

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 563**

51 Int. Cl.:

C07H 15/12 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
A61K 39/235 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2010 PCT/US2010/037466**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO2010141861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010 E 10784178 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2437753**

54 Título: **Ayudantes lipídicos de glucopiranosilo sintéticos y composiciones de vacuna que contienen los mismos**

30 Prioridad:

05.06.2009 US 184703 P

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

24.03.2017

73 Titular/es:

**INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE
(100.0%)
1616 Eastlake Avenue East, Suite 400
Seattle, Washington 98102, US**

72 Inventor/es:

**REED, STEVEN, G. y
CARTER, DARRICK**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 606 563 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

Adyuvantes lipídicos de glucopiranosilo sintéticos y composiciones de vacuna que contienen los mismos

Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio según 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/184.703 presentada el 5 de junio de 2009.

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

10 La presente invención se refiere al campo de las composiciones farmacéuticas y de vacunas. Más específicamente, las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a composiciones farmacéuticas y de vacuna, así como a métodos profilácticos y terapéuticos relacionados, en los que las composiciones comprenden un adyuvante lipídico de glucopiranosilo (GLA, *glucopyranosyl lipid adjuvant*) tal como se describe en el presente documento.

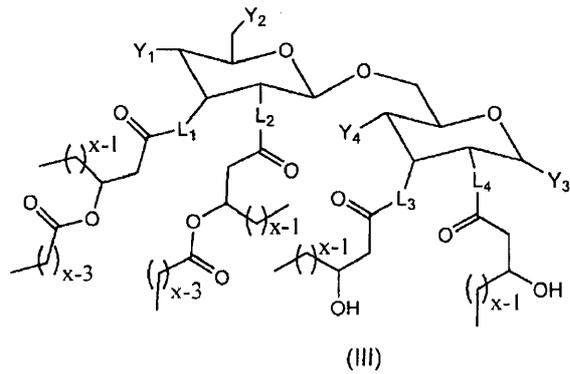
Descripción de la técnica relacionada

15 El sistema inmunitario de los organismos superiores se ha caracterizado mediante la distinción entre agentes foráneos (o no propios, "non-self") de los componentes familiares o propios ("self"), de tal manera que los agentes foráneos provocan respuestas inmunitarias, mientras que los componentes propios se ignoran o toleran. Las respuestas inmunitarias se han caracterizado tradicionalmente o bien como respuestas humorales, en las que se producen anticuerpos específicos para los antígenos por linfocitos B diferenciados conocidos como células plasmáticas, o bien como respuestas mediadas por células, en las que diversos tipos de linfocitos T actúan para eliminar los antígenos mediante varios mecanismos. Por ejemplo, las células T auxiliares CD4+, que pueden reconocer antígenos específicos, pueden responder liberando mediadores solubles, tales como las citocinas, para reclutar células del sistema inmunitario adicionales para que participen en una respuesta inmunitaria. También las células T citotóxicas CD8+, que también pueden reconocer un antígeno específico, pueden responder uniéndose a y destruyendo o dañando una célula o partícula que porte el antígeno. En las técnicas inmunológicas, se sabe proporcionar determinadas vacunas según varias formulaciones, habitualmente con el propósito de inducir una respuesta inmunitaria deseada en un huésped.

20 Varias estrategias para provocar respuestas inmunitarias específicas mediante la administración de una vacuna a un huésped incluyen la inmunización con patógenos infecciosos muertos por calor o vivos pero atenuados, tales como virus, bacterias o determinados patógenos eucariotas; la inmunización con un agente infeccioso no virulento que puede dirigir la expresión del material genético que codifica para el/los antígeno(s) para los que se desea una respuesta inmunitaria; y la inmunización con vacunas de subunidades que contienen inmunógenos (tales como proteínas) aislados a partir de un patógeno particular con el fin de inducir inmunidad frente al patógeno (véase, por ejemplo, Liu, 1998, *Nature Medicine* 4 (supl. 5): 515). Para determinados antígenos, puede haber uno o más tipos de inmunidades deseadas para las que ninguno de estos enfoques ha sido particularmente eficaz, incluyendo el desarrollo de vacunas que son eficaces para proteger inmunológicamente al huésped frente a virus de la inmunodeficiencia humana u otros patógenos infecciosos, cáncer, enfermedad autoinmunitaria u otros estados clínicos.

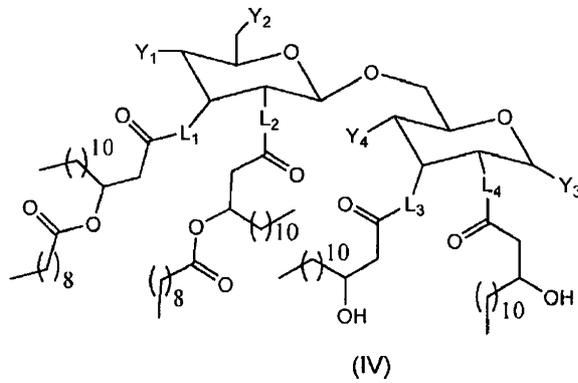
25 Se sabe desde hace mucho tiempo, que el lipopolisacárido (LPS) enterobacteriano es un estimulador potente del sistema inmunitario, aunque su uso en adyuvantes se ha restringido por sus efectos tóxicos. Un derivado no tóxico del LPS, el monofosforil-lípido A (MPL), producido mediante la eliminación del grupo hidrato de carbono y del grupo fosfato centrales de la glucosamina de extremo reductor, se ha descrito por Ribí *et al.* (1986, *Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Plenum Publ. Corp. NY, págs. 407-419).

30 Una versión desintoxicada adicional del MPL resulta de eliminar la cadena de acilo de la posición 3 de la estructura principal de disacárido, y se denomina monofosforil-lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL). Puede purificarse y prepararse mediante métodos que se enseñan en el documento GB 2122204B, referencia que también describe la preparación del difosforil-lípido A y sus variantes 3-O-desaciladas. Por ejemplo, se ha preparado el 3D-MPL en forma de una emulsión que tiene un tamaño de partícula pequeño de menos de 0,2 µm de diámetro, y su método de fabricación se describe en el documento WO 94/21292. En el documento WO 9843670A2 se han descrito formulaciones acuosas que comprenden monofosforil-lípido A y un tensioactivo. El documento WO 2009/035528 A2 describe monosacáridos y disacáridos funcionalizados adecuados para su uso en la síntesis de moléculas de lípido A, que pueden modular la respuesta inmunológica innata. Montminy S. *et al.*, "Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolisaccharide response", *NATURE IMMUNOLOGY*, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, (20061001), vol. 7, n.º 10, páginas 1066 - 1073, describe el papel del lípido A en la respuesta inmunitaria mediada por TLR 4. El documento EP 0 172 581 A2 describe derivados de disacárido que tienen actividades similares al lípido A natural. Yoshiyuki F. *et al.*, "Synthesis of *Rubrivivax gelatinosus* Lipid A and Analogues for Investigation of the Structural Basis for Immunostimulating and Inhibitory Activities", *BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN*, vol. 81, n.º 7, páginas 796 - 819, describe la síntesis de lípido A de *Rubrivivax gelatinosus* y derivados del mismo, que mostraron una potente actividad inmunoestimuladora. Los coadyuvantes derivados de lipopolisacárido



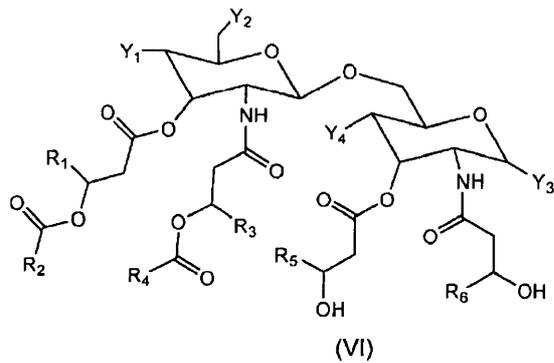
3. Un compuesto de GLA según el punto 2, en el que x se selecciona de un número entero de 10-12.

4. Un compuesto de GLA según el punto 3, en el que x es 11, y el compuesto de GLA tiene la siguiente estructura (IV):



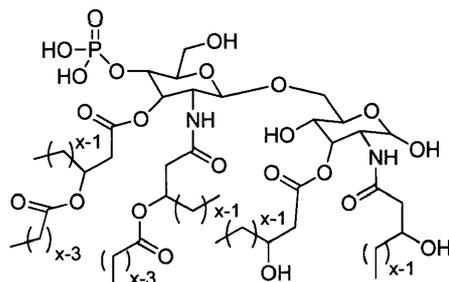
5

5. Un compuesto de GLA según el punto 1, en el que L₁ y L₃ son ambos -O- y L₂ y L₄ son ambos -NH-, y el compuesto de GLA tiene la siguiente fórmula (VI):

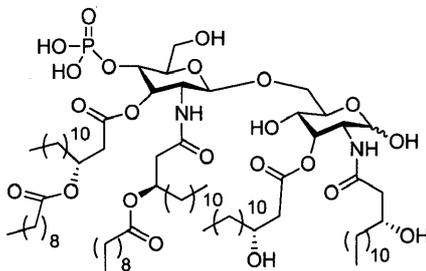


10

6. Un compuesto de GLA según el punto 1, en el que Y₁ es -OP(O)(OH)₂, Y₂, Y₃ e Y₄ son cada uno -OH, L₁ y L₃ son ambos -O-, L₂ y L₄ son ambos -NH-, R₁, R₃, R₅ y R₆ cada uno son alquilo C_x en el que x es constante y se selecciona de un número entero de 8-13, y R₂ y R₄ son ambos alquilo C_{x-2}, y el compuesto de GLA tiene la siguiente fórmula (VIII):



7. Un compuesto de GLA según el punto 6, en la que x es 11, y el compuesto de GLA tiene la siguiente estructura (IX):



- 5 8. Una composición de vacuna que comprende un compuesto de uno cualquiera de los puntos 1-7, en combinación con un antígeno o un vector de expresión recombinante que codifica para un antígeno.
9. La composición de vacuna del punto 8, en la que el constructo de expresión recombinante es un vector viral.
10. La composición de vacuna del punto 9, en la que el vector viral se selecciona del grupo que consiste en un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado, un vector de herpesvirus, un vector de lentivirus, un vector de poxvirus y un vector de retrovirus.
- 10 11. Una composición de vacuna del punto 8, para su uso en la producción o potenciación de una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto.
12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de uno cualquiera de los puntos 1-7, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Una composición farmacéutica del punto 12, para estimular una respuesta inmunitaria inespecífica en un sujeto.
- 15 14. Los compuestos de GLA de la presente invención tienen utilidad en una amplia gama de aplicaciones terapéuticas en las que se desea la inducción de respuestas inmunitarias específicas o inespecíficas. Por ejemplo, en determinados aspectos de la invención, se proporcionan composiciones de vacuna que comprenden uno o más compuestos de GLA tal como se expone en el presente documento en combinación con un antígeno. Tales composiciones de vacuna pueden usarse ventajosamente en métodos para estimular respuestas inmunitarias específicas de antígeno en sujetos que lo necesitan. En otros aspectos de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de GLA tal como se expone en el presente documento, en las que las composiciones carecen sustancialmente de antígeno. Tales composiciones farmacéuticas pueden usarse ventajosamente en métodos para estimular respuestas inmunitarias inespecíficas en sujetos que lo necesitan, por ejemplo en el tratamiento de infección, rinitis estacional y similares.
- 20 15. Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Además, en el presente documento se exponen diversas referencias que describen con más detalle determinados aspectos de esta invención.

Breve descripción de las diversas vistas del/de los dibujos(s)

- 30 La figura 1 demuestra la producción de la citocina IFN- γ inducida *in vivo* tras la vacunación de ratones con composiciones de la invención que comprenden antígeno y GLA.
- Las figuras 2A-2F muestran respuestas de anticuerpos inducidas *in vivo* tras la vacunación de ratones con composiciones de la invención que comprenden antígeno y GLA.
- La figura 3 muestra la potenciación de NF- κ B observada a diferentes concentraciones de un compuesto de GLA ilustrativo de la invención (compuesto IX).
- 35 4. Las figuras 4A-4D muestran la inducción de citocinas inmunoestimuladoras (MIP-1b y TNF α) a diferentes concentraciones de un compuesto de GLA ilustrativo de la invención (compuesto IX).

Descripción detallada de la invención

- 40 Se sabe que el monofosforil-lípido A (MPL) y otros adyuvantes relacionados median en sus efectos, al menos en parte, actuando como agonistas de receptores de tipo *tol* (TLR). Los compuestos de adyuvante lipídico de glucopiranosilo (GLA) de la presente invención se diseñaron de manera racional basándose en consideraciones de estructura 3D en relación con la estimulación de receptores TLR. Más específicamente, según la presente invención, definiendo selectivamente las longitudes de cadena de acilo de los compuestos de GLA de la invención de tal manera que logren una parte inferior "plana" en la estructura tridimensional de los compuestos, puede lograrse un encaje mejorado dentro del sitio de unión de un receptor TLR, dando como resultado de ese modo propiedades

5 inmuoestimuladoras potenciadas y estimulación potenciada de TLR. Además, la solubilidad de los compuestos de GLA de la invención (por ejemplo, en disoluciones acuosas) se mejora ventajosamente debido a las longitudes de cadena de acilo acortadas, facilitando de ese modo una formulación de compuestos eficiente y eficaz. Además, dado que las longitudes de cadena de acilo se adaptan a medida para hacer que la molécula sea “plana” de manera tridimensional a lo largo de la parte inferior de la molécula, los compuestos pueden incorporarse más eficazmente dentro de vesículas, por ejemplo, para formulaciones liposómicas.

10 Todavía más, los compuestos de la invención proporcionan perfiles ventajosos de potencia con respecto a toxicidad. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden usarse en un intervalo amplio y relativamente alto de dosificaciones para lograr un nivel de actividad deseado (por ejemplo, actividad adyuvante), y que sigan siendo al mismo tiempo sustancialmente no tóxicos para células humanas y para pacientes humanos, tal como se someten a ensayo, por ejemplo, mediante los niveles de factor de necrosis tumoral producido a partir de células humanas en un intervalo de concentraciones, que se eleva rápidamente y se equilibra a diferencia de otros agonistas de TLR4 más tóxicos tales como lipopolisacárido. Este ensayo basado en células debe ser predictivo de marcadores inflamatorios inferiores como la proteína C-reactiva implicada en acontecimientos adversos en la farmacología de seres humanos.

15 El perfil favorable de potencia frente a toxicidad para los compuestos de la invención puede ser particularmente importante, por ejemplo, cuando se administran a niños cuya tolerancia a citocinas puede ser menor, o cuando los compuestos se usan en formulaciones dirigidas a una población grande en la que respuestas más niveladas se traducirán en desenlaces clínicos más constantes para personas con una capacidad de respuesta variada al agonismo de TLR. De manera similar, se simplificará la aprobación normativa puesto que la dosificación objetivo será más flexible y se simplificará la fabricación cuando no sea necesario controlar el intervalo de principio activo farmacéutico a un nivel de tolerancia estricto.

20 Por tanto, la presente invención en sus múltiples realizaciones proporciona compuestos, composiciones de vacuna, composiciones de adyuvante, composiciones farmacéuticas y formulaciones relacionadas y métodos relacionados que incluyen compuestos de GLA sintéticos tal como se describe en el presente documento. Los compuestos de GLA representan inmunomoduladores sintéticos que, ventajosamente con respecto a adyuvantes de la técnica anterior, y en particular con respecto a adyuvantes de productos naturales, pueden prepararse en una forma esencialmente homogénea. Además, los compuestos de GLA de la invención pueden prepararse de manera eficaz y económica mediante fabricación química de síntesis a gran escala, a diferencia de los adyuvantes derivados de productos naturales. Dado que un adyuvante sintético que se sintetiza químicamente a partir de materiales de partida definidos para obtener un producto definido químicamente presenta coherencia cualitativa y cuantitativa entre lotes, los compuestos de GLA de la invención ofrecen beneficios que incluyen un control de calidad del producto mejorado.

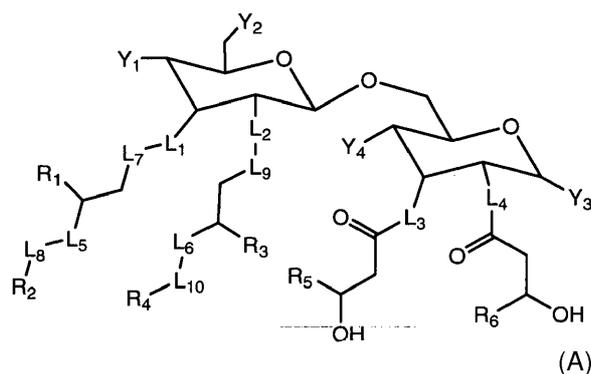
25 Tal como se describe en el presente documento, las composiciones y los métodos para su uso incluyen en algunas realizaciones el uso del GLA por sí mismo con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable para su actividad como adyuvante inmunológico (por ejemplo, actividad inmuoestimuladora inespecífica), incluyendo “como adyuvante” cuando la administración del GLA a un sujeto puede ser totalmente independiente de, y/o separada temporal y/o espacialmente de, la administración al sujeto de uno o más antígenos frente a los que se desea la producción o la potenciación de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta específica de antígeno) en el sujeto. Otras realizaciones incluyen el uso del GLA en una composición de vacuna que también incluye uno o varios antígenos para los que se desea que la vacuna produzca o potencie una respuesta inmunitaria.

30 Tal como se describe en el presente documento, estas composiciones de vacuna también pueden incluir en determinadas realizaciones relacionadas uno o más agonistas del receptor de tipo *toll* (TLR) y/o uno o varios de uno o más coadyuvantes, un modificador de respuesta inmunitaria de imidazoquinolina o un modificador inmunitario de doble tallo-bucle (dSLIM). En otras realizaciones relacionadas, una composición de vacuna tal como se proporciona en la presente memoria puede comprender GLA y uno o más constructos de expresión recombinantes, comprendiendo cada uno de ellos un promotor operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico que codifica para el antígeno frente al que se desea la producción o la potenciación de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta específica de antígeno) en el sujeto.

GLA

35 Tal como se indicó anteriormente, dado que el GLA es un adyuvante sintetizado químicamente, el GLA puede prepararse en una forma esencialmente homogénea, lo que se refiere a una preparación de GLA que es puro en al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% y todavía más preferiblemente al menos el 96%, el 97%, el 98% o el 99% con respecto a la molécula de GLA.

55 Los compuestos de GLA dados a conocer en el presente documento tienen la siguiente fórmula (A):



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ y L₆ son iguales o diferentes e independientemente -O-, -NH- o -(CH₂)-;

L₇, L₈, L₉ y L₁₀ son iguales o diferentes e independientemente ausentes o -C(=O)-;

5 Y₁ es un grupo funcional ácido;

Y₂ e Y₃ son iguales o diferentes e independientemente -OH-, -SH-, o un grupo funcional ácido;

Y₄ es -OH o -SH;

R₁, R₃, R₅ y R₆ son iguales o diferentes e independientemente alquilo C₈₋₁₃; y

R₂ y R₄ son iguales o diferentes e independientemente alquilo C₆₋₁₁.

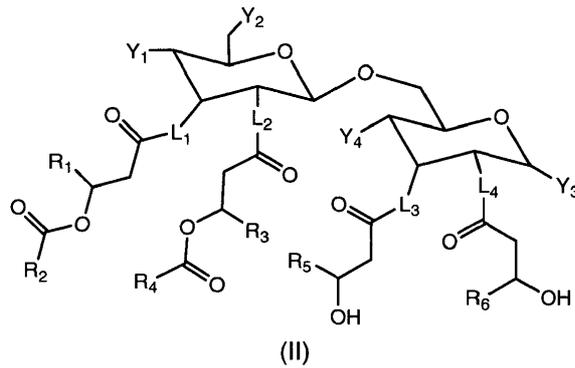
10 Tal como se usa en el presente documento, los términos anteriores tienen el siguiente significado:

“Alquilo” significa un hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificado, no cíclico o cíclico, saturado o insaturado, que contiene desde 1 hasta 20 átomos de carbono, y en determinadas realizaciones preferidas que contiene desde 11 hasta 20 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares, incluyendo undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, etc.; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, isopentilo y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo y similares. Los alquilos cíclicos también se denominan en el presente documento “homociclos” o “anillos homocíclicos”. Los alquilos insaturados contienen al menos un enlace doble o triple entre dos átomos de carbono adyacentes (denominados “alqueniilo” o “alquinilo” respectivamente). Los alqueniilos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y similares; mientras que los alquinilos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo y similares.

