluyen aquellas diseñadas para ser inyectadas (por ejemplo, inyecciones

intramusculares, intravenosas o subcutáneas) o podrían ser preparadas para su administración transdérmica, transcutánea, transmucosa u oral. La administración oral también es adecuada. Formas adecuadas incluyen a jarabes, cápsulas, tabletas y similares tal como se entiende en la industria. La selección de una ruta particular para un sujeto específico es normal en la industria. Por ejemplo, una entrega rectal a menudo es apropiada en casos en los que el sujeto experimenta náuseas y vómitos que evitan una entrega oral efectiva. Parches transdérmicos comúnmente son capaces de entregar una dosis de liberación controlada durante varios días, y por lo tanto son adecuados para sujetos para los cuales esto es apropiado.

Métodos de tratamiento

[0108] Las composiciones del invento que comprenden a un compuesto de la fórmula I donde Y es un enlazador alquileo C1-C6 o alquenileno C2-C6 que puede ser sustituido con hasta 2 grupos son adecuados para su administración a pacientes humanos, y son hechos para su uso en un método para elevar una respuesta inmunológica en un paciente, donde dicho método comprende el paso de administrar una composición del invento a un paciente. Esto podría involucrar a (a) administrar una composición conformada de inmunopotenciadores y antígenos, o (b), co-administrar una composición inmunopotenciadora libre de antígenos con una composición que contiene antígenos.

[0109] El invento también suministra una composición del invento para su uso como un medicamento.

[0110] El invento también suministra una combinación de 2 o más inmunopotenciadores (tal como se definió anteriormente) para su uso para elevar una respuesta inmunológica de un paciente.

[0111] El invento también suministra (i) una combinación de 2 o más inmunopotenciadores, tal como se definió anteriormente, y (ii) un antígeno, para su uso simultáneo por separado o secuencial en la inmunización.

[0112] El invento también suministra un antígeno y un inmunopotenciador, tal como se definió anteriormente, para su uso en (a) un método para elevar una respuesta inmunológica en un paciente, o (b) un método para elevar la respuesta inmunológica en contra de un antígeno en un paciente.

[0113] La respuesta inmunológica elevada por estos métodos y usos generalmente incluirá una respuesta de anticuerpos (o una respuesta de células B) y/o una respuesta de células T.

[0114] El invento podría ser utilizado para elevar una respuesta inmunológica de la mucosa, por ejemplo, incluyendo una respuesta de IgA, tal como una respuesta secretoria de IgA. En vez de eso, o adicionalmente a eso, una respuesta de IgG también podría ser obtenida.

[0115] Los siguientes ejemplos son presentados para incrementar la comprensión de ciertos aspectos y secciones del invento, pero no son considerados como limitantes del enfoque del invento.

Reactivos

[0116] Todos los químicos fueron comprados como una clase reactiva y son utilizados sin más purificaciones. Todos los solventes fueron secados sobre bolsas moleculares de 4 Å activadas recientemente.
Información general

[0117] La reacción fue monitoreada con cromatografía analítica de capa delgada (TLC - thin layer chromatography) en placas de que gel sílice de Merck 60 F254, y visualizadas bajo UV (254) y/o por coloración con un 5% de H₂SO₄ en MeOH, molibdato ácido de amonio cérico o KMnO₄. Se realizó cromatografía de columna de destellos en gel sílice Macherey-Nagel 60. Se grabaron espectros NMR en un espectrómetro NMR de 300 MHz a 25 °C. El cambio químico (en ppm) fue determinado en solventes deuterados. Espectros de pruebas de protones adheridos (APT - attached proton test) de ¹³C fueron obtenidos en un espectrómetro 300 (75 MHz) y fueron calibrados en relación a los solventes deuterados.

Ejemplo 1

Síntesis del intermedio común 7

2,3,4,6-tetra-O-bencil-α-D-galactopiranosil-(1→5)-2,3-O-isopropilideno-α-D-lixofuranósido de alilo (1).

[0118] A una solución de 5 g de bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-bencil-α-D-galactopiranosilo [Grayson, E. J. et al, J. Org. Chem. (2005), 70, 9740-9754] (8.34 mmol) y 1.5 g de 2,3-O-isopropilideno-α-D-lixofuranósido de alilo (6.42 mmol) en DCM se agregaron 4.4 mL de óxido de tri-(1-pirrolidina)-fosfina (19.6 mmol) [Mukaiyama, T. y Kobashi, Y., Chem. Lett. (2004), 33, 10-11]. La mezcla fue agitada a la temperatura del cuarto durante 24 horas luego fue diluida con EtOAc y filtrada sobre celita. Después de la evaporación del solvente, el crudo fue purificado por medio de una cromatografía cuidadosa de destellos (tolueno/ EtOAc 95/5) generando 4.12 gramos de 1 (85%).
¹H (CDCl₃): δ7.50-7.19 (m, 20 H), 5.92-5.77 (m, 1 H), 5.33-5.13 (m, 2 H), 5.01 (br s, 1 H), 5.00-4.50 (m, 9 H),

4.47(d,J=11.8, 1 H), 4.41 (d, J = 11.8, 1 H), 4.25 (dt, J = 6.1, J = -3.8, 1 H), 4.13-3.83 (m, 7 H), 3.58-3.51 (m, 2 H); 1.40(s,3H), 1.26 (s, 3 H). ¹³C (CDCl₃): δ139.01, 138.70, 138.00, 128.44,128.40,128.33,117.51,112.57,105.00, 98.00, 85.15,79.83, 79.03, 78.41, 75.07, 74.87, 73.44, 73.17, 73.08, 67.87, 26.17, 25.04. Anal. calcd para: C₄₅H₅₂O₁₀ (752.89) C,71.79; H, 6.96. Encontrado: C, 71.66; H, 6.88.

5

2,3,4,6-tetra-O-bencil-α-D-galactopiranosil-(1→5)-2,3-O-isopropilideno-D-lixofuranosa (2).

[0119] A una solución de 2509 g (3.33 milimoles) de 1 en 34 ml de DMSO seco bajo argón, se agregaron 0.56 gramos (5 mmol) de tBuOK. La mezcla fue agitada durante 1.5 horas a 80 °C. Después de enfriarse la mezcla fue diluida con EtOAc, la solución orgánica fue lavada con agua (x1) y salmuera (x3), secada sobre sulfato de sodio y evaporada. El residuo fue disuelto en 65 ml de THF y a la solución se agregó 13 ml de agua, 1.1 ml de piridinas y 1.69 gramos (6.66 milimoles) de yodo. Después de 3 horas a la temperatura del cuarto la mezcla fue diluida con EtOAc, lavada con un 5% de tiosulfato acuoso de sodio, 1N de HCl, una solución saturada de bicarbonato de sodio, y agua. La solución fue secada con sulfato de sodio y el solvente fue evaporado. Una cromatografía de destellos (tolueno/AcOEt 90/10) generó 2.16 gramos de 2 (91%).