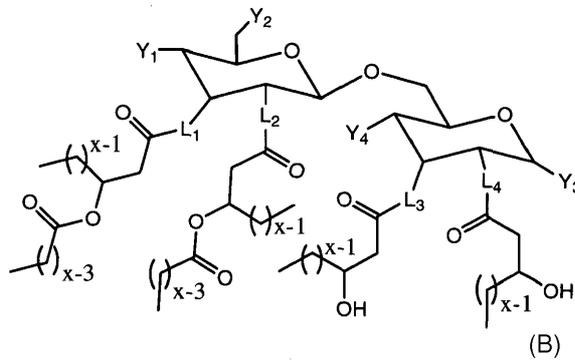
25 “Alquilo C₈₋₁₃” y “alquilo C₆₋₁₁” significan un alquilo tal como se definió anteriormente, que contienen 8-13 o 6-11 átomos de carbono, respectivamente.

“Grupo funcional ácido” significa un grupo funcional que puede donar un protón en medios acuosos (es decir, un ácido de Brønsted-Lowry). Después de donar un protón, el grupo funcional ácido se convierte en una especie cargada negativamente (es decir, la base conjugada del grupo funcional ácido). Los ejemplos de grupos funcionales ácido incluyen pero no se limitan a: -OP(=O)(OH)₂ (fosfato), -OS(=O)(OH)₂ (sulfato), -OS(OH)₂ (sulfito), -C(=O)OH (carboxilato), -OC(=O)CH(NH₂)CH₂C(=O)OH (aspartato), -OC(=O)CH₂CH₂C(=O)OH (succinato) y -OC(=O)CH₂OP(=O)(OH)₂ (carboximetilfosfato).

En realizaciones más específicas, se dan a conocer compuestos de GLA de fórmula (A), en los que L₅ y L₆ son ambos -O y L₇, L₈, L₉ y L₁₀ son cada uno -C(=O)-, y los compuestos de GLA tienen la siguiente fórmula (II):



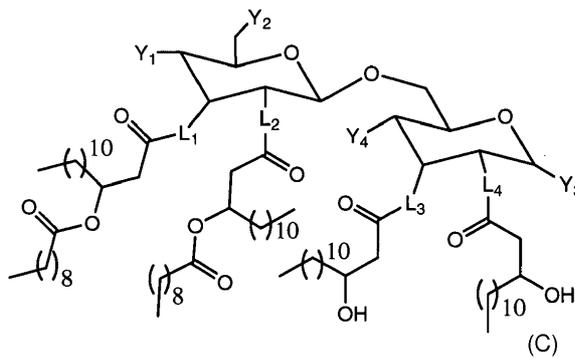
En realizaciones más específicas, se dan a conocer compuestos de GLA de fórmula (II), en los que R_1 , R_3 , R_5 y R_6 son cada uno alquilo C_x , en el que x es constante y se selecciona de un número entero de 8-13, y R_2 y R_4 son ambos alquilo C_{x-2} , y los compuestos de GLA tienen la siguiente fórmula (B):



5

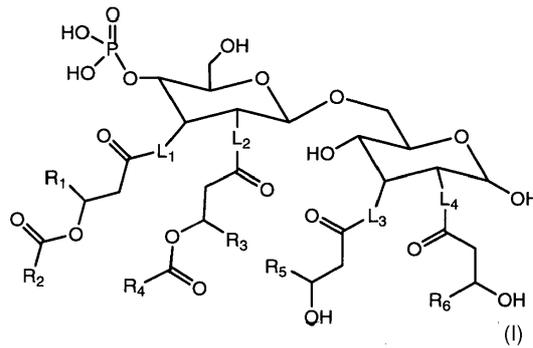
En otras realizaciones más específicas, se dan a conocer compuestos de GLA de fórmula (B), en los que x se selecciona de un número entero de 10-12.

En otras realizaciones más específicas, se dan a conocer compuestos de GLA de fórmula (B), en los que x es 11, y los compuestos de GLA tienen la siguiente estructura (C)

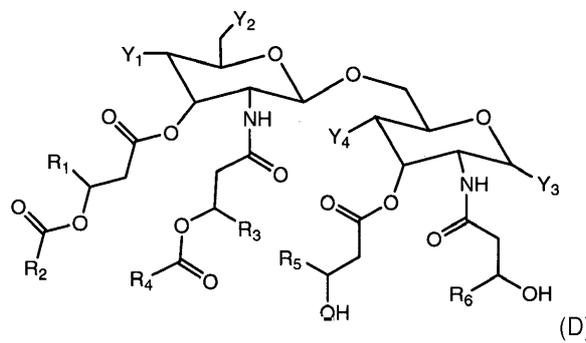


10

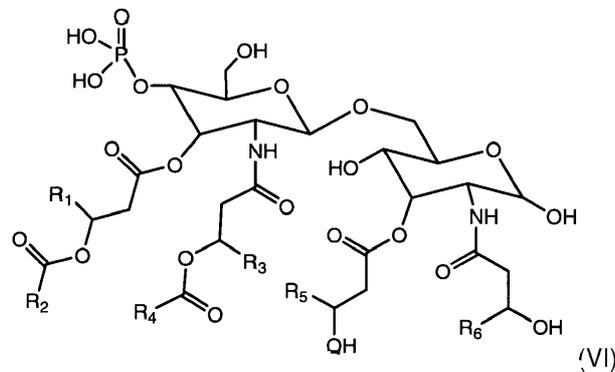
Se dan a conocer además en el presente documento compuestos de GLA de fórmula (II), en los que Y_1 es $-OP(=O)(OH)_2$ e Y_2 , Y_3 e Y_4 son cada uno $-OH$, y los compuestos de GLA tienen la siguiente fórmula (I):



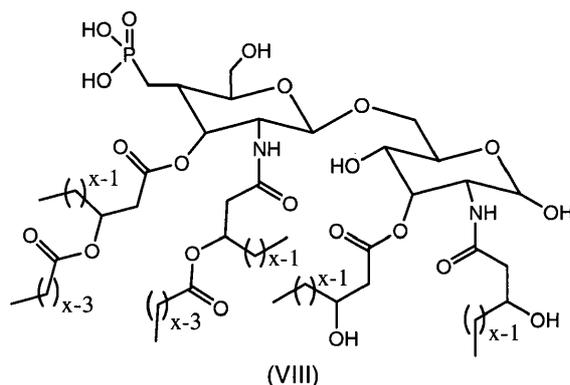
En otras realizaciones específicas, se dan a conocer compuestos de GLA de fórmula (II), en los que L_1 y L_3 son ambos $-O-$ y L_2 y L_4 son ambos $-NH-$, y los compuestos de GLA tienen la siguiente fórmula (D):



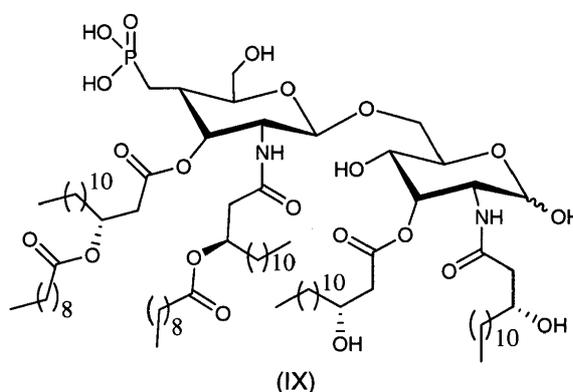
- 5 Se dan a conocer además en el presente documento compuestos de GLA de fórmula (II), en los que Y_1 es $-OP(O)(OH)_2$, Y_2 , Y_3 e Y_4 son cada uno $-OH$, L_1 y L_3 son ambos $-O-$, y L_2 y L_4 son ambos $-NH-$, y los compuestos de GLA tienen la siguiente fórmula (VI):



- 10 En todavía otras realizaciones específicas, la presente invención proporciona compuestos de GLA de fórmula (II), en los que Y_1 es $-OP(O)(OH)_2$, Y_2 , Y_3 e Y_4 son cada uno $-OH$, L_1 y L_3 son ambos $-O-$, L_2 y L_4 son ambos $-NH-$, R_1 , R_3 , R_5 y R_6 cada son alquilo C_x en el que x es constante y se selecciona de un número entero de 8-13, y R_2 y R_4 son ambos alquilo C_{x-2} , y los compuestos de GLA tienen la siguiente fórmula (VIII):



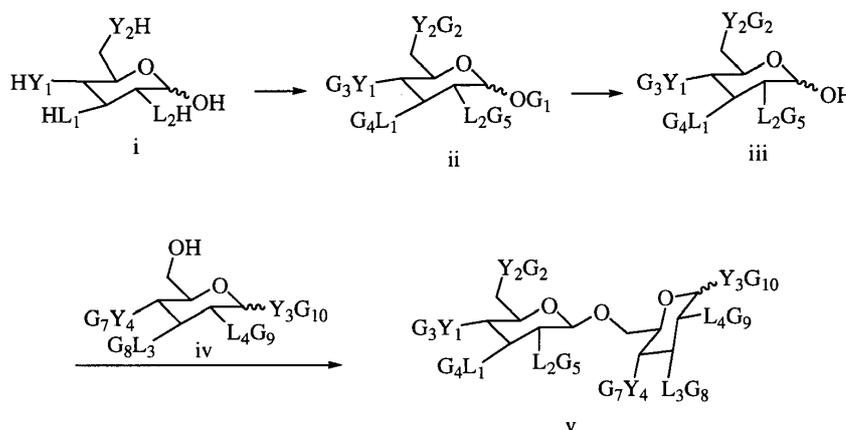
En realizaciones más específicas de fórmula (VIII), x es 11, y la invención proporciona un compuesto de GLA que tiene la siguiente estructura (IX):



5 Compuestos de GLA

Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención proporciona compuestos de GLA. Los compuestos de GLA de la presente invención pueden prepararse mediante técnicas de síntesis orgánica conocidas, incluyendo los métodos descritos con más detalle en los ejemplos. En general, los compuestos de GLA de estructura (I) pueden prepararse mediante los siguientes esquemas de reacción, en los que todos los sustituyentes son tal como se definió anteriormente a menos que se indique de otro modo.

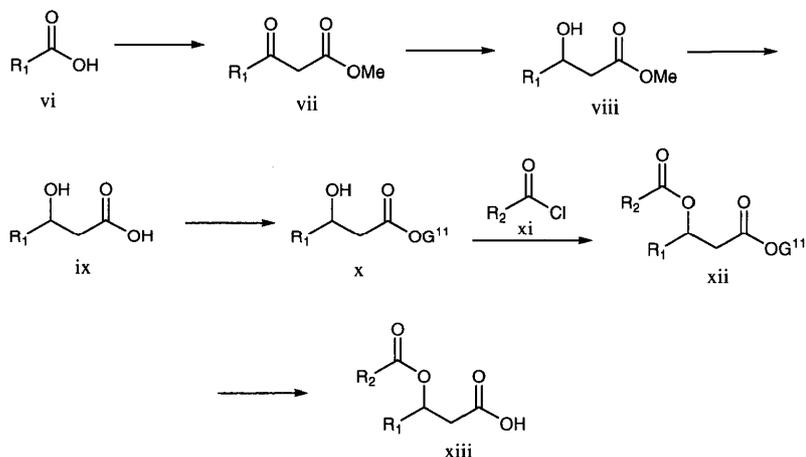
Esquema de reacción 1



La estructura principal de azúcar de compuestos de GLA representativos puede prepararse generalmente según el esquema de reacción 1, en el que G_1 , G_2 , G_3 , G_4 , G_5 , G_6 , G_7 , G_8 , G_9 y G_{10} son o bien iguales o bien diferentes e independientemente un grupo protector apropiado o hidrógeno. Un azúcar apropiado, tal como (i), puede adquirirse o prepararse según métodos que conocen los expertos en la técnica. Los grupos funcionales de azúcar (i) pueden protegerse entonces por completo usando métodos que conocen los expertos en la técnica para obtener (ii). A este respecto, un experto en la técnica reconocerá que puede emplearse una estrategia con grupos protectores ortogonales apropiados que permita la desprotección selectiva de los grupos funcionales de azúcar. Los grupos

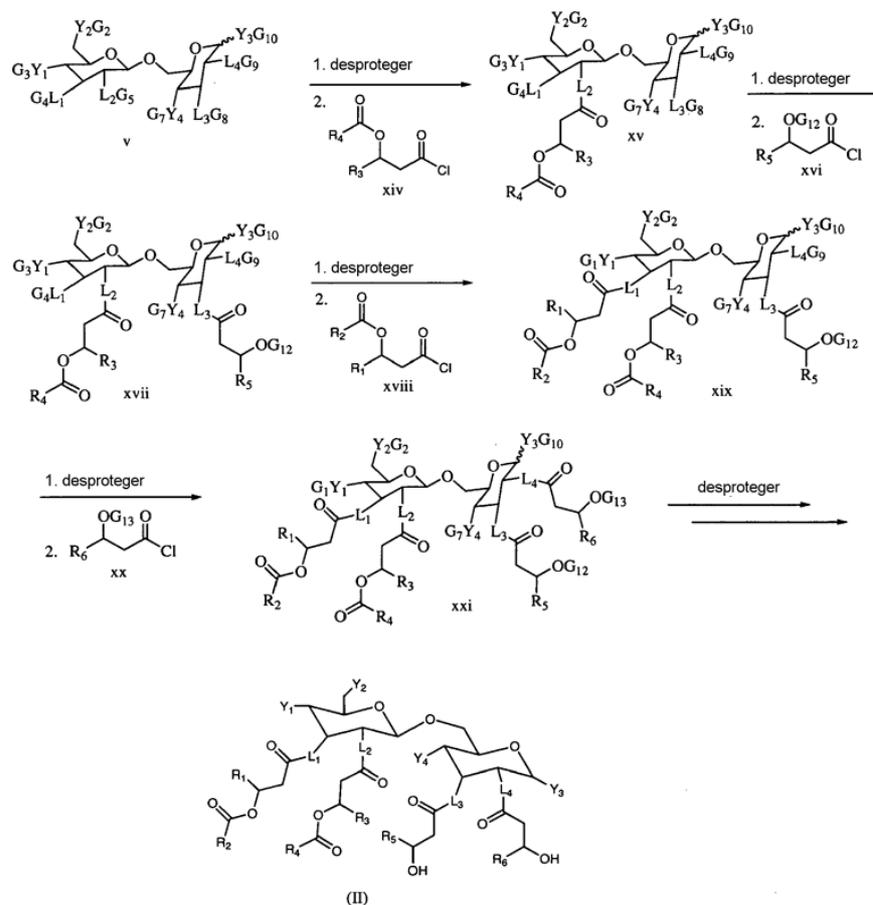
protectores adecuados incluyen pero no se limitan a silil éteres, bencil éteres, alloxycarbonilo, acetales, Fmoc, azida, y similares. La desprotección de G₁ da como resultado el alcohol libre (iii) que puede acoplarse entonces con el azúcar protegido (iv) usando condiciones acoplamiento de apropiadas, por ejemplo CCl₃CN/NaH, para obtener la estructura principal de azúcar (v) deseada.

5 Esquema de reacción 2



Pueden prepararse fragmentos de cola de compuestos de GLA representativos, en los que L₅ y L₆ son ambos -O- y L₇, L₈, L₉ y L₁₀ son cada uno -C(=O)-, generalmente según el esquema de reacción 2, en el que G¹¹ representa un grupo protector apropiado. Pueden adquirirse o prepararse compuestos de ácido de estructura (vi) según métodos que conocen los expertos en la técnica. La reacción de (vi) con un reactivo apropiado, tal como hidrogenomalonato de metilo, proporciona el cetoéster (vii). La reducción de (vii) proporciona el alcohol (viii). Un experto en la técnica reconocerá que en condiciones apropiadas el grupo ceto de (vii) puede reducirse de manera estereoespecífica tal como se ejemplifica en los ejemplos. La saponificación de (viii) proporciona el ácido (ix) que puede protegerse posteriormente para proporcionar (x). El tratamiento de (x) con el cloruro de ácido (xi) proporciona (xii) que tras desprotección proporciona (xiii). Los compuestos (ix) y (xiii) pueden convertirse ambos en un derivado de cloruro de ácido protegido de manera adecuada mediante métodos que conocen los expertos en la técnica y unirse a la estructura principal de azúcar del compuesto de GLA tal como se muestra en el esquema de reacción 3 a continuación. Aunque el esquema de reacción 2 representa la síntesis de un fragmento de cola de compuesto de GLA que comprende R₁ y R₂, debe entenderse que también pueden prepararse otros fragmentos de cola que comprenden otros grupos alquilo (por ejemplo R₃, R₄, R₅, y R₆) mediante un método análogo. También pueden prepararse otros fragmentos de cola con diferentes grupos L₅, L₆, L₇, L₈, L₉ y L₁₀ mediante métodos análogos.

Esquema de reacción 3



Pueden prepararse compuestos de GLA representativos generalmente según el esquema de reacción 3, en el que G₁₂ y G₁₃ son iguales o diferentes e independientemente representan un grupo protector apropiado. La retirada del grupo protector G₅ de (v) seguido por la reacción con el cloruro de ácido (xiv) produce (xv). De manera similar, la retirada del grupo protector G₈ de (xv) seguido por la reacción con el cloruro de ácido (xvi) da como resultado (xvii). La desprotección de (xvii) y la reacción con el cloruro de ácido (xviii) proporciona (xix). La retirada de G₉ y la reacción con (xx) produce entonces el compuesto de GLA protegido (xxi). La desprotección global de (xxi) da como resultado un compuesto de estructura (II). Aunque el esquema de reacción 3 representa la síntesis de un compuesto de estructura (II), un experto en la técnica reconocerá que pueden emplearse métodos análogos para producir cualquier compuesto de estructura (I). Además, un experto en la técnica también reconocerá que con la selección de los grupos protectores apropiados, la desprotección final da como resultado el compuesto deseado.

Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse generalmente como la base libre o el ácido libre. Alternativamente, los compuestos de esta invención pueden usarse en forma de sales de adición de ácido o de base. Las sales de adición de ácido de los compuestos de amino libre de la presente invención pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en la técnica, y pueden formarse a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, metanesulfónico, acético, oxálico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, láctico, mandélico, cinámico, aspártico, esteárico, palmítico, glicólico, glutámico y bencenosulfónico. Los ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico y nítrico.

De manera similar, las sales de adición de base de los compuestos de ácido de la presente invención pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en la técnica, y pueden formarse a partir de bases orgánicas e inorgánicas. Las bases orgánicas adecuadas incluyen pero no se limitan a, trietilamina y piridina. Las bases inorgánicas adecuadas incluyen pero no se limitan a, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, carbonato de potasio y amoníaco. Por tanto, el término "sal farmacéuticamente aceptable" de estructura (I) pretende englobar todas y cada una de las formas de sal aceptables.

Además, también están incluidos profármacos dentro del contexto de esta invención. Los profármacos son cualquier portador unido covalentemente que libera un compuesto de estructura (I) *in vivo* cuando tal profármaco se administra a un paciente. Los profármacos se preparan generalmente modificando grupos funcionales de tal manera que la modificación se escinde, o bien mediante manipulación de rutina o bien *in vivo*, proporcionando el compuesto

original. Los profármacos incluyen, por ejemplo, compuestos de esta invención en los que se unen grupos hidroxilo, amina o sulfhidrilo a cualquier grupo que, cuando se administra a un paciente, se escinde para formar los grupos hidroxilo, amina o sulfhidrilo. Por tanto, los ejemplos representativos de profármacos incluyen (pero no se limitan a) derivados de acetato, formato y benzoato de grupos funcionales alcohol y amina de los compuestos de estructura (I).
 5 Además, en el caso de un ácido carboxílico (COOH), pueden emplearse ésteres, tales como ésteres metílicos, ésteres etílicos, y similares.

Con respecto a los estereoisómeros, los compuestos de estructura (I) pueden tener centros quirales y pueden aparecer como racematos, mezclas racémicas y como enantiómeros o diastereómeros individuales. Todas de tales formas isoméricas están incluidas dentro de la presente invención, incluyendo mezclas de las mismas. Además,
 10 algunas de las formas cristalinas de los compuestos de estructura (I) pueden existir como polimorfos, que están incluidos en la presente invención. Además, algunos de los compuestos de estructura (I) también pueden formar solvatos con agua u otros disolventes orgánicos. Tales solvatos están incluidos de manera similar dentro del alcance de esta invención.

Antígeno

15 Un antígeno para su uso en determinadas realizaciones de las composiciones de vacuna y métodos que emplean GLA descritos en el presente documento, puede ser cualquier epítipo diana, molécula (incluyendo una biomolécula), complejo molecular (incluyendo complejos moleculares que contienen biomoléculas), conjuntos subcelulares, células o tejidos frente a los que se desea una producción o potenciación de la inmunorreactividad en un sujeto. Frecuentemente, el término antígeno se refiere a un antígeno polipeptídico de interés. Sin embargo, antígeno, tal
 20 como se usa en el presente documento, también puede referirse a un constructo recombinante que codifica para un antígeno polipeptídico de interés (por ejemplo, un constructo de expresión). En determinadas realizaciones preferidas, el antígeno puede ser, o puede derivarse de, o puede presentar reactividad inmunológica cruzada con, un patógeno infeccioso y/o un epítipo, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una infección, cáncer, enfermedad autoinmunitaria, alergia, asma o cualquier otro estado en el que sería deseable o beneficiosa la estimulación de una respuesta inmunitaria específica de antígeno.
 25

Preferiblemente y en determinadas realizaciones, las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o una composición antigénica que puede producir una respuesta inmunitaria frente a un patógeno humano o de otro mamífero, antígeno o composición antigénica que puede incluir una composición derivada de un virus, tal como el VIH-1 (tal como tat, nef, gp120 o gp160), virus del herpes humano, tal como gD o derivados del mismo o una proteína de expresión precoz tal como ICP27 de VHS1 o VHS2, citomegalovirus ((esp. humano) (tal como gB o derivados del mismo), rotavirus (incluyendo virus vivos atenuados), virus de Epstein-Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), virus de la varicela zóster (tal como gpl, II e IE63), o de un virus de la hepatitis tal como el virus de la hepatitis B (por ejemplo antígeno de superficie de la hepatitis B o un derivado del mismo), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis E, o de otros patógenos virales, tales como paramixovirus:
 30 virus respiratorio sincitial (tal como las proteínas F y G o derivados de las mismas), virus paragripal, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo, VPH6, 11, 16, 18, etc.), flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la gripe (virus completamente vivos o inactivados, virus de la gripe fraccionado, cultivado en huevos o células MDCK, o virosomas de gripe completos (tal como se ha descrito por Gluck, *Vaccine*, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como las proteínas HA, NP, NA o M o combinaciones de las mismas).
 35

En algunas otras realizaciones preferidas, las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o una composición antigénica que puede producir una respuesta inmunitaria frente a un patógeno humano o de otro mamífero, antígeno o composición antigénica que puede incluir una composición derivada de uno o más patógenos bacterianos, tales como *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de unión a transferina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo, proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular);
 45 *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo pertactina, toxina pertussis o derivados de la misma, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo ESAT6, antígeno 85-A, -B o -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo, factores de colonización, toxina lábil frente al calor o derivados de la misma, toxina estable frente al calor o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina tipo Shiga o derivados de la misma); *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera y derivados de la misma); *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, la proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*,
 50
 55
 60

incluyendo *C. tetani* (por ejemplo, toxina del tétanos y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplos toxinas A o B de *Clostridium* y derivados de las mismas); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina de la difteria y derivados de la misma); *Borelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OIPC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.* Incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de membrana exterior raras), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; u otros patógenos bacterianos.

En algunas otras realizaciones preferidas, las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o una composición antigénica que puede producir una respuesta inmunitaria frente a un patógeno humano o de otro mamífero, antígeno o composición antigénica que puede incluir una composición derivada de uno o más parásitos (véase, por ejemplo, John, D. T. y Petri, W. A., Markell and Voge's Medical Parasitology, 9ª ed., 2006, WB Saunders, Filadelfia; Bowman, D. D., Georgi's Parasitology for Veterinarians - 8ª ed., 2002, WB Saunders, Filadelfia), tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *Leshmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; o a partir de un helminto que puede infectar a un mamífero, tales como: (i) infecciones por nematodos (incluyendo, pero sin limitarse a, *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Wucheria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Draacanculus medinensis*, *Trichinella spiralis* y *Strongyloides stercoralis*; (ii) infecciones por trematodos (incluyendo, pero sin limitarse a, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Opisthorchis sinensis*, *Paragonimus sp.*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola magna*, *Fasciola gigantica*); y (iii) infecciones por cestodos (incluyendo, pero sin limitarse a, *Taenia saginata* y *Taenia solium*). Determinadas realizaciones pueden contemplar por tanto composiciones de vacuna que incluyen un antígeno derivado de *Schistosoma spp.*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* y/o *Schistosoma japonicum*, o derivado de levaduras, tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

Otros antígenos específicos preferidos para *M. tuberculosis* son, por ejemplo, Th Ra12, Tb H9, Tb Ra 35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (documento WO 99/51748). Las proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas, en las que al menos dos polipéptidos, preferiblemente tres, de *M. tuberculosis* se fusionan para dar una proteína mayor. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99151748).

Determinados antígenos preferidos para *Chlamydia* incluyen, por ejemplo, las proteínas de alto peso molecular (HWMP) (documento WO 99/17741), ORF3 (documento EP 366 412) CT622, CT610, pmpD, UVEB y supuestas proteínas de membrana (Pmp). Otros antígenos de *Chlamydia* de la formulación para vacuna pueden seleccionarse del grupo descrito en el documento WO 99128475. Las vacunas bacterianas preferidas comprenden los antígenos derivados de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, PsaA, PspA, PdB, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y el antígeno de proteína pneumolisina (Biochem. Biophys. Acta, 1989, 67, 1007); Rubins *et al.*, Microbial Pathogenesis, 25, 337-342) y derivados mutantes detoxificados del mismo (documentos WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenza* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo), *H. influenza* no tipificable, por ejemplo OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de fimbria (patente estadounidense n.º 5.843.464) o variantes de múltiples copias o proteínas de fusión de las mismas.

Se conocen bien en la técnica derivados del antígeno de superficie de la hepatitis B e incluyen, entre otros, los antígenos PreS1 y Pars2 S descritos en las solicitudes de patente europea EP-A414 374; EP-A-0304 578 y EP 198474. En un aspecto preferido, la formulación de vacuna de la invención comprende el antígeno de VIH-1, gp120, especialmente cuando se expresa en células CHO. En una realización adicional, la formulación de vacuna de la invención comprende gD2t tal como se definió anteriormente en el presente documento.

En una realización preferida de la presente invención, las vacunas que contienen el adyuvante reivindicado comprenden un antígeno derivado del virus del papiloma humano (VPH) considerado responsable de las verrugas genitales (VPH 6 o VPH 11 y otros), y los virus VPH responsables del cáncer de cuello uterino (VPH 16, VPH 18 y otros). Formas particularmente preferidas de vacuna profiláctica o terapéutica contra las verrugas genitales comprenden partículas L1 o capsómeros, y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de las proteínas de VPH 6 y VPH 11, E6, E7, L1 y L2. Determinadas formas preferidas de proteínas de fusión incluyen la L2E7 tal como se da a conocer en el documento WO 96/26277 y la proteína D(1/3)-E7 dada a conocer en el documento GB 9717953.5 (PCT/EP98/05285). Una composición para la profilaxis o vacuna terapéutica preferida frente a la infección o el cáncer de cuello uterino por VPH puede comprender antígenos de

VPH 16 o VPH 18. Por ejemplo, los monómeros de antígeno L1 o L2, o los antígenos L1 o L2 presentados juntos como una partícula pseudoviral (VLP, *virus like particle*) o la proteína L1 sola presentada sola en una VLP o estructura de capsómero. Dichos antígenos, partículas pseudovirales y capsómeros se conocen *per se*. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/00152, WO 94/20137, WO 94/05792 y WO 93/02184.

5 Pueden incluirse proteínas de expresión temprana adicionales solas o como proteínas de fusión, tales como E7, E2 o preferiblemente F5, por ejemplo; las realizaciones preferidas incluyen una VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (documento WO 96/11272). Antígenos de VPH 16 particularmente preferidos comprenden las proteínas de expresión temprana E6 o F7 en fusión con un transportador de proteína D para formar fusiones proteína D-E6 o E7 a partir de VPH 16, o combinaciones de los mismos; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (documento WO 96/26277).
10 Alternativamente, las proteínas de expresión temprana E6 o E7 de VPH 16 o VPH 18 pueden presentarse en una sola molécula, preferiblemente en una fusión proteína D-E6/E7. Tal vacuna puede contener opcionalmente cualquiera de las proteínas E6 y E7 de VPH 18 o ambas, preferiblemente en forma de una proteína de fusión proteína D-E6 o proteína D-E7 o una proteína de fusión proteína D-E6/E7. La vacuna de la presente invención puede comprender adicionalmente antígenos de otras cepas de VPH, preferiblemente de las cepas VPH 31 ó 33.

15 Las vacunas de la presente invención pueden comprender además antígenos derivados de parásitos que producen la malaria. Por ejemplo, los antígenos preferidos de *Plasmodia falciparum* incluyen el, S y TRAP. RTS es una proteína híbrida que comprende esencialmente toda la parte C-terminal de la proteína del circumsporozoito (CS) de *P. falciparum* unida, mediante cuatro aminoácidos de la parte preS2 del antígeno de superficie de la hepatitis B, al antígeno de superficie (S) del virus de la hepatitis B. Su estructura completa se da a conocer en la solicitud de
20 patente internacional n.º PCT/EP92/02591, publicada como el documento WO 93/10152 y que reivindica la prioridad de la solicitud de patente británica n.º 9124390.7. Cuando se expresa en hongos, se produce RTS como una partícula de lipoproteína y cuando se coexpresa con el antígeno S de VHB produce una partícula mixta denominada RTS,S.

25 Los antígenos TRAP se describen en la solicitud de patente internacional n.º PCT/GB89/00895 publicada como el documento WO 90/01496. Una realización preferida de la presente invención es una vacuna contra la malaria en la que la preparación antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros antígenos de plasmidios que son probables candidatos a ser componentes de una vacuna contra la malaria multiestadio son los MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PFXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 de *P. falciparum* y sus análogos en *Plasmodium spp.*

30 Por consiguiente, determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento contemplan un antígeno que se deriva de al menos un patógeno infeccioso, tal como una bacteria, un virus o un hongo, incluyendo una actinobacteria, tal como *M. tuberculosis* o *M. leprae* u otra micobacteria; una bacteria tal como un miembro de los géneros *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia*, *Chlamydia* o *Bordetella*; un virus, tal como un virus del herpes simple, un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), citomegalovirus, virus de varicela zóster, virus de la hepatitis, virus de Epstein Barr (VEB), virus respiratorio sincitial, virus del papiloma humano (VPH) y un citomegalovirus; VIH, tal como VIH-1 o VIH-2; un hongo, tal como *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* y *Pneumocystis*, o una levadura incluyendo especies de *Candida*, tales como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*; un parásito, tal como un protozoo por ejemplo una especie de *Plasmodium*, incluyendo *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*; u otro parásito, tal como uno o más de
35 *Acanthamoeba*, *Entamoeba histolytica*, *Angiostrongylus*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Cryptosporidium*, *Ancylostoma*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Wuchereria bancrofti*, *Giardia* y *Leishmania*.

40 Por ejemplo, en las realizaciones de la vacuna que contiene GLA y que contiene antígenos derivados de *Borrelia sp.*, los antígenos pueden incluir un ácido nucleico, antígeno o preparaciones antigénicas derivadas de un patógeno, proteínas o péptidos producidos de forma recombinante, y proteínas de fusión quiméricas. Uno de tales antígenos es OspA. OspA puede ser una proteína madura completa en forma lipídada por medio de su biosíntesis en una célula huésped (Lipo-OspA) o alternativamente puede ser un derivado no lipídado. Tales derivados no lipídados incluyen la proteína de fusión NS1-OspA no lipídada que tiene los primeros 81 aminoácidos N-terminales de la proteína no estructural (NS1) del virus de la gripe, y la proteína OspA completa, y otra MDP-OspA es una forma no lipídada de
45 OspA que porta 3 aminoácidos N-terminales adicionales.

50 En la técnica se conocen composiciones y métodos para identificar sujetos que tienen, o que se sospecha que están en riesgo de tener, una infección con un patógeno infeccioso tal como se ha descrito en el presente documento.

55 Por ejemplo, la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* produce la tuberculosis (TB). La bacteria ataca generalmente a los pulmones, pero también puede atacar al riñón, la médula espinal y el cerebro. Si no se trata de una forma apropiada, la enfermedad TB puede ser mortal. La enfermedad se transmite de una persona a otra por el aire cuando una persona infectada estornuda o tose. En 2003, se registraron más de 14.000 casos de TB en los Estados Unidos.

Aunque la tuberculosis puede controlarse generalmente usando terapia con antibióticos prolongada, tal tratamiento no es suficiente para prevenir la transmisión de la enfermedad, por lo que existe preocupación con respecto a la

selección potencial de cepas resistentes a antibióticos. Los individuos infectados pueden ser asintomáticos pero contagiosos durante un tiempo. Además, aunque el cumplimiento con el régimen de tratamiento es crítico, el comportamiento del paciente es difícil de monitorizar. Algunos pacientes no completan el ciclo de tratamiento, lo que puede conducir a que el tratamiento no sea eficaz y al desarrollo de resistencia a fármacos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.087.713).

En la actualidad, la vacunación con bacterias vivas es el método más eficaz para inducir inmunidad protectora frente a la tuberculosis. La micobacteria empleada más comúnmente con este objetivo es el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), una cepa avirulenta de *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, la seguridad y eficacia del BCG es una fuente de controversia y en algunos países, como en los Estados Unidos, no se vacuna al público en general. El diagnóstico se obtiene habitualmente usando una prueba cutánea que implica la exposición intradérmica a la tuberculina DPP (derivado de la proteína purificada). Las respuestas de células T específicas de antígeno, producen una induración medible en el lugar de la inyección durante las 48-72 horas después de la inyección, lo que indica que ha habido exposición a los antígenos micobacterianos. Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad han sido un problema con este análisis, ya que los individuos vacunados con BCG no pueden distinguirse de los individuos infectados (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.087.713).

Aunque se ha demostrado que los macrófagos actúan como los principales efectores de la inmunidad frente a *M. tuberculosis*, las células T son los inductores predominantes de dicha inmunidad. El papel esencial de las células T en la protección frente a la infección por *M. tuberculosis* se ilustra mediante la frecuente incidencia de *M. tuberculosis* en pacientes con SIDA, debido a la disminución de las células T CD4 asociadas con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se ha demostrado que las células T CD4 reactivas a las micobacterias son unas potentes productoras de interferón gamma (IFN-gamma) lo que, a su vez, se ha demostrado que desencadena efectos antimicobacterianos de los macrófagos en ratones. Aunque el papel del IFN-gamma en los seres humanos está menos claro, estudios han demostrado que la 1,25-dihidroxi-vitamina D3, tanto sola como combinada con IFN-gamma o factor de necrosis tumoral-alfa, activa los macrófagos humanos para que inhiban la infección por *M. tuberculosis*. Además, se sabe que IFN-gamma estimula a los macrófagos humanos para que produzcan 1,25-dihidroxi-vitamina D3. De forma similar, se ha demostrado que IL-12 desempeña un papel en la estimulación de la resistencia a la infección por *M. tuberculosis*. Para una revisión de la inmunología de la infección por *M. tuberculosis*, véase Chan y Kaufmann en Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, Ed. Bloom, ASM Press. Washington D.C. (1994).

Los compuestos y métodos existentes para el diagnóstico de la tuberculosis o para inducir inmunidad protectora frente a la tuberculosis incluyen el uso de uno o más polipéptidos que contienen al menos una parte inmunogénica de una o más proteínas de micobacterias y de moléculas de ADN que codifican para tales polipéptidos. Pueden usarse kits de diagnóstico que contienen dichos polipéptidos o secuencias de ADN y un reactivo de detección adecuado para la detección de la infección por micobacterias en pacientes y en muestras biológicas. También se proporcionan anticuerpos dirigidos contra tales polipéptidos. Además, tales compuestos pueden formularse en vacunas y/o en composiciones farmacéuticas para la inmunización frente a la infección por micobacterias (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.949.246 y 6.555.653).

La malaria se eliminó en muchas partes del mundo en la década de 1960, pero la enfermedad todavía persiste y hay nuevas cepas emergentes de la enfermedad que son resistentes a los fármacos existentes. La malaria es un problema de salud pública importante en más de 90 países. Nueve de cada diez casos de malaria se producen en el África subsahariana. Más de la tercera parte de la población está en riesgo, y cada año se infectan entre 350 y 500 millones de personas. Cuarenta y cinco millones de mujeres embarazadas están en riesgo de contraer la malaria este año. Entre los individuos ya infectados, más de 1 millón de los infectados mueren cada año debido a una enfermedad que es posible prevenir. La mayoría de estas muertes se producen en niños en África.

La malaria se transmite generalmente cuando a una persona le pica un mosquito anófeles hembra infectado. Para transmitirla, el mosquito debe haber sido infectado por haber extraído sangre de una persona ya infectada con malaria. La malaria la produce un parásito y los síntomas clínicos de la enfermedad incluyen fiebre y síntomas pseudogripales, tales como escalofríos, dolor de cabeza, dolor muscular y cansancio. Estos síntomas pueden estar acompañados por náuseas, vómitos y diarrea. La malaria también puede producir anemia e ictericia debido a la pérdida de glóbulos rojos. La infección con un tipo de malaria, *Plasmodium falciparum*, si no se trata con prontitud, puede producir fallo renal, convulsiones, confusión mental, coma y la muerte.

Se conoce un método *in vitro* para el diagnóstico de la malaria en un individuo que comprende poner en contacto un tejido o un líquido biológico tomado de un individuo con una molécula o una composición polipeptídica, en el que dicha molécula o composición polipeptídica comprende una o más secuencias peptídicas que portan la totalidad o una parte de uno o más epítomos T de las proteínas que resultan de la actividad infecciosa de *P. falciparum*, en condiciones que permiten que se produzca una reacción inmunológica *in vitro* entre dicha composición y los anticuerpos que pueden estar presentes en el tejido o el líquido biológico, y la detección *in vitro* de los complejos antígeno-anticuerpo formados (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.087.231).

Se han descrito la expresión y purificación de un ectodominio AMA-1 de *Plasmodium falciparum* (3D7) recombinante. Los métodos anteriores han producido una proteína altamente purificada que conserva el plegamiento

y los puentes disulfuro de la molécula nativa. El AMA-1 recombinante es útil como reactivo de diagnóstico así como para la producción de anticuerpos, y como proteína para su uso sola, o como parte de una vacuna para prevenir la malaria (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.029.685).

5 En la técnica se han descrito polinucleótidos que codifican para antígenos peptídicos de malaria *P. vivax* específicos de especie que son proteínas o fragmentos de proteínas secretados en el plasma de un mamífero huésped susceptible después de la infección, ya que tienen anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra estos antígenos. Los antígenos peptídicos, anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos policlonales se utilizan en los análisis usados para diagnosticar la malaria, así como para determinar si *Plasmodium vivax* es la especie responsable de la infección (patente estadounidense 6.706.872). También se ha informado de que los antígenos peptídicos de malaria *P. vivax* específicos de especie son proteínas o fragmentos de proteínas secretados en el plasma de un mamífero huésped susceptible después de la infección, ya que tienen anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra estos antígenos. Los antígenos peptídicos, anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos policlonales se utilizan en los ensayos usados para diagnosticar la malaria, así como para determinar si *Plasmodium vivax* es la especie responsable de la infección (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 6.231.861).

15 Un ectodominio AMA-1 de *Plasmodium falciparum* (3D7) recombinante también se ha expresado mediante un método que produce una proteína altamente purificada que conserva el plegamiento y los puentes disulfuro de la molécula nativa. El AMA-1 recombinante es útil como reactivo de diagnóstico, para su uso en la producción de anticuerpos, y como vacuna (patente estadounidense 7.060.276). De forma similar, se conocen la expresión y la purificación de una MSP-1₄₂ de *Plasmodium falciparum* (3D7) recombinante que conserva el plegado y los puentes disulfuro de la molécula nativa. El MSP-1₄₂ recombinante es útil como reactivo de diagnóstico, para su uso en la producción de anticuerpos, y como vacuna (patente estadounidense 6.855.322).

25 Los métodos de diagnóstico para la detección de infecciones de malaria en seres humanos para identificar un sujeto que tiene o que se sospecha que está en riesgo de tener una infección con un patógeno infeccioso de malaria son los conocidos según estas memorias descriptivas y otras relacionadas. Específicamente, por ejemplo, se combinan muestras de sangre con un reactivo que contiene 2-acetilpiridina-adenina dinucleótido (APAD), un sustrato (por ejemplo, una sal de lactato o ácido láctico) y un tampón. El reactivo se diseña para detectar la presencia de una enzima glicolítica única producida por el parásito de la malaria. La enzima se conoce como ácido láctico deshidrogenasa parasitaria (PLDH). La PLDH es fácilmente distinguible de LDH del huésped usando el reactivo descrito anteriormente. La combinación del reactivo con una muestra de sangre parasitada da como resultado la reducción de APAD. Sin embargo, el APAD no se reduce por la LDH del huésped. El APAD reducido puede detectarse entonces mediante varias técnicas, incluyendo análisis espectral, fluorimétrico, electroforético o colorimétrico. La detección del APAD reducido de la manera anterior proporciona una indicación positiva de infección por malaria (por ejemplo, véase la patente estadounidense 5.124.141). En otra metodología para el diagnóstico de la malaria, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos característica derivada del antígeno GLURP de *Plasmodium falciparum*, se reconoce en una muestra de prueba por un anticuerpo específico producido frente a, o reactivo con, el polipéptido (patente estadounidense 5.231.168).