¹H (CDCl₃): δ7.49-7.20 (m, 20 H), 5.35 (br s, 1 H), 5.00-4.66 (m, 7 H), 4.60-4.52 (m, 2 H), 4.48-4.35 (m, 3 H), 4.11-3.95(m, 4 H), 3.91-3.75 (m, 2 H), 3.55-3.44 (br d, 2 H), 3.40 (d, J=6.1, 1 H), 3.28 (br s, 1 H), 1.41 (s, 3H), 1.29 (s,3H). ¹³C(CDCl₃):139.01, 138.75, 138.70, 128.47, 128.44, 128.37, 112.60, 101.13, 98.39, 98.05, 96.83, 85.54, 79.13,78.82,73.50, 73.31, 73.10, 69.33, 69.03, 68.79, 66.50, 66.13, 60.57, 26.15, 25.94, 25.20, 25.00, 21.22, 20.92, 14.30. Anal. calcd para: C₄₂R48O₁₀ (712.82) C, 70.77; H, 6.79. Encontrado: C, 70.92; H, 6.61.

20

(2R,3S,4R)-3,4-O-isopropilideno-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-α-D-galactopiranosil)-1,2,3,4,5-pentanepentol (3).

[0120] A una solución de 2.1 gramos (2.85 milimoles) de 2 en 20 ml de EtOH, se agregaron 140 mg (res. 56 mmol) de borohidruro de sodio. La mezcla fue agitada durante 2 horas a la temperatura del cuarto. La mezcla fue diluida con EtOAc, lavada con 1N de HCl, una solución saturada de bicarbonato de sodio y agua. La solución fue secada con sulfato de sodio y el solvente fue evaporado. Una cromatografía de destellos (DCM/MeOH 97:3) generó 1.65 gramos de 3 (81%). ¹H (CDC13): 7.49-7.20 (m, 20 H), 5.01-4.53 (m, 7 H), 4.47 (d, J = 11.8, 1 H), 4.38 (d, J = 11.8, 1 H), 4.22-3.87 (m, 9 H), 3.81-3.63 (m, 2 H), 3.55-3.44 (m, 2 H), 3.40 (dd, J = 8.8, J = 6.1, 1 H), 2.99 (br s, 1 H), 1.48 (s, 3 H), 1.31 (s, 3 H). ¹³C (CDCl₃): 138.72, 138.55, 138.43, 128.53, 128.37, 128.35, 108.42, 104.53, 98.62, 79.11, 76.17, 74.96, 73.80, 73.65, 73.18, 70.03, 67.74, 61.28, 27.17, 25.18. Anal. calcd para: C₄₂H₅₀O₁₀(714.84) C, 70.57; H, 7.05. Encontrado: C, 70.32; H, 7.25.

25

30

(2R,3S,4R)-3,4-O-isopropilideno-5-O-pivaloil-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-α-D-galactopiranosil)-1,2,3,4,5-pentanepentol (4).

35

[0121] A una solución de 1,265 g (1.77 milimoles) de 3 en 28 ml de DCM seco bajo argón a 0 °C, se agregaron 0.65 mililitros de piridinas y 0.66 mililitros (5.3 milimoles) de cloruro de pivaloil. A la mezcla se le dejó calentarse la temperatura del cuarto y se agitó durante la noche. Después de 26 horas la mezcla fue diluida con EtOAc, lavada con 1N de HCl, y salmuera (3x). La capa orgánica fue secada con sulfato de sodio y evaporada. La cromatografía de destellos (Pet. Éter/EtOAc 75:25) generó 1.22 gramos de 4 (86%). ¹H (CDCl₃): δ7.52-7.20 (m, 20 H, ArH) 4.83 (d, J = 3.7, 1 H), 4.92 (d, J = 11.3 Hz, , 1 H), 4.81 (d, J = 11.9 Hz, 1 H), 4.80 (d, J = 11.3 Hz, 1 H), 4.72 (d, J = 11.3 Hz, 1 H), 4.65 (d, J = 11.9 Hz, 1 H), 4.55 (d, J = 11.3 Hz, 1 H), 4.47 (d, J = 11.7 Hz, , 1 H),4.39 (d, J =11.7 Hz, 1 H), 4.26-4.32 (m, 3 H), 4.20 (m, 1 H), 4.03 (dd, J = 3.7, 9.8 Hz, 1 H), 3.99 (t, J = 6.5 Hz, 1 H), 3.95-3.88 (m, 2 H), 3.87 (br m, 1 H), 3.73 (dd, J = 6.4Hz, J = 10.4 Hz, 1 H), 3.55 (dd, J = 5.8 Hz, J = 10.4 Hz, 1 H),); 3.51-3.41 (m, 2 H), 2.70 (d, J = 7.3 Hz, 1 H) 1.47 (s, 3 H), 1.31 (s, 3 H), 1.19 (s, 9 H). ¹³C (CDCl₃); δ: 178.28, 138.84, 138.70, 138.61, 138.22, 128.55, 128.40, 128.21, 128.03, 127.84, 108.86, 98.57, 79.16, 76.57, 76.44, 75.27, 75.08, 74.89, 73.65, 73.60, 73.21, 70.73, 69.92, 69.18, 67.91, 63.74, 38.87, 27.33, 27.23, 25.19.

40

45

[0122] Anal. calcd para: C₄₇H₅₈O₁₁ (798.96) C, 70.65; H, 7.32. Encontrado: C, 70.64; H, 7.44.

50

(2S,3S,4R)-2-azido-3,4-O-isopropilideno-5-O-pivaloil-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-α-D-galactopiranosil)-1,3,4,5-pentanetetrol (6).

[0123] A una solución de 1,21 g (1.52 milimoles) de 4 se agregó 30 ml de piridinas seca, bajo argón y se enfrió a 0 °C, se agregó 1.6 ml (1.77 milimoles) de cloruro de clorometanosulfonilo. A la reacción se le permitió calentarse la temperatura del cuarto y se agitó durante 5 horas. La mezcla fue diluida con EtOAc. La capa orgánica fue lavada con 1N de HCl, bicarbonato de sodio y salmuera, se secó con sulfato de sodio y se evaporó. El crudo fue filtrado a través de una almohadilla corta de gel de sílice y se usó para el siguiente paso sin más purificaciones.