40 La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria extendida con epidemias frecuentes en el subcontinente indio, África y América Latina y el desarrollo de una vacuna es una prioridad de la Organización Mundial de la Salud. Un complejo de diferentes enfermedades, los parásitos de *Leishmania* producen infecciones gravísimas de los órganos internos, así como enfermedades de la piel graves. Una de las formas más devastadoras de la leishmaniasis es una infección que desfigura la nariz y la boca. El número de casos de leishmaniasis está en aumento y en la actualidad está fuera de control de muchas áreas. La leishmaniasis también está en aumento en algunos países desarrollados, específicamente en el sur de Europa, como resultado de la infección por VIH. Los fármacos disponibles son tóxicos, caros y requieren inyecciones diarias durante un largo periodo de tiempo.

45 *Leishmania* son parásitos protozoarios que habitan en los macrófagos o en los glóbulos blancos del sistema inmunitario. Los parásitos se transmiten por la mordedura de pequeños insectos chupadores de sangre (simúlidos) que son difíciles de controlar ya que habitan en amplias áreas del planeta.

50 La leishmaniasis visceral es la más peligrosa de las tres manifestaciones de la enfermedad. Se calcula que se producen aproximadamente 500.000 nuevos casos de la forma visceral (kala-azar o "la enfermedad asesina") cada año. En la actualidad hay más de 200 millones de personas en riesgo de contraer la leishmaniasis visceral. Más del 90 por ciento de los casos de leishmaniasis visceral se producen en la India, Bangladesh, Sudán, Brasil y Nepal. La mayoría de las muertes se producen en niños. Los que padecen la forma cutánea, a menudo quedan desfigurados de forma permanente.

55 Las infecciones por *Leishmania* son difíciles de diagnosticar y normalmente implican el análisis histopatológico de muestras de biopsia de tejidos. Sin embargo, se han desarrollado varios ensayos de diagnóstico serológicos e inmunológicos. (patente estadounidense 7.008.774; Senaldi *et al.* (1996) *J. Immunol. Methods* 193: 9 5; Zijlstra *et al.* (1997) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91: 671 673; Badaro *et al.* (1996) *J. Inf. Dis.* 173: 758 761; Choudhary, S. *et al.* (1992) *J. Comm. Dis.* 24: 32 36; Badaro R. *et al.* (1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 72 78; Choudhary, A. *et al.* (1990) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 363 366; y Reed, S. G. *et al.* (1990) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43: 632 639).

60 Los promastigotes liberan productos metabólicos en el medio de cultivo para producir un medio condicionado. Estos

productos metabólicos son inmunogénicos para el huésped. Véanse los documentos: Schnur, L. F. *et al.* (1972) *Isrl. J. Med. Sci.* 8: 932 942; Sergeiev, V. P. *et al.* (1969) *Med. Parasitol.* 38: 208 212; El-On, J. *et al.* (1979) *Exper. Parasitol.* 47: 254 269; y Bray, R. S. *et al.* (1966) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60: 605 609; patente estadounidense n.º 6.846.648; patente estadounidense n.º 5.912.166; patente estadounidense n.º 5.912.263; y patente estadounidense n.º 5.411.865).

Aproximadamente 40 millones de personas en todo el mundo están infectadas con VIH, el virus que produce el SIDA. Aproximadamente 3 millones de personas mueren debido a la enfermedad cada año, el 95 por ciento de ellas en los países en vías de desarrollo. Cada año, cerca de 5 millones de personas se infectan con el VIH. En la actualidad, los países del África subsahariana soportan la mayor carga de la enfermedad, pero está expandiéndose rápidamente a otros países, tales como India, China o Rusia. La epidemia está creciendo más rápidamente entre las poblaciones minoritarias. En los Estados Unidos ha habido más de 950.000 casos de SIDA notificados desde 1981. El SIDA golpea a la gente durante sus años más productivos. Las mujeres, por razones tanto biológicas como sociales, presentan un riesgo aumentado de VIH/SIDA.

El SIDA está producido por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que destruye y daña las células del sistema inmunitario corporal y destruye progresivamente la capacidad del cuerpo para luchar contra las infecciones y determinados cánceres. El VIH se extiende más comúnmente por practicar sexo sin protección con una pareja infectada. La mejor solución para el problema es prevenir la propagación del virus. Preparar una vacuna contra el VIH segura, eficaz y asequible es una manera de alcanzar este objetivo. En todo el mundo, solo una de cada cinco personas en riesgo elevado de padecer infección por VIH tiene acceso a una protección eficaz.

Se conocen métodos para diagnosticar infecciones por VIH, incluyendo el cultivo del virus, PCR de secuencias de ácido nucleico definitivas de muestras de pacientes, y análisis de anticuerpos para detectar la presencia de anticuerpos anti-VIH en sueros de pacientes (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.979.535, 6.544.728, 6.316.183, 6.261.762 y 4.743.540).

Según algunas otras realizaciones tal como se ha dado a conocer en el presente documento, las composiciones de vacuna y las formulaciones y métodos de uso relacionados pueden incluir un antígeno que se deriva de una célula cancerosa, ya que puede ser útil para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la formulación de adyuvante puede encontrar utilidad con antígenos de rechazo tumoral, tales como los de los cánceres de próstata, de mama, colorrectal, de pulmón, de páncreas, renal o de melanoma. Los ejemplos antígenos derivados de de cánceres o células cancerosas incluyen MAGE 1, 3 y MAGE 4 u otros antígenos MAGE tales como los dados a conocer en el documento WO 99/40188, PRAME, BAGE, Lage (también conocido como NY Eos 1), SAGE y HAGE (documento WO 99/53061) o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, *Current Opinions in Immunology* 8, págs. 628-636; Van den Eynde *et al.*, *International Journal of Clinical & Laboratory Research* (1997 y 1998); Correale *et al.* (1997) *Journal of the National Cancer Institute* 89, pág. 293. Estos ejemplos no limitativos de antígenos de cáncer se expresan en una amplia gama de tipos de tumor, tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.544.518.

Otros antígenos específicos de tumor son adecuados para su uso con GLA según determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, gangliósidos específicos de tumor o asociados a tumor, tales como GM₂ y GM₃ o conjugados de los mismos con proteínas transportadoras; o un antígeno para su uso en una composición de vacuna con GLA para producir o potenciar una respuesta autoinmunitaria contra el cáncer puede ser una hormona autopeptídica, tal como la hormona liberadora de la hormona gonadotropina de longitud completa (GnRH, documento WO 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos de largo, útil en el tratamiento de muchos cánceres. En otra realización, se usan antígenos prostáticos, tales como el antígeno prostático específico (PSA), PAP, PSCA (por ejemplo, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 (4) 1735-1740, 1998); PSMA o, en una realización preferida un antígeno conocido como prostasa (por ejemplo, Nelson *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96, 3114-3119; el documento WO 98/12302; la patente estadounidense n.º 5.955.306; el documento WO 98/20117; patentes estadounidenses n.ºs 5.840.871 y 5.786.148; el documento WO 00/04149. Otros antígenos prostáticos específicos se conocen a partir de los documentos WO 98/137418 y WO/004149. Otro es STEAP (PNAS 96 14523 14528 7-12 1999).

Otros antígenos asociados a tumor útiles en el contexto de la presente invención incluyen: Plu-1 (*J. Biol. Chem.* 274 (22) 15633-15645, 1999), HASH-1, Hash-2, Cripto (Salomon *et al.* *Bioassays* 199, 21: 61-70; patente estadounidense n.º 5.654.140) y Criptin (patente estadounidense n.º 5.981.215). Adicionalmente, antígenos particularmente relevantes para vacunas en la terapia del cáncer también comprenden tirosinasa y survivina.

Las realizaciones dadas a conocer en el presente documento que se refieren a composiciones de vacuna que contienen GLA que comprenden un antígeno de cáncer serán útiles frente a cualquier cáncer caracterizado por la expresión de un antígeno asociado a tumor, tal como la expresión de HER-2/neu o de otros antígenos específicos de cáncer o asociados a cáncer.

El diagnóstico de cáncer en un sujeto que tiene o se sospecha que está en riesgo de tener cáncer puede realizarse mediante cualquiera de una amplia gama de metodologías aceptadas en la técnica, que pueden variar dependiendo de una variedad de factores que incluyen la presentación clínica, el grado de progresión del cáncer, el tipo de cáncer

y otros factores. Los ejemplos de diagnóstico de cáncer incluyen examen histopatológico, histocitoquímico, inmunohistocitoquímico e inmunohistopatológico de muestras de pacientes (por ejemplo, sangre, biopsia de piel, biopsia distinta de la de tejidos, muestras quirúrgicas, etc.), pruebas de PCR para marcadores genéticos definidos (por ejemplo, ácido nucleico), pruebas serológicas de antígenos asociados a cáncer circulantes o células que portan tales antígenos, o de anticuerpos de especificidad definida, u otras metodologías con las que están familiarizados los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.734.172; 6.770.445; 6.893.820; 6.979.730; 7.060.802; 7.030.232; 6.933.123; 6.682.901; 6.587.792; 6.512.102; 7.078.180; 7.070.931; el documento JP5-328975; Waslylyk *et al.*, 1993 Eur. J. Bioch. 211 (7) 18.

Las composiciones de vacuna y los métodos según determinadas realizaciones de la presente divulgación también pueden usarse para la profilaxis o la terapia de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo enfermedades, estados o trastornos en los que el sistema inmunitario del huésped o el sujeto media de forma perjudicial en una respuesta inmunitaria que está dirigida contra los tejidos "propios", células, biomoléculas (por ejemplo, péptidos, polipéptidos, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, proteolípidos, lípidos, glicolípidos, ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, oligosacáridos, polisacáridos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos o similares, y otros componentes moleculares de las células y los tejidos de los sujetos) o epítomos (por ejemplo, estructuras de reconocimiento específicas definidas inmunológicamente, tales como las reconocidas por una región determinante de la complementariedad (CDR) de una región variable del anticuerpo o una CDR de receptor de celular T.

Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por tanto por una respuesta inmunitaria anómala que implica bien células o bien anticuerpos que se dirigen en cualquier caso contra tejidos autólogos normales. Las enfermedades autoinmunitarias en mamíferos pueden clasificarse de forma general en una de dos categorías diferentes: enfermedad mediada por células (es decir, células T) o trastornos mediados por anticuerpos. Los ejemplos no limitativos de enfermedades autoinmunitarias mediadas por células incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoide, tiroiditis de Hashimoto, diabetes mellitus tipo I (diabetes juvenil) y uveorretinitis autoinmunitaria. Los trastornos autoinmunitarios mediados por anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (o LES), enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, asma autoinmunitaria, crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica trombótica, esclerosis biliar primaria y anemia perniciosa. El/los antígeno(s) asociado(s) con: lupus eritematoso sistémico son las proteínas de ácido ribonucleico nuclear pequeño (snRNP); la enfermedad de Grave es el receptor de tirotropina, tiroglobulina y otros componentes de las células epiteliales de la tiroides (Akamizu *et al.*, 1996; Kellerman *et al.*, 1995; Raju *et al.*, 1997 y Texier *et al.*, 1992); el pénfigo son antígenos del pénfigo similares a cadherina, tales como desmogleína 3 y otras moléculas de adhesión (Memar *et al.*, 1996; Stanley, 1995; Plott *et al.* 1994; y Hashimoto, 1993); y la púrpura trombocitopénica trombótica son las plaquetas. (Véase la patente estadounidense 6.929.796; Gorski *et al.* (eds) Autoimmunity, 2001, Kluwer Academic Publisher, Norwell, MA; Radbruch y Lipsky, P. E. (eds) Current Concepts in Autoimmunity and Chronic Inflammation (Curr. Top. Microbiol. and Immunol.) 2001, Springer, NY).

La autoinmunidad desempeña un papel en más de 80 enfermedades diferentes, incluyendo la diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, lupus, artritis reumatoide, esclerodermia y enfermedades de la tiroides. Faltan estimaciones cuantitativas rotundas de la morbilidad para la mayoría de las enfermedades autoinmunitarias. Los estudios más recientes realizados al final de la década de 1990 revelan que las enfermedades autoinmunitarias son la tercera enfermedad más común en los Estados Unidos; y las enfermedades autoinmunitarias más comunes afectan a más de 8,5 millones de estadounidenses. Las estimaciones actuales sobre la prevalencia de la enfermedad oscilan entre el 5 y el 8 por ciento de la población de los Estados Unidos. La mayoría de las enfermedades autoinmunitarias afectan desproporcionadamente a las mujeres. Las mujeres tienen 2,7 veces más probabilidad de adquirir una enfermedad autoinmunitaria. Las mujeres son más susceptibles de padecer enfermedades autoinmunitarias; los hombres tienen mayores niveles de actividad de los linfocitos citolíticos naturales que las mujeres. (Jacobsen *et al.*, Clinical Immunology and Immunopathology, 84: 223-243, 1997).

Las enfermedades autoinmunitarias se producen cuando el sistema inmunitario confunde los tejidos propios como no propios y lanza un ataque inapropiado. El cuerpo puede verse afectado de diferentes maneras por las enfermedades autoinmunitarias, incluyendo, por ejemplo, el intestino (enfermedad de Crohn) y el cerebro (esclerosis múltiple). Se sabe que un autoanticuerpo ataca células propias o tejidos propios para dañar su función y como resultado produce enfermedades autoinmunitarias, y que el autoanticuerpo puede detectarse en el suero de los pacientes antes de la existencia real de la enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, aparición de signos y síntomas clínicos). La detección de un autoanticuerpo permite, por tanto, el descubrimiento o el reconocimiento temprano de la presencia o el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria. Basándose en estos descubrimientos, se han descubierto una variedad de autoanticuerpos contra autoantígenos y los autoanticuerpos contra autoantígenos se han medido en pruebas clínicas (por ejemplo, patentes estadounidenses 6.919.210, 6.596.501, 7.012.134 y 6.919.078), mientras que otros diagnósticos autoinmunitarios pueden implicar la detección de un metabolito relacionado (por ejemplo, la patente estadounidense 4.659.659) o reactividad inmunológica (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.614.722 y 5.147.785, 4.420.558, 5.298.396, 5.162.990, 4.420.461, 4.595.654, 5.846.758 y 6.660.487).

En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención serán particularmente aplicables para su uso en el tratamiento de pacientes ancianos y/o inmunodeprimidos, incluyendo sujetos en diálisis renal, sujetos en quimioterapia y/o radioterapia, receptores de trasplantes y similares. Generalmente tales individuos presentan

respuestas inmunitarias a las vacunas disminuidas y, por tanto, el uso de las composiciones de la invención puede potenciar las respuestas inmunitarias obtenidas en estos sujetos.

En otras realizaciones, el antígeno o antígenos usados en las composiciones de la invención incluyen antígenos asociados con enfermedades respiratorias, tales como las producidas o agravadas por infección bacteriana (por ejemplo, por neumococos), para la profilaxis y la terapia de estados tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La EPOC se define fisiológicamente por la presencia de obstrucción de las vías respiratorias irreversible o parcialmente reversible en pacientes con bronquitis crónica y/o enfisema (Am. J. Respir. Crit. Care Med. Noviembre de 1995; 152 (5 Pt 2): S77-121). El agravamiento de la EPOC está provocado a menudo por infección bacteriana (por ejemplo, por neumococos) (Clin. Microbiol. Rev. Abril de 2001; 14 (2): 236-63. En una realización particular, una composición de la invención comprende un adyuvante GLA, tal como se describe en el presente documento, en combinación con la vacuna neumocócica Plevnar® (Wyeth).

Todavía en otras realizaciones, las composiciones de la invención, que comprenden GLA tal como se describe en el presente documento, son para su uso en el tratamiento de estados alérgicos. Por ejemplo, en una realización particular, las composiciones se usan en la terapia de desensibilización alérgica. Tal terapia implica la estimulación del sistema inmunitario con dosis gradualmente crecientes de las sustancias a la que es alérgica una sustancia, en la que se formulan las sustancias en composiciones que comprenden GLA. En realizaciones específicas, las composiciones se usan en el tratamiento de alergias a productos alimenticios, polen, ácaros, gatos o insectos que pican por ejemplo, abejas, avispones, avispa amarilla, avispa, hormigas de felpa, hormigas de fuego).

TLR

Tal como se describe en el presente documento, determinadas realizaciones de la presente invención contemplan composiciones de vacuna y composiciones de adyuvante inmunológico, incluyendo composiciones farmacéuticas, que incluyen, además del/de los compuesto(s) de GLA de la invención, uno o más agonistas de receptor de tipo *tol* (agonista de TLR). Los receptores de tipo *tol* (TLR) incluyen receptores transmembrana de superficie celular del sistema inmunitario innato que confieren capacidad de reconocimiento en fase temprana a las células huésped para una variedad de estructuras moleculares microbianas conservadas, tales como las que pueden estar presentes en un gran número de agentes patógenos (por ejemplo, Armant *et al.*, 2002, Genome Biol. 3 (8): revisiones 3011.1-3011.6; Fearon *et al.*, 1996 Science 272: 50; Medzhitov *et al.* 1997 Curr. Opin. Immunol. 9: 4; Luster 2002, Curr. Opin. Immunol. 14: 129; Lien *et al.* 2003 Nat. Immunol. 4: 1162; Medzhitov 2001 Nat. Rev. Immunol. 1: 135, Takeda *et al.* 2003 Ann. Rev Immunol. 21: 335; Takeda *et al.* 2005 Int. Immunol. 17: 1; Kaisho *et al.* 2004 Microbe Infect. 6: 1388; Datta *et al.* 2003 J. Immunol. 170: 4102).

La inducción de la transducción de señales mediada por TLR para potenciar la iniciación de respuestas inmunitarias a través del sistema inmunitario innato puede realizarse por agonistas de TLR, que se acoplan a los TLR de superficie celular. Por ejemplo, los lipopolisacáridos (LPS) pueden ser agonistas de TLR a través de TLR2 o TLR4 (Tsan *et al.* 2004 J. Leuk. Biol. 76: 514; Tsan *et al.* 2004 Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286: C739; Lin *et al.* 2005 Shock 24: 206); la poli(inosina-citidina) (poliI:C) puede ser un agonista de TLR a través de TLR3 (Salem *et al.* 2006 Vaccine 24: 5119); las secuencias de CpG (oligodesoxinucleótidos que contienen citosina-guanosina no metilada o motivos de dinucleótido "CpG", por ejemplo, CpG 7909, Cooper *et al.* 2005, AIDS 19: 1473; CpG 10101 Bayes *et al.* Methods Find Exp. Clin. Pharmacol. 27: 193; Vollmer *et al.* Expert Opinion on Biological Therapy 5: 673; Vollmer *et al.* 2004 Antimicrob. Agents Chemother. 48: 2314; Deng *et al.* 2004 J. Immunol. 173: 5148) pueden ser agonistas de TLR a través de TLR9 (Andaloussi *et al.* 2006 Glia 54: 526; Chen *et al.* 2006 J. Immunol., 177: 2373); Los peptidoglicanos pueden ser agonistas de TLR2 y/o de TLR6 (Soboll *et al.*, Biol. Reprod. 75: 131; Nakao *et al.* 2005 J. Immunol. 174: 1566); 3M003 (4-amino-2-(etoximetil)- α,α -dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]-quinolin-1-etanol hidratado, peso molecular de 318 Da, de 3M Pharmaceuticals, St Paul, MN, que también es una fuente de los compuestos relacionados 3M001 y 3M002; Gorden *et al.* 2005 J. Immunol. 174: 1259) puede ser un agonista de TLR7 (Johansen 2005 Clin. Exp. Allerg. 35: 1591) y/o un agonista de TLR8 (Johansen 2005); la flagelina puede ser un agonista de TLR5 (Feuillet *et al.*, 2006 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103: 12487); y los antígenos de la hepatitis C pueden actuar como agonistas a través de TLR7 y/o TLR9 (Lee *et al.* 2006 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 1828; Horsmans *et al.* 2005 Hepatol. 42: 724). Se conocen otros agonistas de TLR (por ejemplo, Schirmbeck *et al.* 2003 J. Immunol. 171: 5198) y pueden usarse según determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento.