60

[0124] El crudo fue disuelto en DMF seco (12 ml) bajo argón. Se agregó azida de sodio (0.45 gramos) y la mezcla fue calentada a 85 °C. Después de 2.5 horas la mezcla fue diluida con DCM, lavada con agua (3x), la capa orgánica fue secada con sulfato de sodio y evaporada. Cromatografía de destellos (Pet. Éter/EtOAc 85:15) 0.85 gramos de 4 (72% en 2 pasos). ¹H (CDCl₃): δ7.48-7.20 (m, 20 H), 4.98-4.39 (m, 9H), 4.38-4.27 (m, 2 H), 4.24-4.16 (m, 2 H), 4.14-4.03 (m, 2 H), 4.01-3.91(m, 3 H), 3.74 (dd, J = 10.7 Hz, J = 5.8 Hz, 1 H). 3.55-3.43 (m, 3 H), 1.40 (s, 3H), 1.27 s, H),1.19(s,9H). ¹³C(CDCl₃);δ: 178.3, 138.9, 138.7, 138.1, 128.4, 128.3, 127.9, 127.7, 109.1, 98.9, 78.7, 76.6,

65

75.3,74.9,74.3,73.5,73.3,73.0,70.0, 69.2, 69.1, 62.5, 59.2, 38.9, 27.8, 27.3, 25.5. Anal. calcd para: C₄₇H₅₇N₃O₁₀ (823.97)C,68.51;H,6.97;N,5.10. Encontrado: C, 68.83; H, 6.71; N, 4.96.

(2S,3S,4R)-2-azido-3,4-O-isopropilideno-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil)-1,3,4,5-pentanetetrol (7).

[0125] A una solución de 0.5 g (0.6 milimoles) de 6 en dioxano (20 ml) se agregó 1.7 ml de una solución de hidróxido detetrabutilamonio. La mezcla fue agitada durante 72 horas, luego diluida con EtOAc. La capa orgánica fue lavada con 1N de HCl, salmuera, secada con sulfato de sodio y evaporada. La cromatografía de destellos (Pet. Éter/EtOAc 70:30) del crudo generó a 0.35 gramos (78%) de 7.

¹H (CDCl₃): δ 7.56-7.26 (m, 20 H), 4.96-4.52 (m, 7H), 4.47, (d, J = 11.8, 1 H), 4.39, (d, J = 11.8, 1 H), 4.25-4.20 (m,2H), 4.19-3.90 (m, 5 H), 3.81 (dd, J = 10.1, J = 2.4, 1 H), 3.74-3.64 (m, 2 H), 3.55-3.43 (m, 2 H), 1.40 (s, 3H), 1.29 (s,3H). ¹³C (CDCl₃); δ : 138.91, 138.38, 138.32, 137.56, 128.44, 128.34, 127.67, 109.01, 98.92, 78.74, 76.63, 76.52, 75.29,74.82, 74.71, 73.54, 73.43, 72.92, 72.17, 69.92, 69.5, 61.14, 59.68, 27.52, 25.73. Anal. calcd para: C₄₂H₄₉N₃O₉(739.85)C, 68.18; H, 6.68; N, 5.68. Encontrado: C, 68.42; H, 6.41; N, 5.86.

Ejemplo 2

Síntesis del intermedio común 10

(2S,3S,4R)-2-(N-esacosanoilamino)-3,4-O-isopropilideno-5-O-pivaloil-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil)-1,3,4,5-pentanetetrol (9).

[0126] A una solución de 0.5 gramos (0.6 milimoles) de 6 en EtOH (40 ml) un monto catalítico del catalizador Lindlar fue agregado y la mezcla fue agitada durante 4.5 horas bajo una atmósfera de hidrógeno. 0.107 g de di (15) 0.07). La mezcla fue diluida con DCM y filtrada a través de celita dejando a 0.5 gramos de la amina cruda 8 que es utilizada directamente en el siguiente paso.

[0127] A una solución del compuesto 8 en 20 ml de una mezcla 3:1 de DCM-DMF seca bajo Aragón a 0 °C, se agregaron 296 mg (0.75 milimoles) de ácido hexacosanoico. A la suspensión se agregó EDC (145 mg, 0.75 milimoles), HOBT (102 mg, 0.75 milimoles) y finalmente una solución de DIPEA (0.26 ml, 1.5 mmol) en DCM. Después de 20 horas la mezcla fue diluida con EtOAc, lavada con 1N de HCl, una solución saturada de bicarbonato de sodio y salmuera, secada con sulfato de sodio y el solvente fue evaporado. La cromatografía de destellos (Pet. Éter/AcOEt 80:20) género a 534 mg de 9 (72% en 2 pasos). ¹H (CDCl₃): δ 7.56-7.26 (m, 20 H), 6.43 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 4.96-4.55 (m, 6 H), 4.85 (d, J = 3.9 Hz, 1 H) 4.48, (d, J = 11.8, 1 H),4.36, (d, J= 11.8, 1 H), 4.28-3.80 (m, 10 H), 3.62-3.50 (m, 2 H); 3.35 (dd, J = 9.8 Hz, J = 5.5 Hz, 1 H), 2.03 (t, J = 7.3Hz, 2 H), 1.6-1.5 (m, 2 H), 1.42 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.25-1.22 (m, 46 H), 1.18 (s, 9 H), 0.87 (t, J = 6.7 Hz). ¹³C (CDCl₃); δ : 178.15, 172.95, 138.65, 138.39, 138.33, 137.51, 128.55, 128.50, 128.39, 128.18, 128.02, 127.91, 127.72, 127.60,108.86, 99.94, 79.01, 76.85, 75.44, 74.73, 74.68, 74.28, 73.73, 73.06, 70.64, 70.17, 69.68, 62.83, 48.47, 38.78,36.74,32.01, 29.80, 29.68, 29.54, 29.46, 27.84, 27.27, 25.82, 25.55, 22.78, 14.22. Anal. calcd para: C₇₃H₁₀₉N₃O₁₁(1176.65)C,74.52; H, 9.34; N, 1.19. Encontrado: C, 74.81; H, 9.47; N, 1.06.

(2S,3S,4R)-2-(N-esacosanoilamino)-3,4-O-isopropilideno-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil)-1,3,4,5-pentanetetrol (10).

[0128] El compuesto 10 fue obtenido tal como se describió para la preparación del compuesto 7 a partir de 500 mg de 9. El producto fue purificado por medio de cromatografía de destellos (Pet. Éter/EtOAc 50:50) generando 345 mg (76%) del compuesto 10. ¹H (CDCl₃): δ 7.54-7.26 (m, 20 H), 6.63 (m, 1 H), 4.95-4.54 (m, 7 H), 4.46, (d, J=11.6, 1 H), 4.35, (d, J =11.6, 1 H), 4.21-4.09 (m, 2 H), 4.09-3.80 (m, 7 H), 3.60-3.40 (m, 3 H), 3.35 (dd, J = 9.5 Hz, J = 5.2, Hz, 1 H), 2.44 (br s, 1 H), 2.03 (m, 1 H), 1.6-1.5 (m, 2 H), 1.39 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.25-1.22 (m, 46 H), 0.86 (t, J = 6.7Hz). ¹³C(CDCl₃); δ :173.47,138.52,138.33, 138.28, 137.73, 128.61, 128.52, 128.40, 128.21, 128.03, 127.92, 127.73, 127.61, 108.35, 100.21, 78.96, 77.97,74.98, 74.80, 74.60, 73.80, 73.01, 70.63, 69.98, 69.63, 61.04, 47.99, 36.68, 32.11, 29.81, 29.74, 29.62, 29.49, 28.34,25.76, 25.36, 22.98, 14.24. Anal. calcd para: C₆₈H₁₀₁N₃O₁₀ (1092.53) C, 74.76;H,9.32;N,1.28.Encontrado:C,74.45;H,9.21;N, 1.16.

Ejemplo 3

Síntesis de los análogos de oxa de α -GalCer

(2S,3S,4R)-2-azido-5-(2-butoxietil)-3,4-O-isopropilideno-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil- α -D-galactopiranosil)-1,3,4,5-pentanetetrol (11).

[0129] A una solución de 100 mg (0.135 milimoles) de 7 en DMF seco (3 ml) bajo argón, se agregó un 60% de NaH (11 mg, 0.27 milimoles) y mesilato de 2-butoxietilo. La mezcla fue agitada a 100 °C durante 2 horas. Se agregaron otros 2 eq de NaH y mesilato de 2-butoxietilo. Después de 2 horas la mezcla fue aplacada con cloruro de amonio (solución saturada) diluida en EtOAc, lavada con agua (4x), secada con sulfato de sodio y evaporada. La

cromatografía de destellos (Pet. Éter/AcOEt 80:20) dio 74 mg (65%) de 11. ¹H (CDCl₃): δ7.51-7.18 (m, 20 H), 4.94 (m, 1 H), 4.86-4.50 (m, 6 H), 4.47 (d, J=11.8 Hz, 1 H), 4.36 (d, J=11.8 Hz, 1 H); 4.33 (m, 1 H), 4.15-3.94 (m, 6 H), 3.80 (dd, J = 10.4, J = 4.3, 1 H), 3.72-3.44 (m, 8 H), 1.56 (m, 2 H), 1.40 (s, 3 H), 1.36 (m, 2 H), 1.27 (s, 3 H), 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3 H). ¹³C (CDCl₃): δ138.97, 138.45, 138.37, 137.60, 128.36, 128.31, 127.66, 109.00, 98.91, 78.75, 76.67, 75.34, 74.81, 74.68, 73.53, 73.38, 72.81, 71.27, 70.96, 70.09, 69.64, 69.20, 69.06, 59.61, 32.00, 28.01, 26.00, 25.54, 14.89. Anal. calcd para: C₄₈H₆₁N₃O₁₀ (840.01) C, 68.63; H, 7.32; N, 5.00. Encontrado: C, 68.81; H, 7.16; N, 4.83.

(2S,3S,4R)-5-O-(2-butoxiethyl)-2-(N-exacosanoilamino)-3,4-O-isopropilideno-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-α-D-galactopiranosil)-1,3,4,5-pentaentetraol (12).

[0130] A partir de 10: a una solución de 100 mg (92 μmol) de 10, se agregaron 10 mg de KOH y 20 mg (0.1 milimoles) de mesilato de 2-butoxiethyl. La mezcla fue agitada a 40 °C durante 20 horas y luego diluida con EtOAc. La capa orgánica fue lavada con salmuera, secada con sulfato de sodio y evaporada. La cromatografía de destellos (tolueno/EtOAc 80:20) dio 75 mg (68%) de 12.

[0131] A partir de 11: el mismo procedimiento descrito para la preparación de 9 a partir de 6 fue seguido generando al compuesto 12 en un 69% de producción.

¹H (CDCl₃): δ7.52-7.25 (m, 20 H), 6.42 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 4.94-4.87 (d, J = 3.8, 1 H), 4.82-4.55 (m, 6 H), 4.44 (d, J=11.8 Hz, 1 H), 4.38 (d, J = 11.8 Hz, 1 H), 4.21 (m, 1H), 4.14-3.88 (m, 6 H), 3.63-3.28 (m, 9 H), 2.03 (m, 2 H), 1.81-1.48 (m, 4 H), 1.43 (s, 3 H), 1.32 (s, 1 H), 1.27-1.10 (m, 46 H), 0.92-0.80 (m, 6 H). ¹³C (CDCl₃): δ172.84, 138.45, 138.37, 137.59, 128.49, 128.47, 128.05, 108.72, 99.62, 79.03, 76.70, 73.68, 73.56, 73.03, 71.05, 70.92, 65.34, 48.02, 36.79, 32.03, 31.77, 29.57, 29.46, 28.05, 25.89, 22.80, 19.35, 14.03. Anal. calcd para: C₇₄H₁₁₃N₃O₁₁ (1192.69) C, 74.52; H, 9.55; N, 1.17. Encontrado: C, 74.31; H, 9.67; N, 1.09.

(2S,3S,4R)-5-O-(2-butoxiethyl)-2-(N-exacosanoilamino)-1-O-(α-D-galactopiranosil)-1,3,4,5-pentanetetraol (13).

[0132] A una solución de 70 mg (0.06 milimoles) de 12 en 4 ml de dioxano a 0 °C, se agregó 0.08 mililitros de 4N de HCl en dioxano. A la mezcla se le permitió calentarse a la temperatura del cuarto y se agitó durante 4 horas. El solvente fue evaporado y el producto crudo fue entregado directamente al siguiente paso.

[0133] El crudo fue disuelto en 2 ml de una mezcla de CHCl₃/MeOH. Se agregaron 30 mg de un 10% de Pd(OH)₂/C y la mezcla fue agitada bajo una atmósfera de hidrógeno durante 3 horas. La mezcla fue filtrada a través de celita y el solvente fue evaporado. La cromatografía de destellos (DCM/MeOH 90:10) dio 29 mg (62% en 2 pasos) de 13.