Por ejemplo, y como antecedentes (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.544.518) se sabe que los oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen dinucleótidos de CpG no metilados ("CpG") se adyuvantes cuando se administran tanto por vía sistémica como por vía mucosa (documentos WO 96/02555; EP 0 468 520; Davis *et al.* J. Immunol. 1998 160 (2): 870-876; McCluskie y Davis, J. Immunol. 1998 161 (9): 4463-6). CpG es una abreviatura para los motivos de dinucleótido de citosina-guanosina presentes en el ADN. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación lo explicó Krieg, *Nature* 374, pág. 546, 1995. Un análisis detallado ha mostrado que el motivo CG debe estar en cierto contexto de secuencia y que dichas secuencias son comunes en el ADN bacteriano, pero son raras en el ADN de los vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora es a menudo: purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo CG del dinucleótido no está metilado, pero se conocen otras secuencias CpG no metiladas que son inmunoestimuladoras y que pueden usarse en determinadas realizaciones de la presente invención. Cuando el CpG se formula en vacunas, puede administrarse en una disolución libre junto con antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, citado anteriormente) o conjugarse covalentemente con un

antígeno (publicación PCT n.º WO 98/16247) o formularse con un vehículo, tal como hidróxido de aluminio (por ejemplo, Davis *et al.* citado anteriormente, Brazolot-Millan *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95 (26) 15553-8).

Los oligonucleótidos preferidos para su uso en adyuvantes o vacunas de la presente invención contienen preferiblemente dos o más motivos CpG de dinucleótido separados por al menos tres nucleótidos, más preferiblemente al menos seis o más. Los oligonucleótidos de la presente invención son normalmente desoxinucleótidos. En una realización preferida, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforoditioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleotídicos también están dentro del alcance de la invención, incluyendo oligonucleótidos con uniones internucleotídicas mixtas. Los métodos para producir oligonucleótidos con fosforotioato o fosforoditioato se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 5.666.153; 5.278.302 y en el documento WO 95/26204.

Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen secuencias que se dan a conocer en las siguientes publicaciones; para determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento las secuencias contienen preferiblemente uniones internucleotídicas de fosforotioato modificado:

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

CPG 10101: Bayes *et al.* "Gateways to clinical trials". Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 27 de abril de 2005 (3): 193-219.

Vollmer J. "Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9". Expert Opinion on Biological Therapy 5 de mayo de 2005 (5): 673-682.

Oligonucleótidos con CpG alternativos pueden comprender variantes de las secuencias preferidas descritas en las publicaciones citadas anteriormente que difieren en que tienen sustituciones, inserciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de nucleótidos sin consecuencias. Los oligonucleótidos con CpG usados en determinadas realizaciones de la presente invención pueden sintetizarse mediante cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, el documento EP 0 468 520). De forma conveniente, dichos oligonucleótidos pueden sintetizarse usando un sintetizador automático. Los oligonucleótidos son normalmente desoxinucleótidos. En una realización preferida, el enlace internucleotídico en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque los fosfodiésteres también están dentro del alcance de las realizaciones contempladas en el presente documento. También se contemplan oligonucleótidos que comprenden diferentes uniones internucleotídicas, por ejemplo, mezcla de fosforotioato y fosfodiésteres. También pueden usarse otros enlaces internucleotídicos que estabilicen el oligonucleótido.

Coadyuvante

Determinadas realizaciones proporcionadas en el presente documento incluyen composiciones de vacuna y composiciones de adyuvante inmunológico, incluyendo composiciones farmacéuticas, que contienen, además de compuesto(s) de GLA, al menos un coadyuvante, que se refiere a un componente de tales composiciones que tiene actividad como adyuvante pero que no es GLA. Un coadyuvante que tiene tal actividad como adyuvante incluye una composición que, cuando se administra a un sujeto tal como un ser humano (por ejemplo, un paciente humano), un primate no humano, un mamífero u otro organismo eucariota superior que tiene un sistema inmunitario reconocido, puede alterar (es decir, aumentar o disminuir de manera estadísticamente significativa y, en determinadas realizaciones, potenciar o aumentar) la potencia y/o la duración de una respuesta inmunitaria. (Véase, por ejemplo, Powell y Newman, "Vaccine design – The Subunit and Adjuvant Approach", 1995, Plenum Press, Nueva York). En determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento, GLA y un antígeno adecuado, y opcionalmente uno o más coadyuvantes, pueden alterar de esta manera, por ejemplo, producir o potenciar, una respuesta inmunitaria que se dirige contra el antígeno deseado que puede administrarse al mismo tiempo que GLA o puede administrarse por separada en el tiempo y/o el espacio (por ejemplo, en un lugar anatómico diferente), pero determinadas realizaciones de la invención no pretenden ser tan limitadas y por tanto también contemplan la administración de GLA en una composición que no incluye un antígeno especificado sino que pueden incluir también uno o más agonistas de TLR, un coadyuvante, un modificador de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina y un modificador inmunitario de doble tallo-bucle (dSLIM).

Por consiguiente, y tal como se ha indicado anteriormente, los coadyuvantes incluyen composiciones distintas a GLA que tienen efectos como adyuvante, tales como las saponinas y los miméticos de saponina, incluyendo I QS21 y miméticos de QS21 (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.057.540; documentos EP 0 362 279 B1; WO 95/17210), alumbre, alcaloides de plantas, tales como tomatina, detergentes tales como (pero sin limitarse a) saponina, polisorbato 80, Span 85 y estearil-tirosina, una o más citocinas (por ejemplo GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-alfa, IFN-gamma), un modificador de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina, y un modificador inmunitario de doble tallo-bucle (dSLIM, por ejemplo Weeratna *et al.* 2005, Vaccine 23: 5263).

Se enseñan detergentes incluyendo saponina, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.544.518; Lacaille-Dubois, M. y Wagner H. (1996, Phytomedicine 2: 363-386), la patente estadounidense n.º 5.057.540; Kensil, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; y en el documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras en

partículas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A (saponina) son hemolíticas y se han usado en la fabricación de vacunas (Morein, B. EP 0 109 942 B1). Se ha publicado que estas estructuras tienen actividad como adyuvantes (documentos EP 0 109 942 B1; WO 96/11711). Se ha descrito que las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) son adyuvantes sistémicos potentes y el método para producirlos se da a conocer en la patente estadounidense n.º 5.057.540 y en el documento EP 0 362 279 B1. En estas referencias también se describe el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como un potente adyuvante para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe además en Kensil *et al.* (1991, J. Immunology 146: 431-437). También se conocen combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Los sistemas adyuvantes en partículas que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS27, se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711. Otras saponinas que se han usado en estudios de vacunación sistémica incluyen las derivadas de otras especies de plantas como *Gypsophila* y *Saponaria* (Bomford *et al.*, Vaccine, 10 (9): 572-577, 1992).

La escina es otro detergente relacionado con las saponinas para su uso en las composiciones de adyuvante de las realizaciones dadas a conocer en el presente documento. La escina se describe en el índice Merck (12ª ed.: entrada 3737) como una mezcla de saponina que se encuentra en las semillas del árbol castaño de indias, *Aesculus hippocastanum*. Se ha descrito su aislamiento y purificación por cromatografía (Fiedler, Arzneimittel-Forsch 4, 213 (1953)) y mediante resinas de intercambio iónico (Erbring *et al.*, patente estadounidense n.º 3.238.190). Se han purificado fracciones de escina y se ha demostrado que son biológicamente activas (Yoshikawa M. *et al.* (Chem. Pharm. Bull. (Tokio) agosto de 1996; 44 (8) 1454-1464)). La digitonina es otro detergente que también se describe en el índice Merck (12ª ed.: entrada 3204) como una saponina que se deriva de las semillas de *Digitalis purpurea* y se purifica según el procedimiento descrito por Gisvold *et al.*, J. Am. Pharm. Assoc. 1934, 23, 664; y Rubenstroth-Bauer, Physiol. Chem. 1955, 301, 621.

Otros coadyuvantes para su uso según determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento incluyen un copolímero de bloques o un polímero biodegradable, que se refiere a un tipo de compuestos poliméricos con los que están familiarizados los expertos en la técnica relevante. Los ejemplos de copolímero de bloques o de polímero biodegradable que pueden incluirse en una composición de vacuna con GLA o un adyuvante inmunológico de GLA incluyen Pluronic® L121 (BASF Corp., Mount Olive, N. J.; véase, por ejemplo, Yeh *et al.*, 1996, Pharm. Res. 13: 1693; y la patente estadounidense n.º 5.565.209); CRL 1005 (por ejemplo, Triozzi *et al.*, 1997, Clin. Canc. Res. 3: 2355); poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLG) y poliI:C. (Véase, por ejemplo, Powell y Newman, "Vaccine design – The Subunit and Adjuvant Approach", 1995, Plenum Press, Nueva York).

Determinadas realizaciones se refieren a vacunas con GLA y adyuvantes inmunológicos con GLA que incluyen un aceite, que en algunas de tales realizaciones pueden contribuir a la actividad coadyuvante y en otras de tales realizaciones pueden proporcionar adicional o alternativamente un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se conocen muchos aceites adecuados y pueden seleccionarse para incluirlos en la composición de vacuna y en composiciones de adyuvante inmunológico basadas en la presente divulgación. Los ejemplos de tales aceites incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, escualeno, escualano, aceite mineral, aceite de oliva, colesterol y un monooleato de manida.

También se conocen en la técnica modificadores de la respuesta inmunitaria, tales como modificadores de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina y también pueden incluirse como coadyuvantes en determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento. Algunos de los modificadores de respuesta inmunitaria de imidazoquinolina preferidos incluyen, a modo de ejemplos no limitativo, resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod (Hemmi *et al.*, 2002 Nat. Immunol. 3: 196; Gibson *et al.* 2002 Cell. Immunol. 218: 74; Gorden *et al.* 2005 J. Immunol. 174: 1259); estos y otros modificadores de respuesta inmunitaria de imidazoquinolina también pueden tener, en condiciones adecuadas, actividad agonista de TLR tal como se describe en el presente documento. Otros modificadores de la respuesta inmunitaria son los modificadores inmunitarios de doble tallo-bucle (dSLIM) basados en ácidos nucleicos. Ejemplos específicos de dSLIM que se contemplan para su uso en determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento pueden encontrarse en Schmidt *et al.* 2006, Allergy 61: 56; Weihrauch *et al.* 2005 Clin. Cancer Res. 11 (16): 5993-6001; Modern Biopharmaceuticals, J. Knäblein (editor). John Wiley & Sons, 6 de diciembre de 2005 (los dSLIM se presentan en las páginas 183 a ~200) y de Mologen AG (Berlín, FRG: [obtenido en línea el 18/08/06 en <http://www.mologen.com/English/04.20-dSLIM.shtm>].

Tal como se indicó también anteriormente, un tipo de coadyuvante para su uso con GLA tal como se ha descrito en el presente documento pueden ser los coadyuvantes de aluminio que se denominan generalmente "alumbre". Los coadyuvantes de alumbre se basan en: oxi-hidróxido de aluminio; hidroxifosfato de aluminio; o varias sales registradas. Las vacunas que usan coadyuvantes de alumbre pueden incluir vacunas para cepas del tétanos, VPH, hepatitis A, virus de la polio inactivado, y otros antígenos tal como se ha descrito en el presente documento. Los coadyuvantes de alumbre son ventajosos porque tienen un buen registro de seguridad, aumentan las respuestas de anticuerpos, estabilizan los antígenos, y su producción a gran escala es relativamente sencilla. (Edelman 2002 Mol. Biotechnol. 21: 129-148; Edelman, R. 1980 Rev. Infect. Dis. 2: 370-383).

Otros coadyuvantes que pueden combinarse con GLA para una estimulación inmunitaria eficaz incluyen las saponinas y los miméticos de saponina, incluyendo QS21 y compuestos estructuralmente relacionados que

confieren efectos similares y se denominan en el presente documento miméticos de QS21. Se ha reconocido QS21 como un coadyuvante preferido. QS21 puede comprender una fracción no tóxica purificada por HPLC derivada de corteza de *Quillaja Saponaria Molina*. La producción de QS21 se describe en la patente estadounidense n.º 5.057.540. (Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 6.936.255, 7.029.678 y 6.932.972).

- 5 GLA también puede combinarse en determinadas realizaciones con “complejos inmunoestimuladores” conocidos como ISCOMS (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.869.607, 6.846.489, 6.027.732, 4.981.684), incluyendo el ISCOMATRIX® derivado de saponina, que está disponible comercialmente, por ejemplo, de Iscotec (Estocolmo, Suecia) y CSL Ltd. (Parkville, Victoria, Australia).

Constructo de expresión recombinante

- 10 Según determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento, la composición de vacuna con GLA puede contener al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico que codifica para un antígeno. En determinadas realizaciones adicionales, el constructo de expresión recombinante está presente en un vector viral, tal como un adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus, lentivirus, poxvirus o retrovirus. Las composiciones y los métodos para producir y usar
 15 tales constructos de expresión y vectores se conocen en la técnica, para la expresión de antígenos polipeptídicos tal como se proporcionan en el presente documento, por ejemplo, según Ausubel *et al.* (eds.) Current Protocols in Molecular Biology 2006 John Wiley & Sons, NY. Ejemplos no limitativos de constructos de expresión recombinante pueden encontrarse generalmente en las patentes estadounidenses n.ºs 6.844.192; 7.037.712; 7.052.904; 7.001.770; 6.106.824; 5.693.531; 6.613.892; 6.875.610; 7.067.310; 6.218.186; 6.783.981; 7.052.904; 6.783.981;
 20 6.734.172; 6.713.068; 5.795.577 y 6.770.445 y en otras, con enseñanzas que pueden adaptarse a la expresión de antígenos polipeptídicos tal como se proporcionan en el presente documento, para su uso en determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento.

Respuesta inmunitaria

- 25 La invención proporciona por tanto composiciones para su uso para alterar (es decir, aumentar o disminuir de manera estadísticamente significativa, por ejemplo, respecto a un control apropiado tal como resultará evidente para los expertos en la técnica) respuestas inmunitarias en un huésped que puede producir una respuesta inmunitaria. Como sabrán los expertos en la técnica, una respuesta inmunitaria puede ser cualquier alteración activa del estatus inmunitario de un huésped, lo que puede incluir cualquier alteración en la estructura o función de uno o más tejidos, órganos, células o moléculas que participan en el mantenimiento y/o la regulación del estatus inmunitario del
 30 huésped. Normalmente, pueden detectarse respuestas inmunitaria mediante cualquiera de una variedad de parámetros bien conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, la determinación *in vivo* o *in vitro* de: inmunoglobulinas o anticuerpos solubles; mediadores solubles, tales como citocinas, linfocinas, quimiocinas, hormonas, factores de crecimiento y similares, así como otros péptidos pequeños, hidratos de carbono, nucleótidos y/o mediadores lipídicos solubles; cambios de estado de activación celular tal como se determina por propiedades funcionales o
 35 estructurales alteradas de las células del sistema inmunitario, por ejemplo, proliferación celular, motilidad alterada, inducción de actividades especializadas, tales como expresión génica específica o comportamiento citolítico; diferenciación celular por células del sistema inmunitario, incluyendo perfiles de expresión de antígeno de superficie alterados o el inicio de apoptosis (muerte celular programada); o cualquier otro criterio mediante el que puede detectarse la presencia de una respuesta inmunitaria.

- 40 Las respuestas inmunitarias pueden considerarse a menudo, por ejemplo, como la discriminación entre las estructuras propias y las que no son propias por las células y los tejidos del sistema inmunitario de un huésped a nivel molecular y celular, pero la invención no debe limitarse por esto. Por ejemplo, las respuestas inmunitarias también pueden incluir cambios en el estado del sistema inmunitario que se producen por reconocimiento inmunitario de moléculas, células o tejidos propios, tal como puede acompañar a múltiples estados normales, tales
 45 como la regulación típica de componentes del sistema inmunitario, o que pueden estar presentes en estados patológicos, tales como las respuestas autoinmunitarias inapropiadas observadas en enfermedades autoinmunitarias y degenerativas. Como otro ejemplo, además de la inducción mediante regulación por incremento de actividades del sistema inmunitario particulares (tales como producción de anticuerpos y/o citocinas, o activación de la inmunidad mediada por células), las respuestas inmunitarias también pueden incluir supresión, atenuación o cualquier otra
 50 regulación por disminución de la inmunidad detectable, que puede ser la consecuencia del antígeno seleccionado, la vía de administración del antígeno, la inducción de tolerancia específica u otros factores.

- La determinación de la inducción de una respuesta inmunitaria por las vacunas de la presente invención puede establecerse mediante múltiples análisis inmunológicos bien conocidos con los que están familiarizados los expertos
 55 en la técnica. Tales análisis incluyen, pero sin que sea necesario limitarse a ellos, la determinación *in vivo* o *in vitro* de: mediadores solubles, tales como citocinas, linfocinas, quimiocinas, hormonas, factores de crecimiento y similares, así como otros péptidos pequeños, hidratos de carbono, nucleótidos y/o mediadores lipídicos solubles; cambios de estado de activación celular determinados por propiedades funcionales o estructurales alteradas de las células del sistema inmunitario, por ejemplo, proliferación celular, motilidad alterada, inducción de actividades
 60 especializadas, tales como expresión génica específica o comportamiento citolítico; diferenciación celular por células del sistema inmunitario, incluyendo perfiles alterados de la expresión de antígeno de superficie o inicio de apoptosis

(muerte celular programada). Los procedimientos para realizar estos análisis y otros similares se conocen ampliamente y pueden encontrarse por ejemplo en Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998; véase también Current Protocols in Immunology; véase también, por ejemplo, Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986 Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell y Shigii (eds) Selected Methods in Cellular Immunology; 1979 Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green y Reed, 1998 Science 281: 1309 y las referencias citadas en esos documentos).

La detección de la proliferación de células T reactivas con antígeno puede realizarse mediante una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de células T puede detectarse midiendo la tasa de síntesis de ADN y la especificidad de antígeno puede determinarse controlando los estímulos (tales como, por ejemplo, células presentadoras de antígeno de forma pulsada por un antígeno específico deseado o por un antígeno de control) a los que se exponen las células T reactivas con el antígeno candidato. Las células T que se han estimulado para proliferar presentan una tasa aumentada de síntesis de ADN. Un forma típica de medir la tasa de síntesis de ADN es, por ejemplo, mediante cultivos de células T marcadas con pulsos de timidina tritiada, un precursor nucleosídico que se incorpora en el ADN recién sintetizado. La cantidad de timidina tritiada incorporada puede determinarse usando un espectrofotómetro de centelleo líquido. Otras formas de detectar la proliferación de células T incluyen medir el aumento de la producción de interleucina 2 (IL-2), el flujo de Ca^{2+} o la captación de colorante, tal como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Alternativamente, puede medirse la síntesis de linfocinas (tales como interferón gamma) o puede determinarse la cantidad relativa de células T que pueden responder a un antígeno particular.

La detección de la producción de anticuerpos específicos de antígeno puede obtenerse, por ejemplo, sometiendo a ensayo una muestra (por ejemplo, una muestra que contiene inmunoglobulina, tal como una muestra de suero, plasma o sangre) de un huésped tratado con una vacuna según la presente invención usando metodologías *in vitro*, tales como radioinmunoanálisis (RIA), ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), diálisis de equilibrio o inmunotransferencia en fase sólida, incluyendo inmunotransferencia de tipo Western. En realizaciones preferidas, los ensayos ELISA pueden incluir además la inmovilización por captura de antígeno diana con un anticuerpo monoclonal en fase sólida específico para el antígeno, por ejemplo, para aumentar la sensibilidad del ensayo. La elaboración de mediadores solubles (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, linfocinas, prostaglandinas, etc.) también puede determinarse fácilmente mediante el ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), por ejemplo usando los métodos, aparatos y reactivos que están disponibles fácilmente a partir de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma, St. Louis, MO; véase también el catálogo 2006 de R & D Systems, Minneapolis, MN).

Otros múltiples parámetros inmunológicos pueden controlarse usando ensayos rutinarios que se conocen bien en la técnica. Estos pueden incluir, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), respuestas de anticuerpos *in vitro* secundarias, análisis de inmunocitofluorimetría de flujo de diversas subpoblaciones de células mononucleares linfoides o de sangre periférica usando sistemas de antígenos marcadores bien establecidos, inmunohistoquímica u otros ensayos relevantes. Estos y otros ensayos pueden encontrarse, por ejemplo, en Rose *et al.* (eds) Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5ª ed. 1997, American Society of Microbiology, Washington DC.