¹H (CDCl₃/CD₃OD 1:1): δ4.87 (d, J = 2.9 Hz, 1 H), 4.21 (m, 1 H), 4.00-3.50 (m, 14 H), 3.46 (t, J = 6.7 Hz, 2 H), 3.30 (m, 2 H), 2.18 (br t, J = 7.3, 2 H), 1.61-1.44 (m, 4 H), 1.40- 1.21 (m, 46 H), 0.95-0.80 (m, 6 H). ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1:1): δ174.72, 99.82, 72.57, 72.00, 71.20, 70.94, 70.42, 70.38, 70.16, 69.84, 69.74, 68.90, 66.92, 61.66, 50.06, 36.32, 31.87, 31.46, 29.61, 29.49, 29.29, 25.85, 22.59, 19.08, 13.71, 13.51. Anal. calcd para: C₄₃H₈₅N₃O₁₁ (792.14) C, 65.20; H, 10.82; N, 1.77. Encontrado: C, 64.91; H, 11.03; N, 1.61.

En una forma similar se puede obtener a los compuestos 14 y 15.

Ejemplo 4

[0134] La secreción de IL-2 por el reconocimiento de glicolípidos por una línea celular de NKT de ratones.

[0135] Glicolípidos: todos los análogos de α-GalCer fueron sintetizados tal como se describió. El α GalCer fue sintetizado de acuerdo a los métodos de la literatura [Figueroa-Pérez, S. y Schmidt, R. R. (2000) Carbohydr. Res., 328, 95-102].

[0136] Los receptores de CD1d con una sobreexpresión de THP1 (línea de células de leucemia monocítica aguda humana - *Human acute monocytic leukemia cell line*) fueron utilizados como APCs (células que presentan antígenos - *antigen presenting cells*) y fueron cultivadas en un medio RPMI (glutamina 2 mM, NaPiruvato 1 mM, aminoácidos no esenciales 1%, kanamicina 100 μl/mililitros, FBS 10%, β-mercaptoetanol 0.01 mM).

[0137] Se utilizaron a células T reactivas de hibridoma FF13 de ratón de CD1d que secretan IL2 como respuesta a una activación para la evaluación de los compuestos. Las células FF13 fueron cultivadas en un medio de RPMI1640 (glutamina 2 mM, NaPiruvato 1 mM, aminoácidos no esenciales 1%, kanamicina 100 μl/mililitro, FBS 10%, β-mercaptoetanol 0.01 mM).

[0138] THP1 hCD1d (células humanas THP-1 transfectadas con CD1D humano) e hibridomas FF13 de células NKT de ratón fueron suministradas por University Hospital Basel.

[0139] Una solución genérica de DMSO (1 mg/mililitro) de los compuestos fue preparada, y diluida a diferentes concentraciones: 10 μg/mililitro; 1.1 μg/mililitro; 0.37 microgramos/mililitro; 0.12 microgramos/mililitro; 0.04 microgramos/mililitro; 0.01 microgramos/mililitro.

Estimulación de FF13

[0140] En una placa de 96 pozos, THP1 (APC) en 90 μ l de un medio libre de sueros (5×10^4 células) se cargó 10 μ l de una solución de los compuestos y se incubó durante 2 horas.

5 **[0141]** 100 μ l de FF13 en un medio completo fueron agregados (10×10^4 por pozo) y después de 48 horas las pruebas fueron evaluadas para detectar su producción de IL2.

10 **[0142]** Las concentraciones de IL2 fueron evaluadas por medio de ELISA utilizando un anticuerpo de IL-2 anti-ratón monoclonal (R&D System), un anticuerpo biotinado de detección de IL-2 anti - ratón (R&D System) y SIGMA FAST OPD como un desarrollador de color. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado utilizando como estándar a un IL2 de ratón recombinante (R&D System).

15 **[0143]** La figura 2 muestra los niveles liberados de IL2 por las células que fueron tratadas con los compuestos 13-16, en comparación al efecto con alfa-GalCer, en una prueba de hibridomas de células NKT. Las células de hibridomas de NKT específicas de α -GalCer fueron agregadas a las células THP-1 transfectadas con CD1d que fueron expuestas durante 2 horas a varias dosis del compuesto de prueba (desde alrededor de 0.1 a alrededor de 10 μ g/mililitro), y los niveles de IL-2 en el medio fueron determinados 48 horas después. Los compuestos 13 y 16 fueron tan efectivos como el α -GalCer a 10 micro molares, y los otros compuestos solamente fueron un poquito menos efectivos. Por lo tanto, el oxígeno insertado en el grupo alquilo de los compuestos ceramidos no tienen un efecto perjudicial en la actividad, y variaciones significativas del grupo alquilo pueden ser hechas con solamente cambios modestos en la actividad.

Ejemplo 5

25 Comparación in vivo entre el alfa-Gal GG y el alfa Gal LP sintéticos.

30 **[0144]** 2 diferentes fuentes de α -GalCer sintéticos fueron comparados. La comparación in vivo de los efectos del "alfa-Gal GG" y "alfa-Gal LP" sintéticos en la presencia de antígenos de la influenza fue hecha en ratones adultos Balb/C. Ambos α -GalCers fueron suministrados inicialmente disueltos en H₂O y un 0.5 por ciento de Tween 20. Este material disuelto en Tween 20 fue administrado ya sea solo o en combinación con una emulsión de escualeno en agua MF59. Los α -GalCers fueron agregados a MF59 (no formulados) o fueron incorporados al MF59 (formulados).

35 **[0145]** Grupos de 8 ratones adultos (de 7 semanas) fueron expuestos a 2 inmunizaciones, con una separación de 3 semanas. Adicionalmente, un grupo de ratones no recibió ninguna administración de ninguna composición de vacuna y fue utilizado como un control. La composición de inmunización comprende a un antígeno de influenza "gripe" y para cada inmunización, cada ratón recibió como antígeno de influenza a 0.1 μ g de A/Solomon H1N1, 0.1 μ g de A/Wisconsin H3N2 o 0.1 Microgramos de B/Malasia. Para ratones tratados con un α -GalCer, cada ratón recibió 0.1 μ g de un α -GalCer por cada inmunización. Una inmunización fue administrada por medio de inyecciones intramusculares de una composición de 50 μ l en la pierna. 3 semanas después de la primera administración, la 2^a inmunización fue entregada donde unos 50 μ l adicionales de la vacuna en una pierna diferente fueron administrados. Cada una de las siguientes composiciones fueron administradas a un grupo de ratones:

Gripe;

45 Gripe y MF59;

Gripe y α -Gal GG

50 Gripe y MF59 y α -Gal GG

Gripe y MF59 y α -Gal GG, formuladas;

Gripe y α -Gal LP

55 Gripe y MF59 y α -Gal LP

Gripe y MF59 y α -Gal LP (formuladas).

60 **[0146]** La respuesta inmunológica a la composición de vacunación fue evaluada 2 semanas después de la 2^a administración de inmunización. Las medidas de título de HI (hemaglutinación-inhibición) y de títulos de IgG fueron registradas y utilizadas como indicadores de la respuesta inmunológica. Los títulos de HI fueron medidos utilizando un ensayo de HI y títulos IgG tal como fueron medidos por ELISA. Un resumen de los resultados se encuentra en la figura 3, 4 y 5 y muestran los títulos HI en respuesta a H3N2 (A/Wisconsin), los títulos de IgG en respuesta a B (B/Malasia), H1N1 (A/Solomon) y H3N2 (A/Wisconsin), y subclases de títulos de IgG, respectivamente.

65

Ejemplo 6

[0147] Comparación in vivo entre el alfa-Gal LP y sus derivados.

5 **[0148]** Las comparaciones in vivo de los efectos de los compuestos a-Gal LP, 13, 14, 15 y 16 son hechos en ratones adultos Balb/C con antígenos de influenza. Los compuestos 13-16 son sintetizados tal como se describió en la especificación.

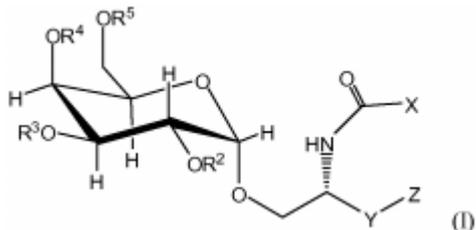
10 **[0149]** Grupos de 8 ratones adultos (de 7 semanas) fueron expuestos a 2 inmunizaciones, con 3 semanas de separación. Adicionalmente, a 4 ratones no se les administró ninguna composición de vacuna y fueron utilizados como el grupo de control. La composición de inmunización comprende a un antígeno de la influenza "gripe" que incluye a 0.1 µg de hemaglutinina de cada una de las cepas 2008/09, es decir, similar a A/Brisbane/59/2007, similar a A/Brisbane//10/2007 y similar a B/Florida/4/2006. Para ratones que serían tratados con un α-GalCer, cada ratón
15 recibe 0.1 µg de un α-GalCer para cada inmunización. Una inmunización es administrada por medio de inyecciones intramusculares de unos 50 µl de la composición en la pierna. 3 semanas después de la primera administración, la 2ª inmunización es entregada donde unos 50 µl adicionales de la composición son administrados en una pierna diferente. Cada una de las siguientes composiciones son administradas a un grupo de ratones:

- 20 Gripe;
- Gripe y adyuvante de MF59;
- Gripe y a-Gal LP
- 25 Gripe y el compuesto 13 (H2O/Tween 20 0.5%), **14** (H2O/Tween 20 0.5%), **15** (H2O), o **16** (H2O/Tween 20 0.5%);
- Gripe y MF59 / a-Gal LP; y
- 30 Gripe y MF59/compuesto 13, 14, 15, o 16.

[0150] La respuesta inmunológica a la composición de vacunación es evaluada 2 semanas después de la 2ª administración de la inmunización. Mediciones de los títulos de HI (hemaglutinación-inhibición), los títulos de IgG y de las subclases de IgG son registradas y utilizadas como indicadores de la respuesta inmunológica. Los títulos de HI son medidos utilizando un ensayo de HI y los títulos de IgG son medidos por medio de Elisa.
35

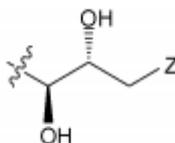
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I:

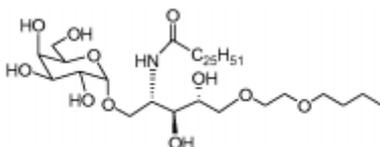


donde R^2 , R^3 , R^4 y R^5 cada uno representan independientemente a H o a un grupo protector;
 X es un grupo hidrocarbilo C4-C30 que puede ser sustituido;
 Y es un alquileo C1-C6 que puede ser sustituido con hasta 2 grupos seleccionados independientemente de un enlazador alquenileno halo, alquilo C1-C6, alcoxi C1-C6, haloalquilo C1-C6 e hidroxilo, o alquenileno C2-C6 que puede ser sustituido con hasta dos grupos;
 y Z es $-OR^1$, donde R^1 es un grupo hidrocarbilo C4-C20 que puede contener a un heteroátomo dentro de su estructura, y es opcionalmente sustituido;
 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

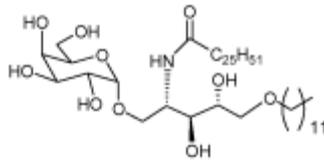
2. El compuesto de la reivindicación 1, donde X es un grupo alquilo no sustituido que tiene de 10-30 carbonos.
 3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, donde Y es $-CH(OH)-CH(OH)-CH_2-$.
 4. El compuesto de la reivindicación 3, donde $-Y-Z$ es



5. El compuesto de cualquiera de reivindicaciones 1-4, donde Z es $-OR^1$, donde R^1 es un hidrocarbilo C4-C20.
 6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde Z es $-OR^1$, donde R^1 es $(CH_2)_m-O-R^{1b}$, donde m es 1-6 y R^{1b} es un alquilo, un cicloalquilo, o un cicloalquilalquilo C1-C16.
 7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde cada uno de R^2 , R^3 , R^4 y R^5 es H.
 8. El compuesto de la reivindicación 1, que es seleccionado de un grupo que consiste de

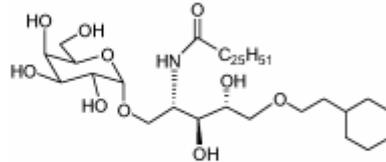


5



10

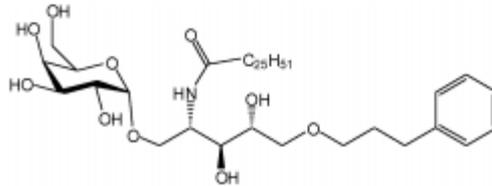
15



20

y

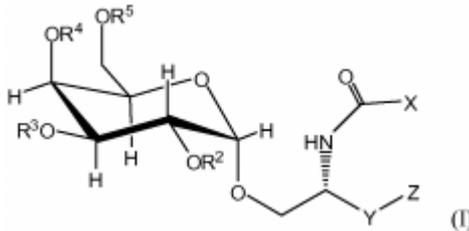
25



30

9. Una composición inmunogénica que comprende a un compuesto de la fórmula I:

35



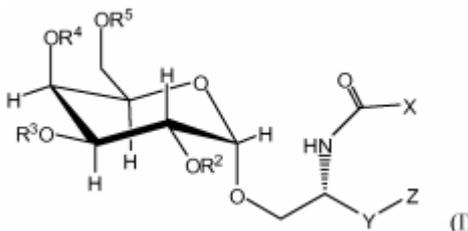
40

donde R², R³, R⁴ y R⁵ cada uno representan independientemente H o a un grupo protector;
 X es un grupo hidrocarbilo C₄-C₃₀ que puede ser sustituido;
 Y es un enlazador alquileo C₁-C₆ o alqueniilo C₂-C₆ que puede ser sustituido con hasta 2 grupos;
 y Z es -OR¹, donde R¹ es un grupo hidrocarbilo C₄-C₂₀ que puede contener a un heteroátomo dentro de su estructura, y es sustituido opcionalmente;
 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un antígeno.