Por consiguiente, se contempla que las composiciones de vacuna y de adyuvante proporcionadas en el presente documento podrán producir o potenciar en un huésped al menos una respuesta inmunitaria que se selecciona de una respuesta de linfocitos T de tipo T_H1 , una respuesta de linfocitos T de tipo T_H2 , una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL), una respuesta de anticuerpos, una respuesta de citocina, una respuesta de linfocina, una respuesta de quimiocina, una respuesta inflamatoria. En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria puede comprender al menos uno de la producción de una o varias citocinas en las que la citocina se selecciona de interferón gamma ($IFN-\gamma$), factor de necrosis tumoral-alfa ($TNF-\alpha$); la producción de una o varias interleucinas en las que la interleucina se selecciona de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e IL-23; la producción de una o varias quimiocinas, en las que la quimiocina se selecciona de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CCL4 y CCL5; y una respuesta de linfocitos que se selecciona de una respuesta de células T de memoria, una respuesta de células B de memoria, una respuesta de células T efectoras, una respuesta de células T citotóxicas y una respuesta de células B efectoras. Véanse, por ejemplo, los documentos WO94/00153, WO 95/17209, WO 96/02555, U.S. 6.692.752, U.S. 7.084.256, U.S. 6.977.073, U.S. 6.749.856, U.S. 6.733.763, U.S. 6.797.276, U.S. 6.752.995, U.S. 6.057.427, U.S. 6.472.515, U.S. 6.309.847, U.S. 6.969.704, U.S. 6.120.769, U.S. 5.993.800, U.S. 5.585.888; Smith *et al.* 1987 J. Biol. Chem. 262: 6951; Kriegler *et al.* 1988 *Cell* 53: 45-53; Beutler *et al.*, 1986 Nature 320: 584; y los documentos U.S. 6.991.791, U.S. 6.654.462 y U.S. 6.375.944.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas comprenden generalmente al menos un compuesto de GLA y pueden comprender además uno o más componentes tal como se proporcionan en el presente documento que se seleccionan de antígeno, agonista de TLR, coadyuvante (incluyendo opcionalmente una citocina, un modificador de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina y/o un dSLIM) y/o un constructo de expresión recombinante, en combinación con un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables.

Por tanto, en algunos aspectos, la presente invención se refiere a "monoterapia" con GLA, en la que GLA, tal como

- se describe en el presente documento, se formula en una composición que carece esencialmente de otros antígenos y que se administra a un sujeto con el fin de estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo una respuesta inmunitaria inespecífica, con el propósito de tratar o prevenir una enfermedad u otro estado, tal como tratar una infección por un organismo, tratar rinitis estacional o similar. En una realización, por ejemplo, las composiciones y los métodos de la invención emplean un compuesto de GLA para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto. En otra realización, la GLA está en forma de una pulverización, opcionalmente proporcionada en un kit.
- 5 GLA puede formularse preferiblemente en una emulsión estable. En una realización particular, por ejemplo, se proporciona una composición que comprende un compuesto de GLA de la invención en una emulsión estable que carece esencialmente de otros antígenos.
- 10 En algunas otras realizaciones, la composición farmacéutica es una composición de vacuna que comprende tanto GLA como un antígeno y que puede comprender además uno o más componentes, tal como se proporcionan en el presente documento, que se seleccionan de un agonista de TLR, un coadyuvante (incluyendo por ejemplo una citocina, un modificador de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina y/o un dSLIM) y similares y/o un constructo de expresión recombinante, en combinación con un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 15 Los ejemplos ilustrativos de vehículos serán no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Para vacunas basadas en GLA más ácido nucleico, o para vacunas que comprenden GLA más un antígeno, se administrará aproximadamente de 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, normalmente por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, o por otras vías.
- 20 En una realización más específica, la dosificación es de aproximadamente 0,001 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 1 mg/kg . En otra realización específica, la dosificación es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En otra realización específica, la dosificación es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- 25 En otra realización específica, la cantidad de GLA administrada es de aproximadamente 0,01 $\mu\text{g}/\text{dosis}$ a aproximadamente 5 mg/dosis . En otra realización específica, la cantidad de GLA administrada es de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{dosis}$ a aproximadamente 1 mg/dosis . En otra realización específica, la cantidad de GLA administrada es de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{dosis}$ a aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{dosis}$. En otra realización específica, la cantidad de GLA administrada es de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{dosis}$ a aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{dosis}$.
- 30 Resultará evidente para los expertos en la técnica que el número y la frecuencia de administración dependerán de la respuesta del huésped. Los "portadores farmacéuticamente aceptables" para uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (Ed. A. R. Gennaro, 1985). Por ejemplo, pueden usarse solución salina estéril y solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico. En la composición farmacéutica pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes saborizantes. Por ejemplo, pueden añadirse como conservantes benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, ibíd. en 1449. Además, pueden usarse antioxidantes o agentes de suspensión, íd.
- 35 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de los compuestos de la presente invención derivados de la combinación de tales compuestos con un ácido orgánico o inorgánico (sales de adición de ácido) o con una base orgánica o inorgánica (sales de adición de base). Las composiciones de la presente invención pueden usarse o bien en forma de base libre o bien en forma de sal, y se considera que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención.
- 40 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre al paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las vías de administración típicas incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral (por ejemplo, por vía sublingual o por vía bucal), sublingual, rectal, vaginal e intranasal (por ejemplo, como pulverización). El término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye la administración iontoforética (por ejemplo, los documentos U.S. 7.033.598, 45 7.018.345, 6.970.739), sonoforética (por ejemplo, los documentos U.S. 4.780.212, 4.767.402, 4.948.587, 5.618.275, 5.656.016, 5.722.397, 6.322.532, 6.018.678), térmica (por ejemplo, los documentos U.S. 5.885.211 y 6.685.699), transdérmica pasiva (por ejemplo, los documentos U.S. 3.598.122, 3.598.123, 4.286.592, 4.314.557, 4.379.454, 4.568.343, 5.464.387, la memoria descriptiva de patente británica n.º 2232802, y los documentos U.S. 6.871.477, 6.974.588 y 6.676.961), microaguja (por ejemplo, los documentos U.S. 6.908.453, 5.457.041, 5.591.139 y 6.033.928) 50 y también las inyecciones subcutáneas, la inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, intrameatal, intrauretral o técnicas de infusión. En una realización particular, una composición tal como se describe en el presente documento (incluyendo las composiciones de vacuna y composiciones farmacéuticas) se administra por vía intradérmica mediante una técnica seleccionada de iontoforesis, microcavitación, sonoforesis o microagujas.
- 55 La composición farmacéutica se formula de forma que permita que los principios activos contenidos en la misma estén biodisponibles tras la administración de la composición al paciente. Las composiciones que se administrarán a un paciente tendrán la forma de una o más unidades de dosificación, en las por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación individual, y un recipiente con uno o más compuestos según la invención en forma de

aerosol puede contener múltiples unidades de dosificación.

Para la administración oral, puede haber presente un excipiente y/o un aglutinante. Ejemplos son sacarosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato de sodio, carboximetilcelulosa y etilcelulosa. También pueden estar presentes agentes colorantes y/o saborizantes. También puede emplearse una cubierta de recubrimiento.

- 5 La composición puede estar en forma de un líquido, por ejemplo un elixir, jarabe, disolución, emulsión o suspensión. Como dos ejemplos, el líquido puede ser para la administración oral o para administrarse como inyección. Cuando se prevé la administración oral, las composiciones preferidas contienen uno o más de un agente edulcorante, conservantes, colorante/tinte y potenciador del sabor. En una composición prevista para administrarse mediante inyección, pueden incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante o agente isotónico.

10 Una composición farmacéutica líquida tal como se usa en el presente documento, ya sea en forma de disolución, suspensión o similar, puede incluir uno o más de los siguientes portadores o excipientes: diluyentes estériles, tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como escualeno, escualano, aceite mineral, un monooleato de manida, colesterol y/o mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tal como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechables o frascos para varias dosis compuestos por cristal o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

20 En una realización particular, una composición farmacéutica o de vacuna según la invención comprende una suspensión acuosa estable de menos de 0,2 μm y comprende además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, tensioactivos, detergentes, saponinas, lípidos fluorados y similares.

25 En otra realización, una composición de la invención se formula de manera que pueda prepararse en forma de aerosol.

También puede ser deseable incluir otros componentes en la composición farmacéutica o para vacunas, tal como vehículos de administración incluyendo, pero sin limitarse a, sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, vehículos oleosos biodegradables, emulsiones de aceite en agua, microcápsulas biodegradables y liposomas. Los ejemplos de sustancias inmunoestimuladoras (coadyuvantes) adicionales para su uso en tales vehículos también se han descrito anteriormente y pueden incluir N-acetilmuramil-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), glucano, IL-12, GM-CSF, interferón gamma e IL-12.

35 Aunque en las composiciones farmacéuticas según la invención puede emplearse cualquier portador adecuado conocido por los expertos en la técnica, el tipo de portador variará dependiendo del modo de administración o de si se desea una liberación prolongada. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el portador puede comprender preferiblemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, pueden emplearse cualquiera de los portadores anteriores o un portador sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. También pueden emplearse microesferas biodegradables (por ejemplo, poli(lactida-galactida)) como portadores para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Se dan a conocer microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.897.268 y 5.075.109. A este respecto, es preferible que la microesfera sea mayor de aproximadamente 25 micrómetros.

45 Las composiciones farmacéuticas (incluyendo vacunas con GLA y adyuvantes inmunológicos de GLA) también pueden contener diluyentes como tampones, antioxidantes, tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. Ejemplos de diluyentes apropiados son la solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica inespecífica. Preferiblemente, el producto puede formularse como un liofilizado usando disoluciones de excipientes apropiados (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes.

50 Tal como se describió anteriormente, en determinadas realizaciones, la invención objeto incluye composiciones que pueden suministrar moléculas del ácido nucleico que codifican para los antígenos deseados. Tales composiciones incluyen vectores virales recombinantes (por ejemplo, retrovirus (véanse los documentos WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 y WO 94/03622), adenovirus (véase Berkner, *Biotechniques* 6: 616-627, 1988; Li *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 4: 403-409, 1993; Vincent *et al.*, *Nat. Genet.* 5: 130-134, 1993; y Kolls *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 215-219, 1993), poxvirus (véanse las patentes estadounidenses n.^{os} 4.769.330, 5.017.487 y el documento WO 89/1973)); moléculas de ácido nucleico constructo de expresión recombinante complejadas con una molécula policatiónica (véase el documento WO 93/03709) y ácidos nucleicos asociados con liposomas (véase

Wang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7851, 1987). En determinadas realizaciones, el ADN puede estar unido a adenovirus muertos o inactivados (véase Curiel *et al.*, Hum. Gene Ther. 3: 147-154, 1992; Cotton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6094, 1992). Otras composiciones adecuadas incluyen combinaciones de ADN-ligando (véase Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 264: 16985-16987, 1989) y de ADN-lípido (véase Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-1417, 1989).

Además de los procedimientos *in vivo* directos, pueden usarse procedimientos *ex vivo* en los que las células se retiran del huésped, se modifican y se colocan en el mismo animal huésped o en otro. Resultará evidente que pueden utilizarse cualquiera de las composiciones indicadas anteriormente para la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican para antígeno en células de tejido en un contexto *ex vivo*. Los protocolos para los métodos de captación viral, física y química se conocen bien en la técnica.

Por consiguiente, la presente invención es útil para potenciar o producir una respuesta inmunitaria en un huésped, un paciente o en cultivo celular. Tal como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a cualquier animal de sangre caliente, preferiblemente un ser humano. Un paciente puede estar afectado con una enfermedad infecciosa, cáncer, tal como cáncer de mama, o una enfermedad autoinmunitaria, o puede ser normal (es decir, estar libre de cualquier enfermedad y/o infección detectable). Un "cultivo celular" es cualquier preparación que contiene células inmunocompetentes o células aisladas del sistema inmunitario (incluyendo, pero sin limitarse a, células T, macrófagos, monocitos, células B y células dendríticas). Tales células pueden aislarse mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque). Las células pueden (pero no necesariamente) haberse aislado de un paciente afectado con cáncer y pueden ser volver a introducirse en el paciente después del tratamiento.

En determinadas realizaciones, una composición líquida para la administración o bien parenteral o bien oral debe contener una cantidad de composición de vacuna con GLA de manera que se obtenga una dosis adecuada. Normalmente, esta cantidad es de al menos el 0,01% en peso de un antígeno en la composición. Cuando se pretende que sea para la administración oral, esta cantidad puede variar entre el 0,1 y aproximadamente el 70% del peso de la composición. Las composiciones orales preferidas contienen entre aproximadamente el 4% y aproximadamente el 50% del antígeno. Las composiciones y preparaciones preferidas se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contiene entre el 0,01 y el 1% en peso de la composición de agente activo.

La composición farmacéutica puede estar prevista para la administración tópica en cuyo caso el vehículo puede comprender adecuadamente una disolución, emulsión, base de gel o pomada. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abejas, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizadores. En una composición farmacéutica para la administración tópica puede haber presentes agentes espesantes. Si está prevista para la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo para iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración del antígeno (por ejemplo, una composición de vacuna con GLA-antígeno) o GLA (por ejemplo, una composición de adyuvante inmunológico; GLA está disponible en Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; por ejemplo el número de producto 699800) o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10% p/v (peso por volumen unitario).

La composición puede estar prevista para la administración rectal en forma, por ejemplo, de un supositorio que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para la administración rectal puede contener una base oleaginosa, tal como un excipiente no irritante adecuado. Tales bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol. En los métodos de la invención, las composiciones de vacuna/adyuvantes pueden administrarse mediante el uso de inserto(s), perla(s), formulación/formulaciones de liberación retardada, parche(s) o formulación/formulaciones de liberación rápida.

En determinadas realizaciones también se contemplan kits que comprenden las composiciones de vacuna con GLA y/o las composiciones de adyuvante inmunológico de GLA descritas en el presente documento, que pueden proporcionarse en uno o más recipientes. En una realización todos los componentes de las composiciones de vacuna con GLA y/o las composiciones de adyuvante inmunológico están presentes juntos en un único recipiente, pero se pretende que se limiten las realizaciones de la invención y también se contemplan dos o más recipientes en los que, por ejemplo, una composición de adyuvante inmunológico de GLA está separada de, y no está en contacto con, el componente antigénico. Como teoría no limitante, se cree que en algunos casos puede realizarse de forma beneficiosa la administración solo de la composición de adyuvante inmunológico de GLA, mientras que en otros casos tal administración puede ser beneficiosa si está separada temporal y/o espacialmente (por ejemplo, en lugares anatómicos diferentes) de la administración del antígeno, mientras que todavía en otros casos, la administración al sujeto se realiza de forma beneficiosa mediante la composición de vacuna con GLA tal como se ha descrito en el presente documento y que contiene tanto el antígeno como GLA y opcionalmente otros de los componentes descritos en el presente documento igualmente.

Un recipiente según tales realizaciones para un kit puede ser cualquier recipiente, vasija, vial, ampolla, tubo, copa, caja, botella, frasco, jarra, plato, pocillo de un aparato con un solo pocillo o con varios pocillos, depósito, tanque o similar, o cualquier otro dispositivo en el que las composiciones descritas en el presente documento se puedan colocar, almacenar y/o transportar y al que pueda accederse para retirar el contenido. Normalmente un recipiente de

este tipo puede estar compuesto por un material que es compatible con el uso previsto y del que la recuperación del contenido del recipiente puede obtenerse fácilmente. Los ejemplos preferidos de tales contenedores incluyen tubos y ampollas de vidrio y/o plástico sellados o resellables, incluyendo los que tienen un septo de goma u otro medio de sellado que sea compatible con la retirada del contenido usando una aguja y una jeringa. Tales recipientes pueden, por ejemplo, estar compuestos por vidrio o un plástico o una resina químicamente compatibles, que puede estar compuesto por, o puede recubrirse con, un material que permita la recuperación eficaz del material del recipiente y/o proteger el material frente a, por ejemplo, condiciones degradantes tales como la luz ultravioleta o temperaturas extremas, o frente a la introducción de contaminantes no deseados, incluyendo contaminantes microbianos. Los recipientes son preferiblemente estériles o esterilizables, y están compuestos por materiales que sean compatibles con cualquier portador, excipiente, disolvente, vehículo o similar, de manera que puedan usarse para suspender o disolver las composiciones de vacuna y/o composiciones de adyuvante inmunológico y/o antígenos y/o constructos de expresión recombinante, etc. descritos en el presente documento.

Los sistemas de emulsión también pueden usarse en la formulación de las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se han descrito muchos sistemas de emulsión monofásicos o multifásicos. Se han sugerido adyuvantes de emulsión de aceite en agua que son útiles por sí mismos como composición de adyuvante (documento EP 0 399 843 B), también se han descrito combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos como adyuvantes para vacunas (documentos WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). También se han descritos otros adyuvantes de emulsión de aceite, tales como emulsiones de agua en aceite (véanse la patente estadounidense n.º 5.422.109; el documento EP 0 480 982 B2) y emulsiones de aceite en agua (véanse la patente estadounidense n.º 5.424.067 y el documento EP 0 480 981 B). Los adyuvantes de emulsión de aceite para su uso en la presente invención pueden ser naturales o sintéticos y pueden ser minerales u orgánicos. Los ejemplos de aceites minerales y orgánicos resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

En una realización particular, una composición de la invención comprende una emulsión de aceite en agua en la que se incorpora GLA en la fase de aceite. En otra realización, una composición de la invención comprende una emulsión de aceite en agua en la que se incorpora GLA en la fase de aceite y en la que hay un componente adicional presente, tal como un coadyuvante, un agonista de TLR o similar, tal como se describe en el presente documento.

Con el fin de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para la administración a seres humanos, la fase de aceite del sistema de emulsión comprende preferiblemente un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable se conoce bien en la técnica. Metabolizable puede definirse como "que puede transformarse por el metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W. B. Saunders Company, 25ª ed. (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que sea no tóxico para el receptor y que pueda transformarse por el metabolismo. Los frutos secos (tales como el aceite de cacahuete), semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también forman parte de esta invención y pueden incluir aceites disponibles comercialmente, tales como NEOBEE® y otros.

El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno), por ejemplo, es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón y, en menores cantidades en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y en levaduras, y es un aceite particularmente preferido para su uso en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable debido al hecho de que es un producto intermedio en la biosíntesis del colesterol (índice Merck, 10ª edición, entrada n.º 8619). Emulsiones de aceite particularmente preferidas son las emulsiones de aceite en agua y, en particular, las emulsiones de escualeno en agua. Además, los adyuvantes de emulsión de aceite de la presente invención más preferidos comprenden un antioxidante, que es preferiblemente el aceite alfa-tocoferol (vitamina E, documento EP 0 382 271 B1). Los documentos WO 95/17210 y WO 99/11241 dan a conocer adyuvantes de emulsión basados en escualeno, alfa-tocoferol y TWEEN® 80, formulados opcionalmente con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL (que se han descrito anteriormente). El documento WO 99/12565 da a conocer una mejora en estas emulsiones de escualeno con la adición de un esteroide en la fase de aceite. Adicionalmente, puede añadirse un triglicérido, tal como la tricapriliina (C₂₇H₅₀O₆), a la fase de aceite con el fin de estabilizar la emulsión (documento WO 98/56414).

El tamaño de las gotas de aceite que se encuentran en la emulsión de aceite en agua estable es preferiblemente menor de 1 micrómetro, sustancialmente puede estar en el intervalo de 30-600 nm, de manera sustancialmente preferible de aproximadamente 30-500 nm de diámetro, y los más preferible de sustancialmente 150-500 nm de diámetro, y particularmente de aproximadamente 150 nm de diámetro, medido mediante espectroscopía de correlación fotónica. En este sentido, el 80% de las gotas de aceite en número debe estar dentro de los intervalos preferidos, más preferiblemente más del 90% y lo más preferible más del 95% de las gotas de aceite en número están dentro de los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones de aceite de la presente invención están convencionalmente en el intervalo de desde el 2 hasta el 10% de aceite, tal como escualeno; y, si está presente, desde el 2 hasta el 10% de alfatocoferol; y desde el 0,3 hasta el 3% de tensoactivo, tal como monooleato de polioxietileno-sorbitano. Preferiblemente, la razón de aceite:alfa-tocoferol es igual o menor de 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. El Span 85 también puede estar presente, en una cantidad de aproximadamente el 1%. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizador.

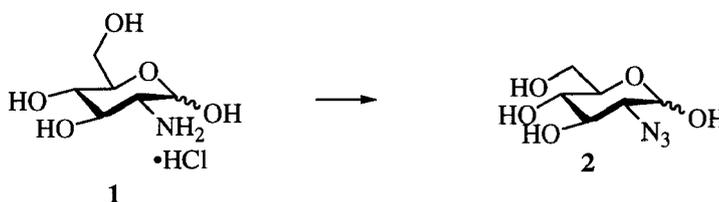
El método para producir emulsiones de aceite en agua lo conocen bien conocido los expertos en la técnica. Generalmente, el método comprende el mezclado de la fase de aceite con un tensioactivo, tal como una disolución de PBS/TWEEN 80®, seguido por homogeneización usando un homogeneizador. Por ejemplo, un método que comprende hacer pasar la mezcla una vez, dos veces o más veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. De igual forma, el procedimiento de emulsiónamiento en un microfluidizador (máquina microfluidica M110S, con un máximo de 50 pasadas durante un periodo de 2 minutos con una entrada de presión máxima de 6 bares (presión de salida de aproximadamente 850 bares)) podría adaptarse para producir volúmenes de emulsión menores o mayores. Esta adaptación podría lograrse mediante experimentación de rutina que comprenda la medida de la emulsión resultante hasta que se obtenga una preparación con las gotas de aceite del diámetro requerido.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no de limitación. Sólo los ejemplos cubiertos por el alcance de las reivindicaciones adjuntas forman parte de la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1

15 2-AZIDO-2-DESOXI-D-GLUCOPIRANÓSIDO (2)



Se disolvió azida de sodio (2,78 g, 42,7 mmol) en agua (7 ml) y tolueno (7 ml). Se enfrió la mezcla hasta 0°C con agitación vigorosa. Se añadió gota a gota anhídrido triflico (4,57 ml, 27,2 mmol), y se agitó la mezcla durante 30 min a 0°C. Se elevó la temperatura hasta 10°C, y se agitó la mezcla bifásica durante 2 h. Se añadió gota a gota una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio hasta que hubo cesado el desprendimiento de gas. Se separaron las dos fases, y se extrajo la fase acuosa con tolueno (2 x 7 ml). Se usaron las fases orgánicas combinadas en la posterior reacción de transferencia de diazo.

Se disolvieron glucosamina 1 (2,04 g, 9,45 mmol), hidrogenocarbonato de sodio (3,21 g, 38,22 mmol) y sulfato de cobre (II) pentahidratado (90,5 mg, 0,362 mmol) en agua (12,3 ml). Se añadió la disolución madre de azida triflica preparada anteriormente (21 ml), seguido por la adición de metanol (81 ml) para proporcionar un sistema homogéneo. Se agitó vigorosamente la mezcla de color azul a temperatura ambiente. Se monitorizó el consumo completo de la amina mediante CCF (tinción con ninhidrina) y también se indica por un cambio de color de la mezcla de azul a verde. Se eliminaron los disolventes a vacío con un evaporador rotatorio manteniendo la temperatura estrictamente por debajo de 25°C. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de metanol a del 0% al 40%/diclorometano a lo largo de 50 min, 85 ml/min) para dar el producto 2 (1,93 g, 99%) como un líquido incoloro. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD (mezcla de diastereómeros 1/1) δ 5,18 (d, J = 3,4 Hz, 0,5H), 4,51 (d, J = 8,0 Hz, 0,5H), 3,89-3,63 (m, 3H), 3,32-3,26 (m, 2H), 3,11-3,06 (m, 1H).

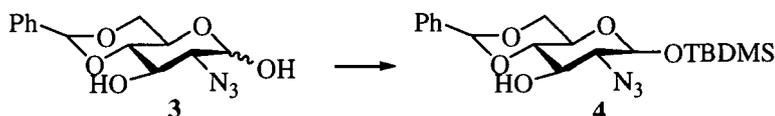
EJEMPLO 2

35 2-AZIDO-2-DESOXI-46-O-BENCILIDEN-D-GLUCOPIRANÓSIDO (3)



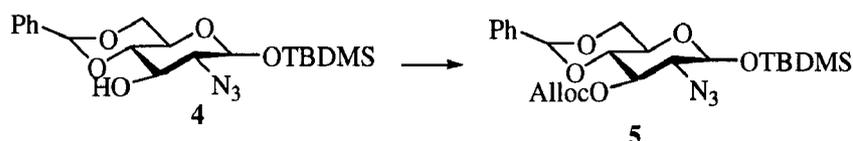
A una disolución del compuesto 2 (2,00 g, 9,75 mmol) en DMF (40 ml) se le añadió dimetil acetal de benzaldehído (1,65 g, 10,8 mmol) y ácido canforsulfónico (90 mg). Se conectó el matraz a un sistema de vacío, y se calentó la mezcla a 50°C en un baño de aceite. Después de 3 h, se concentró la mezcla usando un evaporador rotatorio. Se redisolvió el residuo en dietil éter (50 ml) y Et₃N (2 ml) seguido por bicarbonato de sodio saturado (50 ml). Se extrajo la fase acuosa con dietil éter (3 x 50 ml). Se secaron los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio y se filtraron. Después de la eliminación de los disolventes usando un evaporador rotatorio, se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 100%/hexanos a lo largo de 50 min, 85 ml/min) para dar el producto 3 (2,58 g, 90%) como un líquido incoloro. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD δ 7,49-7,32 (m, 5H), 5,58 (s, 1H), 4,64 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 4,25-3,41 (m, 5H), 3,23-3,20 (m, 1H).

EJEMPLO 3

TERC-BUTILDIMETILSILIL-2-AZIDO-4,6-O-BENCILIDEN-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (4)

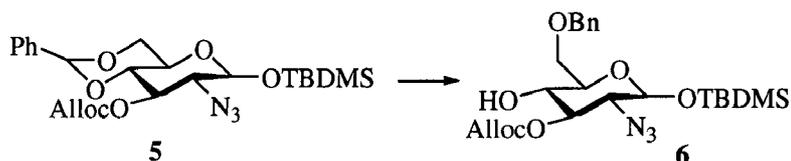
5 Se añadió cloruro de *t*-butildimetilsililo (820 mg, 5,44 mmol) a una mezcla del compuesto 3 (1,45 g, 4,94 mmol) e imidazol (768 mg, 11,3 mmol) en CH_2Cl_2 (40 ml) a 0°C . Después de que se agitate la disolución durante la noche, se añadió bicarbonato de sodio saturado (20 ml), y se extrajo la mezcla con dietil éter (3 x 30 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (columna Rediseq, 80 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 70%/hexanos a lo largo de 40 min, 60 ml/min) para proporcionar el producto 4 (1,5 g, 74%) como un sólido incoloro. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,46-7,43 (m, 2H), 7,35-7,32 (m, 3H), 5,48 (s, 1H), 4,59 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 4,23 (dd, $J = 10,2, 5,0$ Hz, 1H), 3,73 (t, $J = 10,2$ Hz, 1H), 3,56-3,51 (m, 2H), 3,31-3,28 (m, 2H), 2,72 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 0,91 (s, 9H), 0,14 (s, 3H), 0,13 (s, 3H).

EJEMPLO 4

15 TERC-BUTILDIMETILSILIL-3-O-ALILOXICARBONIL-2-AZIDO-4,6-O-BENCILIDIDIN-2-DESOXI-D-GLUCOPIRANÓSIDO (5)

20 A una disolución del compuesto 4 (1,50 g, 3,68 mmol) y tetrametiletilendiamina (TMEDA) (0,78 ml, 5,2 mmol) en diclorometano (DCM) (50 ml) a 0°C se le añadió clorformiato de alilo (0,78 ml, 7,3 mmol) gota a gota. Se permitió que se calentase la mezcla hasta temperatura ambiente, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 h. Se diluyó la mezcla con DCM (50 ml) y se lavó con NaHCO_3 acuoso saturado (2 x 100 ml) y salmuera (2 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (columna Rediseq, 80 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 50%/hexanos a lo largo de 40 min, 60 ml/min) para proporcionar el producto 5 (1,57 g, 87%) como un sólido incoloro. $R_f = 0,40$ (hexanos/acetato de etilo, 3/1, v/v). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,44-7,41 (m, 2H), 7,35-7,32 (m, 3H), 5,98-5,85 (m, 1H), 5,48 (s, 1H), 5,38-5,22 (m, 2H), 4,88 (t, $J = 11,4$ Hz, 1H), 4,72-4,64 (m, 3H), 4,32-4,27 (m, 1H), 3,81-3,65 (m, 2H), 3,50-3,42 (m, 2H), 0,94 (s, 9H), 0,18 (s, 3H), 0,17 (s, 3H).

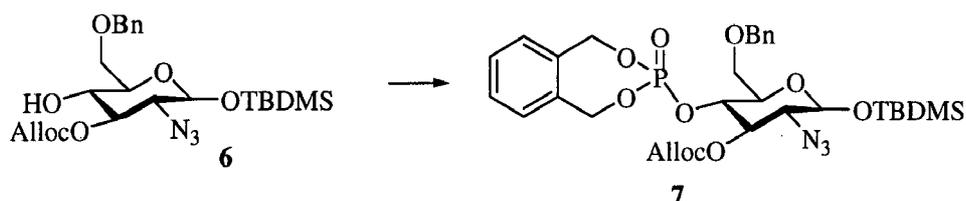
EJEMPLO 5

TERC-BUTILDIMETILSILIL-3-O-ALILOXICARBONIL-2-AZIDO-6-O-BENCIL-2-DESOXI-D-GLUCOPIRANÓSIDO (6)

30 Se agitó una suspensión del compuesto 5 (320 mg, 0,651 mmol) y tamices moleculares (4 Å, 200 mg) en THF (5 ml) a temperatura ambiente durante 1 h, y luego se le añadió NaCNBH_3 (246 mg, 3,91 mmol). Se añadió gota a gota una disolución de cloruro de hidrógeno (2 M en dietil éter) a esta mezcla hasta que la mezcla se volvió ácida (~ 5 ml, pH = 5). Después de agitarse otras 0,5 h, se extinguió la mezcla de reacción con NaHCO_3 sólido diluido con dietil éter (100 ml), y se lavó con NaHCO_3 acuoso saturado (2 x 100 ml) y salmuera (2 x 50 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se filtró, se concentró a vacío, y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (columna Rediseq, 40 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 100%/hexanos a lo largo de 40 min, 40 ml/min) para proporcionar el producto 6 (273 mg, 85%) como un sólido incoloro. $R_f = 0,42$ (hexanos/acetato de etilo, 4/1, v/v). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,39-7,34 (m, 5H), 5,99-5,89 (m, 1H), 5,40-5,26 (m, 2H), 4,67-4,56 (m, 5H), 3,72-3,70 (m, 3H), 3,48-3,46 (m, 2H), 3,37 (dd, $J = 9,6, 8,4$ Hz, 1H), 3,01 (s ancho, 1H), 0,94 (s, 9H), 0,17 (s, 6H).

EJEMPLO 6

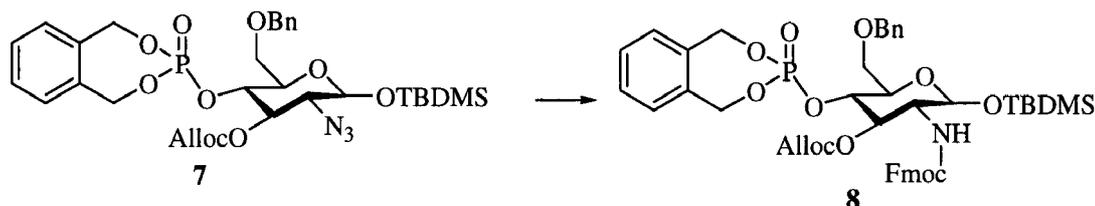
TERC-BUTILDIMETILSILIL-3-O-ALILOXICARBONIL-2-AZIDO-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHIDRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-D-GLUCOPIRANÓSIDO (7)



A una disolución del compuesto 6 (5,47 g, 11,1 mmol) y 1*H*-tetrazol (al 3% en peso en acetonitrilo, 35,5 mmol, 104 ml) se le añadió *N,N*-dietil-1,5-dihidro-3*H*-2,4,3-benzodioxafosfepin-3-amina (5,3 g, 22 mmol). Después de agitarse la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 min, se enfrió hasta -20°C, se agitó durante otros 10 min a esa temperatura, y luego se le añadió *m*CPBA (8,40 g, al 50-55% en peso, 24,4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -20°C durante 20 min, y se concentró a vacío. Se redisolvió el residuo en DCM (30 ml) y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (40 ml). Se extrajo la fase acuosa con DCM (3 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 100%/hexanos a lo largo de 60 min, 85 ml/min) para proporcionar el producto 7 (4,85 g, 65%) como un aceite de color amarillo pálido. *R_f* = 0,40 (hexanos/acetato de etilo, 1/1, v/v). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,35-7,18 (m, 9H), 5,98-5,85 (m, 1H), 5,41-5,05 (m, 6H), 4,64 (t, *J* = 10,1 Hz, 1H), 4,58-4,52 (m, 6H), 3,83 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 3,72-3,61 (m, 2H), 3,41 (dd, *J* = 10,5, 7,4 Hz, 1H), 0,92 (s, 9H), 0,16 (s, 3H), 0,15 (s, 3H).

EJEMPLO 7

15 TERC-BUTILDIMETILSILIL-3-O-ALILOXICARBONIL-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHI-DRO-3-OXO-3λ⁵-3*H*-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL-2-(9-FLUORENILMETOXICARBONILAMINO)-D-GLUCOPIRANÓSIDO (8)



Se añadió gota a gota ácido acético (0,30 ml, 5,2 mmol) a una suspensión con agitación de 7 (700 mg, 1,04 mmol) y polvo de zinc (676 mg, 10,4 mmol) en DCM (15 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 h, después de lo cual se diluyó con acetato de etilo (50 ml). Se retiraron los sólidos por filtración y se lavaron con acetato de etilo (2 x 10 ml). Se lavaron los filtrados combinados con NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 40 ml) y salmuera (2 x 40 ml). Se secó la fase orgánica (MgSO₄) y se filtró, y se concentró el filtrado a vacío para proporcionar la amina intermedia en bruto como un aceite de color amarillo pálido. *R_f* = 0,21 (hexanos/acetato de etilo, 1/1, v/v). Se añadió cloruro de 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc-Cl) (323 mg, 1,25 mmol) a una disolución con agitación de la amina en bruto y diisopropiletilamina (DIPEA) (0,22 ml, 1,3 mmol) en DCM (15 ml) a 0°C. Se calentó y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 h, después de lo cual se diluyó con DCM (40 ml) y se lavó con salmuera (2 x 50 ml). Se secó la fase orgánica (MgSO₄) y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (columna Redisepe, 40 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 100%/hexanos a lo largo de 30 min, 40 ml/min) para dar el producto 8 (337 mg, 73% a lo largo de dos etapas) como un sólido blanco. *R_f* = 0,54 (hexanos/acetato de etilo, 1/1, v/v). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,78-7,20 (m, 17H), 5,92-5,82 (m, 1H), 5,49-5,16 (m, 8H), 4,69-4,06 (m, 5H), 4,49-4,28 (m, 2H), 3,88-3,61 (m, 3H), 3,60-3,51 (m, 2H), 3,32 (s ancho, 1H), 0,94 (s, 9H), 0,14 (s, 3H), 0,10 (s, 3H).

EJEMPLO 8

35 3-O-ALILOXICARBONIL-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHI-DRO-3-OXO-3λ⁵-3*H*-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-(9-FLUORENILMETOXICARBONILAMINO)-D-GLUCOPIRANÓSIDO (9)

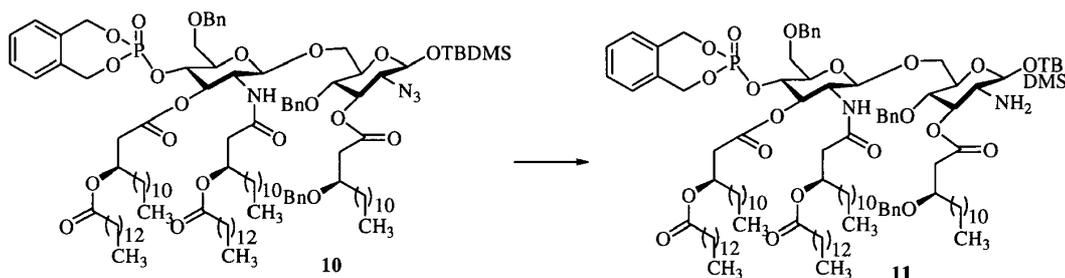


Se añadió gota a gota fluoruro de hidrógeno/piridina (6 ml, 0,2 mol) a una disolución con agitación de 8 (6,00 g, 6,88 mmol) en THF (50 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 12 h, después de lo cual se diluyó con diel éter (100 ml), y luego se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 40 ml) y salmuera (2 x 40 ml). Se secó la fase orgánica (MgSO₄) y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío. Se purificó el residuo mediante

cromatografía en columna sobre gel de sílice (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 80%/hexanos a lo largo de 60 min, 85 ml/min) para dar el producto 9 (4,34 g, 83%) como un aceite de color amarillo pálido. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,75-7,20 (m, 17H), 5,92-5,82 (m, 1H), 5,27-5,06 (m, 9H), 4,59-4,55 (m, 5H), 4,41-4,39 (m, 1H), 4,25-4,01 (m, 5H), 3,85-3,65 (m, 2H).

5 EJEMPLO 9

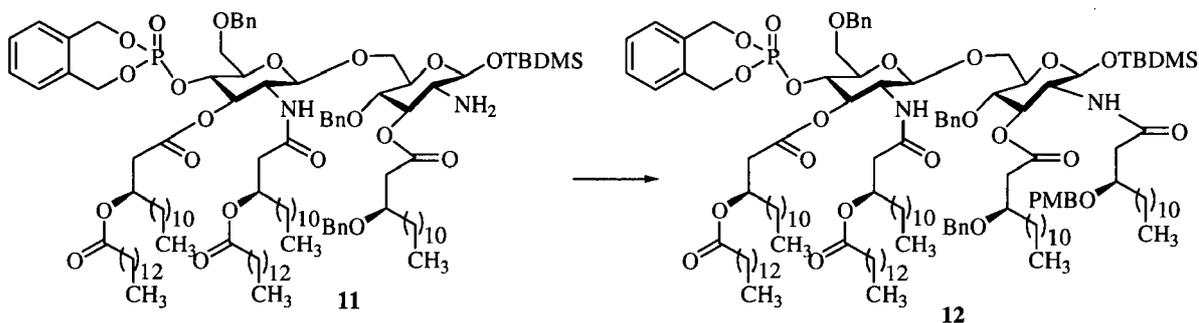
TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(3-O-ALILOXICARBONIL-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHI-DRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(R)-3-DODECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]- β -D-GLUCOPIRANOSIL}-2-AZIDO-4-O-BENCIL-3-O-[(R)-3-BENCILOXI-DODECANOIL]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (11)



Se agitó una suspensión de 10 (véase la preparación a continuación) (350 mg, 0,172 mmol), zinc (1,3 g, 21 mmol) y ácido acético (0,70 ml, 12 mmol) en DCM (20 ml) a temperatura ambiente durante 12 h. Se diluyó la mezcla con dietil éter. Se retiraron los sólidos por filtración, y se lavó el residuo con dietil éter (2 x 10 ml). Se lavaron los filtrados combinados con NaHCO_3 acuoso saturado (2 x 15 ml) y salmuera (2 x 15 ml). Se secó la fase orgánica (MgSO_4) y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío, y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (columna RediSep, 12 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 60%/hexanos a lo largo de 35 min, 30 ml/min) para proporcionar el producto 11 (220 mg, 64%) como un sirope de color amarillo pálido. R_f = 0,29 (hexanos/acetato de etilo, 5/2, v/v). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,37-7,24 (m, 20H), 6,20 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 5,59 (t, J = 9,6 Hz, 1H), 5,31 (m, 1H), 5,12-4,97 (m, 6H), 4,62-4,44 (m, 7H), 4,05-3,24 (m, 9H), 2,68-2,12 (m, 9H), 1,64-1,59 (m, 13H), 1,27 (m ancho, 95H), 0,94 (m, 25H), 0,13 (s, 6H). EMAR (m/z) (pos.) calc. para $\text{C}_{117}\text{H}_{193}\text{N}_2\text{O}_{20}\text{PSi}$, 2005,37; hallado, 2006,3729 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

EJEMPLO 10

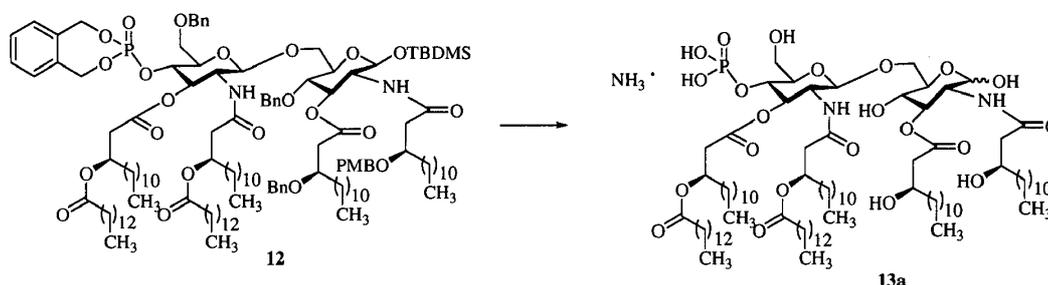
TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(3-O-ALILOXICARBONIL-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHI-DRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(R)-3-DODECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]- β -D-GLUCOPIRANOSIL}-4-O-BENCIL-3-O-[(R)-3-BENCILOXI-DODECANOIL]-2-[(R)-3-4-METOXIBENCILOXI-TETRADECANOIL]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (12)