50

10. Un compuesto de la fórmula I:

55



60

donde R², R³, R⁴ y R⁵ representa cada uno independientemente H o A un grupo protector;
 X es un grupo hidrocarbilo C₄-C₃₀ que puede ser sustituido;
 Y es un enlazador alquileo C₁-C₆ o C₂-C₆ que puede ser sustituido con hasta 2 grupos;

65

y Z es $-OR^1$, donde R^1 es un grupo hidrocarbilo C4-C20 que puede contener a un heteroátomo dentro de su estructura, y es sustituido opcionalmente;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en un método para incrementar la respuesta inmunológica provocada por un antígeno en un sujeto que recibe al antígeno.

- 5
11. El compuesto para el uso de la reivindicación 10, donde el antígeno y el compuesto de la fórmula I son administrados al mismo tiempo o en el mismo día.
- 10
12. El compuesto para el uso de la reivindicación 10, donde el antígeno es seleccionado de antígenos bacterianos, antígenos virales, antígenos de hongos, antígenos de protozoos y antígenos relacionados con tumores.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

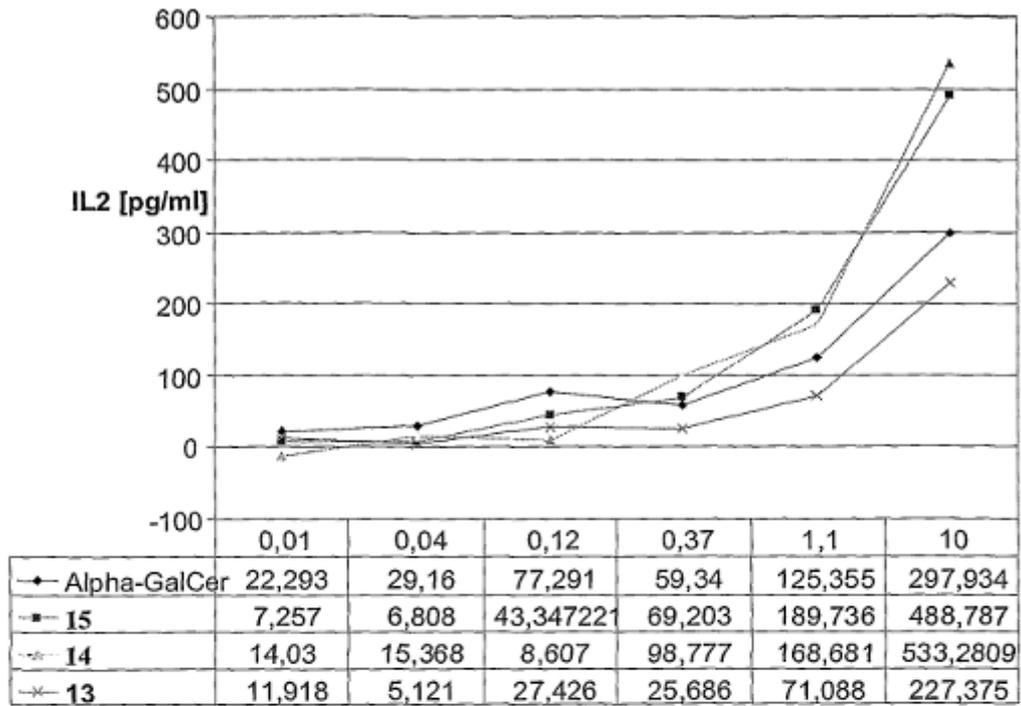


Figura 2

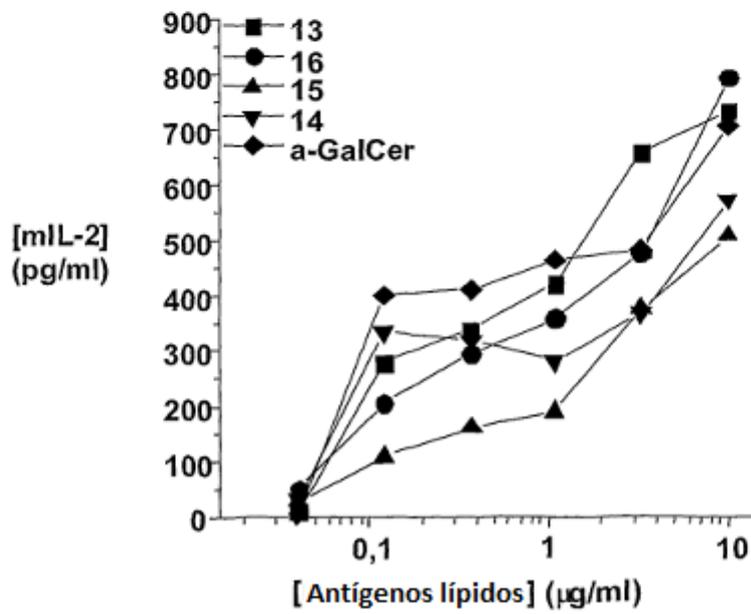


Figura 3

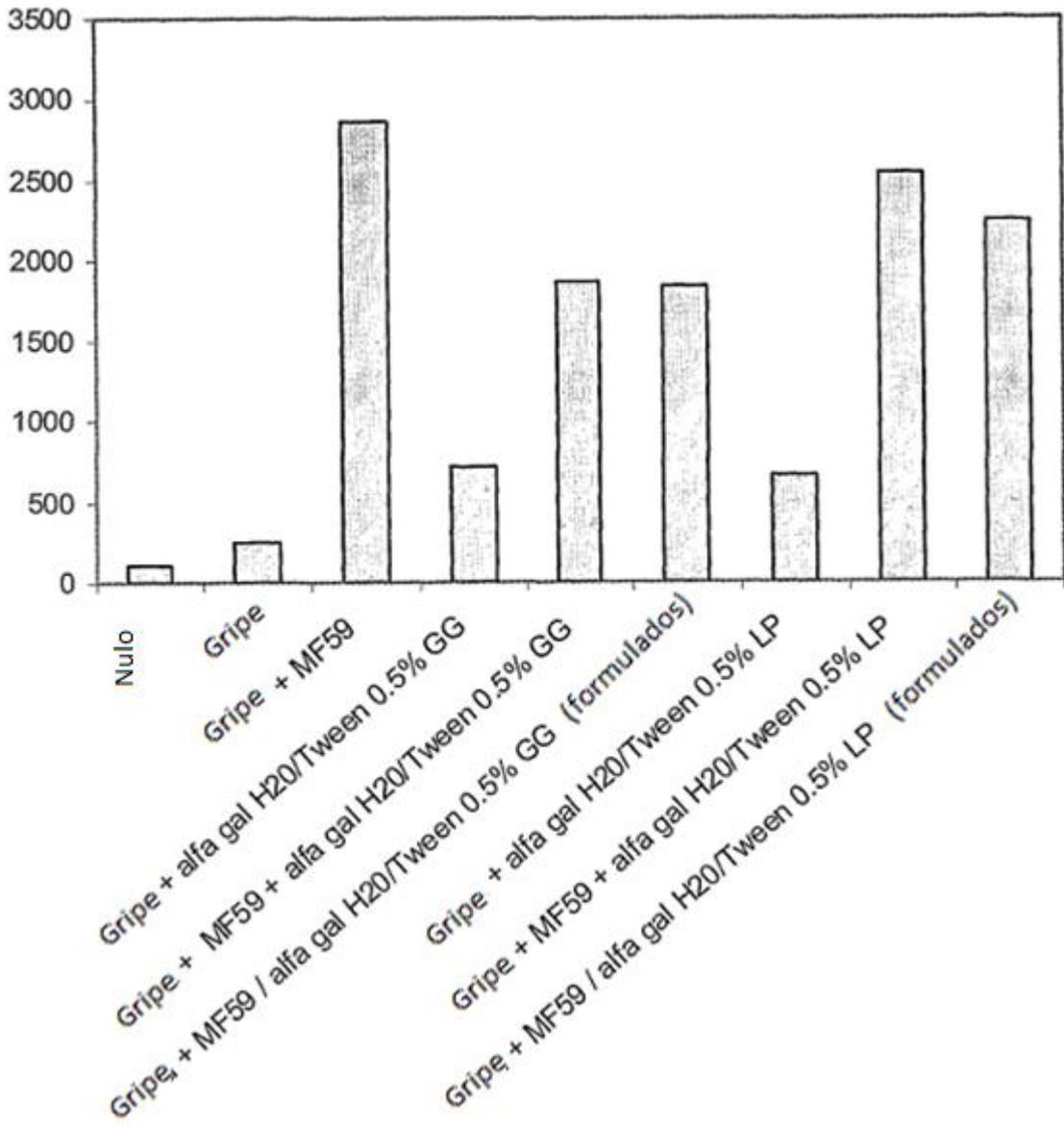


Figura 4

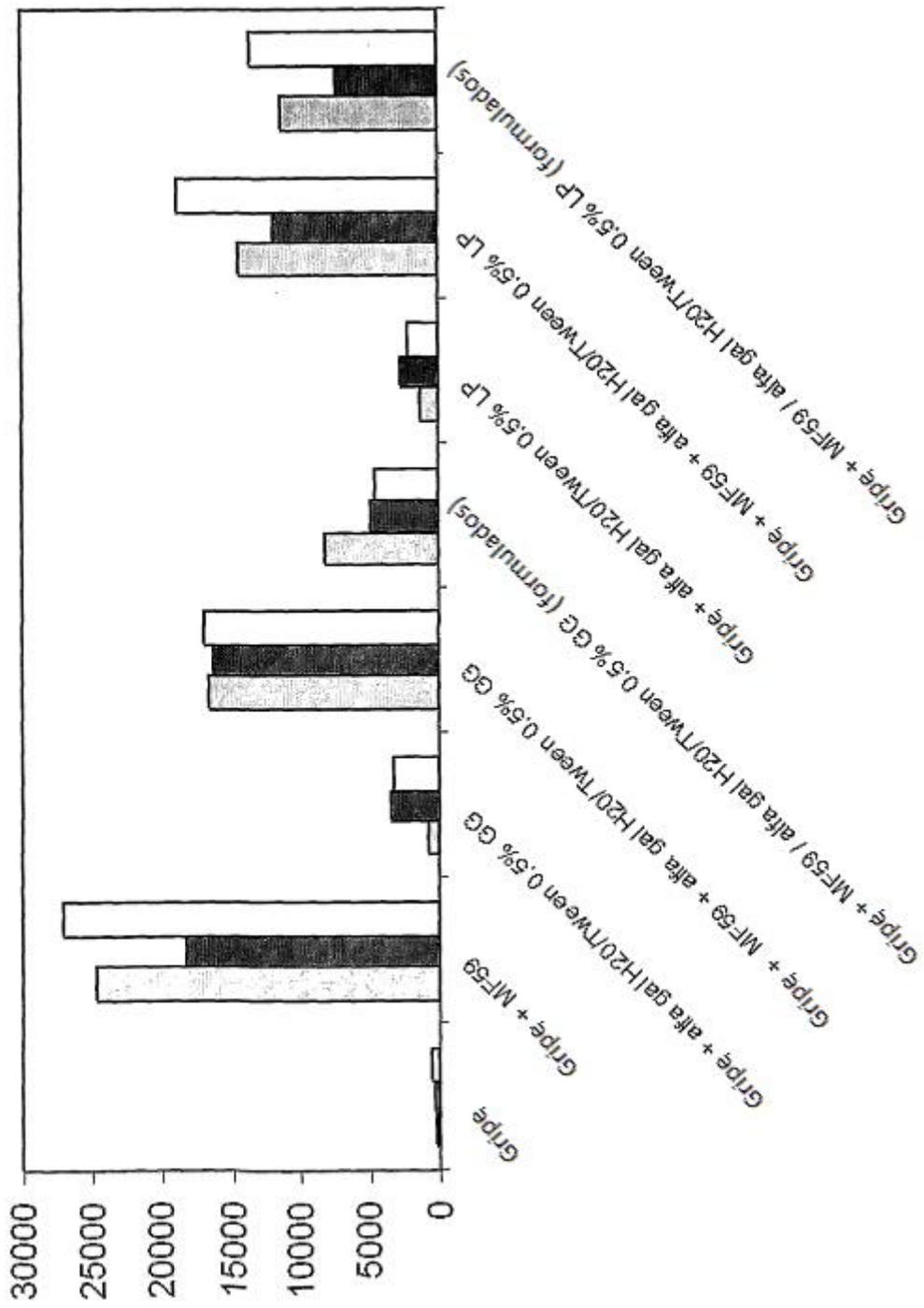


Figura 5