A una disolución de la amina 11 (93 mg, 0,046 mmol) en DCM (10 ml) se le añadió piridina (21 mg, 0,27 mmol), cloruro de (R)-3-(4-metoxibenciloxi)tetradecanoilo (véase la preparación a continuación, compuesto 35) (40 mg, 0,12 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (1 mg) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla durante la noche. se transfirió la mezcla a un embudo de decantación y se diluyó con dietil éter (20 ml) y bicarbonato de sodio saturado (20 ml). Se extrajo la fase acuosa con dietil éter (3 x 20 ml). Se secaron los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna RediSep, 12 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 80%/hexanos a lo largo de 35 min, 30 ml/min) para dar el producto 12 (81 mg, 74%) como un líquido incoloro. R_f = 0,34 (hexanos/acetato de etilo, 3/2, v/v). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,34-7,20 (m, 20H), 6,89-6,86 (m, 4H), 6,15 (t, J = 9,0 Hz, 1H), 5,57-5,55 (m, 1H), 5,31-4,99 (m, 8H), 4,57-4,44 (m, 11H), 4,06-3,33 (m, 15H), 2,63-2,57 (m, 5H), 2,33-2,27 (m, 9H), 1,57 (m, 8H), 1,27 (m ancho, 112H), 0,88-0,82 (m, 27H), 0,08 (s, 3H), 0,04 (s, 3H). EMAR (m/z) (pos.) calc. para $\text{C}_{139}\text{H}_{227}\text{N}_2\text{O}_{23}\text{PSi}$, 2351,62; hallado, 2352,6343 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

EJEMPLO 11

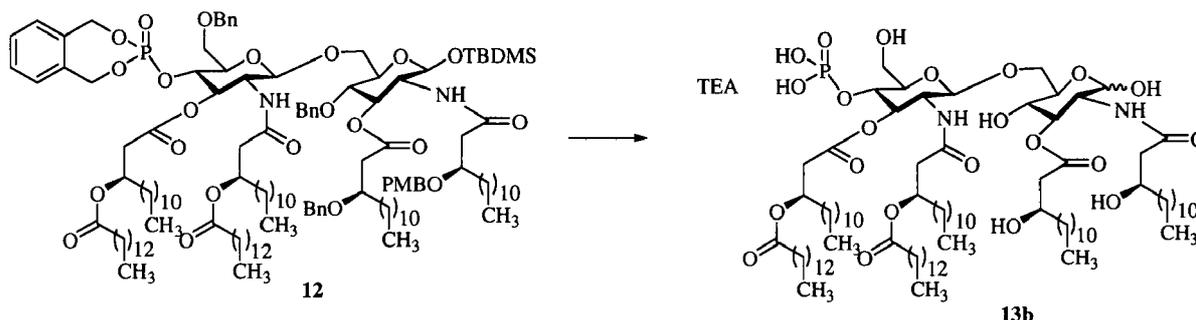
LÍPIDO A (13a)



5 Se agitó una suspensión de 12 (10 mg, 0,0042 mmol) y negro de Pd (15,0 mg) en THF anhidro (5 ml) bajo una atmósfera de H₂ (50 psi) a temperatura ambiente durante 30 h. Se retiró el catalizador por filtración. Se lavó el residuo con THF (2 x 1 ml). Se enfrió la disolución hasta -40°C y se neutralizó con amoniaco en metanol (0,1 ml, 7 M) y se concentró sin calentar a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía (columna Rediseq, 12 g, eluyendo con cloroformo/metanol/agua 8/2/0,1 durante 30 min, 30 ml/min) para proporcionar 13a (4 mg, 54%) como una película incolora. Se redisolvió el producto en agua y metanol (v/v, 1/1, 2 ml) y se liofilizó para obtener el producto 13a como un polvo blanco. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,00-5,00 (m, 1H), 4,50-3,50 (m, 2H), 3,00-2,00 (m, 3H), 2,00-1,00 (m, 50H), 0,81 (m, 18H). EM (multimodal, neg.) calc. para C₉₆H₁₈₁N₂O₂₂P, 1745,28; hallado, 1745,0 [M - H]⁻.

EJEMPLO 12

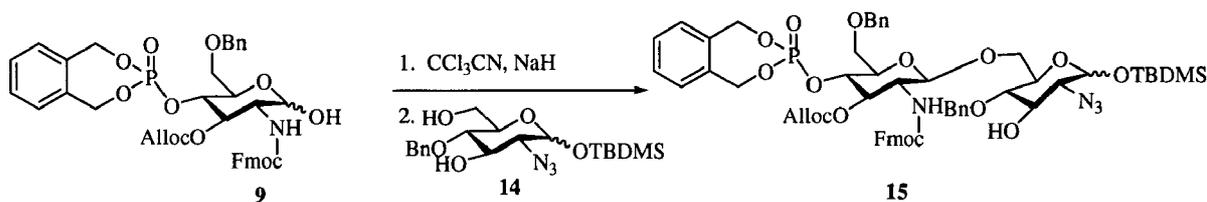
LÍPIDO A (13b)



15 Se agitó una suspensión de 12 (27 mg, 0,011 mmol) y negro de Pd (41,0 mg) en THF anhidro (12 ml) bajo una atmósfera de H₂ (50 psi) a temperatura ambiente durante 30 h. Se retiró el catalizador por filtración. Se lavó el residuo con THF (2 x 3 ml). Se neutralizó la disolución con trietilamina (TEA) (0,1 ml) y se concentró sin calentar a vacío. Se concentraron a vacío los filtrados combinados y se purificaron mediante cromatografía sobre sílice (columna Rediseq, 12 g, eluyendo con cloroformo/metanol/agua 8/2/0,1 30 min, 30 ml/min) para proporcionar 13b (5 mg, 25%) como una película incolora. Se redisolvió el producto en agua y metanol (v/v, 1/1, 2 ml) y se liofilizó para obtener el producto 13b como un polvo blanco. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5,17 (ancho, 2H), 4,23-3,62 (m, 5H), 3,11-3,07 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 2,51-2,12 (m, 6H), 1,56-1,00 (m, 69H), 0,92-0,84 (m, 18H). EM (multimodal, neg.) calc. para C₉₆H₁₈₁N₂O₂₂P, 1745,28; hallado, 1744,1 [M - H]⁻.

EJEMPLO 13

TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-[3-O-ALILOXICARBONIL-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHI-DRO-3-OXO-3λ⁵-3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-(9-FLUORENILMETOXICARBONILAMINO)-β-D-GLUCOPIRANOSIL]-2-AZIDO-4-O-BENCIL-2-DESOXI-β-D-GLUCOPIRANÓSIDO (15)

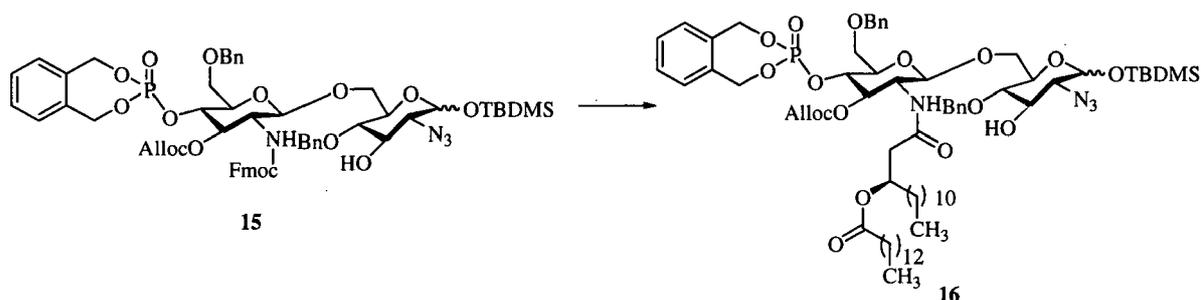


30 Se disolvió el compuesto 9 (89 mg, 0,12 mmol) en DCM anhidro (3 ml). Se añadió tricloroacetoni-trilo (1,0 ml) seguido por hidru-ro de sodio (1,0 mg, al 60% en aceite mineral). Después de 15 min, la CCF indicó la presencia de 9, de

modo que se añadió una cantidad adicional de hidruro de sodio (1 mg, al 60% en aceite mineral). Después de 15 min, la CCF indicó que la reacción era completa. Se concentró la mezcla a vacío y se cargó sobre una columna de SiO₂ que se pretrató con Et₃N y se eluyó con acetato de etilo al 50%/hexanos para proporcionar el producto intermedio de tricloroacetimidato (76,9 mg, 71%) que se usó sin purificación adicional. Se agitó una suspensión de tricloroacetimidato (76,9 mg, 0,0852 mmol), el aceptor 14 (véase la preparación a continuación) (52,34 mg, 0,1277 mmol) y tamices moleculares (4 Å, 500 mg) en DCM (5,0 ml) a temperatura ambiente durante 1 h. Se enfrió la mezcla (-60°C) y se le añadió TMSOTf (1,54 µl, 0,0851 mmol). Después de agitarse la mezcla de reacción durante 30 min, se extinguió con NaHCO₃ sólido. Se retiraron los sólidos por filtración, y se concentró el filtrado a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexanos/acetato de etilo, 2:1 (v/v)) para dar 15 (55 mg, 40%) como un sólido incoloro. ¹H-RMN (500 MHz, CD₃COCD₃) δ 7,86-7,22 (m, 22H), 6,98 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 5,85 (m, 1H), 5,41 (t, *J* = 9,0 Hz, 1H), 5,38-5,21 (m, 3H), 5,10-5,02 (m, 3H), 4,91 (d, *J* = 11,0 Hz, 2H), 4,72-4,46 (m, 7H), 4,23-4,15 (m, 4H), 3,93-3,80 (m, 4H), 3,69-3,66 (m, 1H), 3,54 (s a, 3H), 3,20 (dd, *J*₁ = 8,0 Hz, *J*₂ = 8,0 Hz, 1H), 0,95 (s, 9H), 0,17 (s, 6H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃COCD₃) δ 207,00, 156,61, 155,51, 145,22, 144,82, 142,06, 142,01, 139,98, 139,57, 136,68, 136,62, 133,02, 132,94, 129,85, 129,83, 129,15, 129,05, 128,95, 128,91, 128,82, 128,61, 128,49, 128,41, 128,21, 128,17, 128,0, 127,92, 126,19, 126,09, 125,98, 120,79, 118,60, 118,52, 101,41, 97,57, 78,78, 78,10, 76,84, 75,98, 75,88, 75,43, 75,30, 75,17, 74,70, 74,07, 70,63, 69,76, 69,64, 69,27, 69,15, 69,10, 69,02, 68,97, 67,73, 67,17, 57,29, 54,94, 26,11, 18,51; EMAR (*m/z*) calc. para C₅₉H₆₉N₄O₁₆PSi [M + H]⁺, 1149,4293; hallado, 1149,4238.

EJEMPLO 14

20 TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-[(3-O-ALILOXICARBONIL-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHI-DRO-3-OXO-3λ⁵-3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(R)-3-DODECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO-β-D-GLUCOPIRANOSIL]-2-AZIDO-4-O-BENCIL-2-DESOXI-β-D-GLUCOPIRANÓSIDO (16)

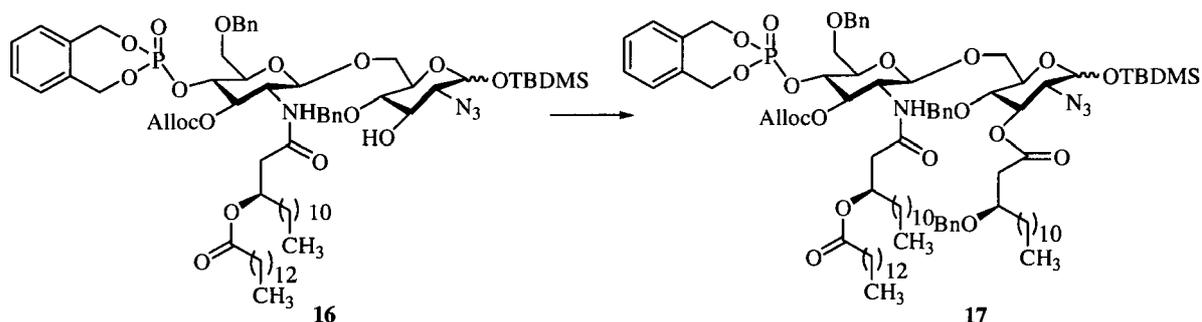


25 Se añadió gota a gota 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (220 µl, 1,47 mmol) a una disolución de 15 (800 mg, 0,696 mmol) en DCM (10 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h, después de lo cual se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/metanol, de 100:1 a 100:3 (v/v)) para proporcionar la amina libre (648 mg, 99%) como un sirope incoloro. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,36-7,17 (m, 14H), 5,96-5,88 (m, 1H), 5,40-5,06 (m, 7H), 4,84-4,50 (m, 9H), 4,21 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H), 4,15-4,11 (m, 1H), 3,82 (m, 1H), 3,79-3,42 (m, 5H), 3,34-3,19 (m, 2H), 2,96-2,90 (m, 1H), 2,34 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H), 0,90 (s, 9H), 0,13 (s, 6H). EMAR (*m/z*) calc. para C₄₄H₅₉N₄O₁₄PSi [M + H]⁺, 927,3613; hallado, 927,3569.

35 Se añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (230 mg, 1,11 mmol) a una disolución con agitación de ácido (R)-3-dodecanoiltetradecanoico (véase la preparación a continuación, compuesto 40) (381 mg, 0,81 mmol) en DCM (10 ml). Después de agitarse la mezcla de reacción durante 10 min, se añadió la amina libre (648 mg, 0,699 mmol) en DCM (10 ml), y se continuó con la agitación durante otras 12 h. Se retiraron los materiales insolubles por filtración, y se lavó el residuo con DCM (2 x 2 ml). se concentraron a vacío los filtrados combinados, y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexanos/acetato de etilo, 2:1 (v/v)) para dar 16 (450 mg, 47%) como un sólido blanco. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,35-7,17 (m, 14H), 5,94-5,86 (m, 2H), 5,47 (t, *J* = 9,0, 10,5 Hz, 1H), 5,37 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 5,34 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 5,24 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H), 5,13-4,97 (m, 6H), 4,75 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 4,66-4,49 (m, 7H), 4,00 (d, *J* = 17,0 Hz, 2H), 3,83 (d, *J* = 10,5 Hz, 1H), 3,75-3,56 (m, 4H), 3,49-3,36 (m, 5H), 3,20 (m, 1H), 2,42-2,17 (m, 4H), 1,93 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 1,70 (m, 2H), 1,23 (s a, 36H), 0,92 (s, 9H), 0,89-0,86 (m, 6H), 0,14 (s, 6H); EMAR (*m/z*) calc. para C₇₂H₁₁₁N₄O₁₇PSi [M + H]⁺, 1363,7529; hallado, 1363,7487.

EJEMPLO 15

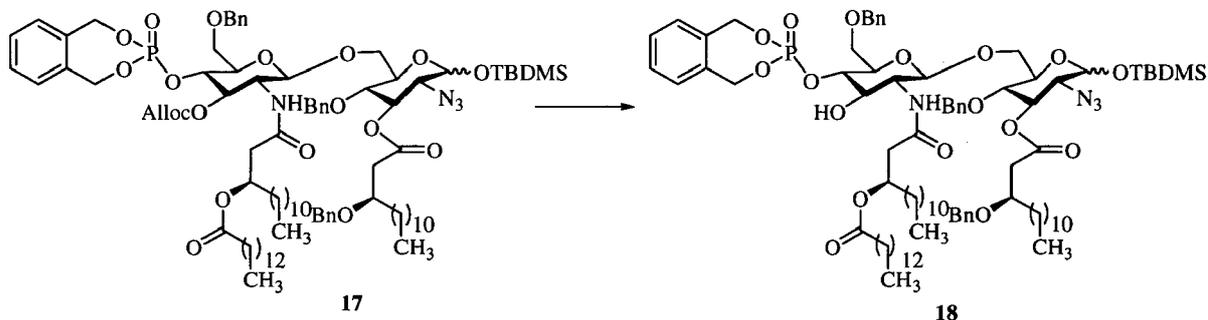
45 TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-[(3-O-ALILOXICARBONIL-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHI-DRO-3-OXO-3λ⁵-3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(R)-3-DODECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]-β-D-GLUCOPIRANOSIL]-2-AZIDO-4-O-BENCIL-3-O-[(R)-3-BENCIOLOXI-TETRADECANOIL]-2-DESOXI-β-D-GLUCOPIRANÓSIDO (17)



Se agitó una mezcla de ácido (*R*)-3-benciloitetradecanoico (véase la preparación a continuación, compuesto 33) (120 mg, 0,540 mmol) y DCC (171 mg, 0,830 mmol) en DCM (5 ml) a temperatura ambiente durante 10 min, y luego se añadieron el disacárido 16 (451 mg, 0,331 mmol) en DCM (5 ml) y DMAP (25 mg, 0,21 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 14 h, después de lo cual se retiraron los sólidos por filtración. Se lavó el residuo con DCM (2 x 4 ml). Se concentraron a vacío los filtrados combinados, y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexanos/acetato de etilo, 4:1 (v/v)) para dar 17 (540 mg, 97%) como un sólido blanco. $R_f = 0,41$ (hexanos/acetato de etilo, 2:1(v/v)). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,33-7,15 (m, 19H), 5,94-5,85 (m, 2H), 5,47(t, $J = 9,5$ Hz, 1H), 5,37 (d, $J = 17,5$ Hz, 1H), 5,22 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 5,10-4,95 (m, 7H), 4,62-4,43 (m, 10H), 4,0-3,96 (m, 3H), 3,90-3,81 (m, 2H), 3,74-3,67 (m, 3H), 3,56-3,42 (m, 6H), 3,33-3,27 (m, 1H), 2,60-2,21 (m, 6H), 1,24 (s a, 54H), 0,91 (s, 9H), 0,87-0,84 (m, 9H), 0,14 (s, 6H). EMAR (m/z) calc. para $\text{C}_{93}\text{H}_{143}\text{N}_4\text{O}_{19}\text{PSi}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 1679,9931; hallado, 1679,9934.

EJEMPLO 16

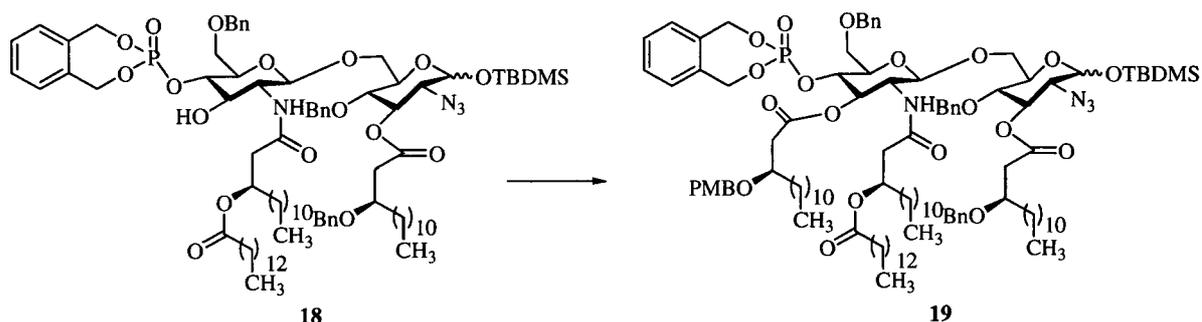
TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHI-DRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(*R*)-3-DODECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]- β -D-GLUCOPIRANOSIL]-2-AZIDO-4-O-BENCIL-3-O-[(*R*)-3-BENCILOXI-TETRADECANOIL]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (18)



Se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio (228 mg, 0,198 mmol) a una disolución de 17 (1,66 g, 0,980 mmol), *n*-BuNH₂ (0,19 ml, 1,97 mmol) y HCOOH (74,5 μl , 1,98 mmol) en THF (20 ml). Después de agitarse la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 min, se diluyó con DCM (40 ml) y se lavó sucesivamente con agua (40 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 40 ml) y salmuera (40 ml). Se secó la fase orgánica (MgSO₄) y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexanos/acetato de etilo, 4:3 (v/v)) para dar compuesto 18 (1,43 g, 91%). $R_f = 0,5$ (hexanos/acetato de etilo, 1:1 (v/v)). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,33-7,11 (m, 19H), 6,2 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 5,46 (t, $J = 9,0$ Hz, 1H), 5,04-4,90 (m, 9H), 4,55-4,38 (m, 8H), 3,92 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 3,84-3,76 (m, 1H), 3,75-3,7 (m, 4H), 3,53-3,44 (m, 2H), 3,43-3,32 (m, 2H), 3,25-3,20 (m, 1H), 2,61-2,10 (m, 12H), 1,23 (s a, 54H), 0,90 (s, 9H), 0,88-0,84 (m, 9H), 0,12 (s, 6H). EMAR (m/z) calc. para $\text{C}_{89}\text{H}_{139}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{PSi}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 1595,972; hallado, 1595,9713.

EJEMPLO 17

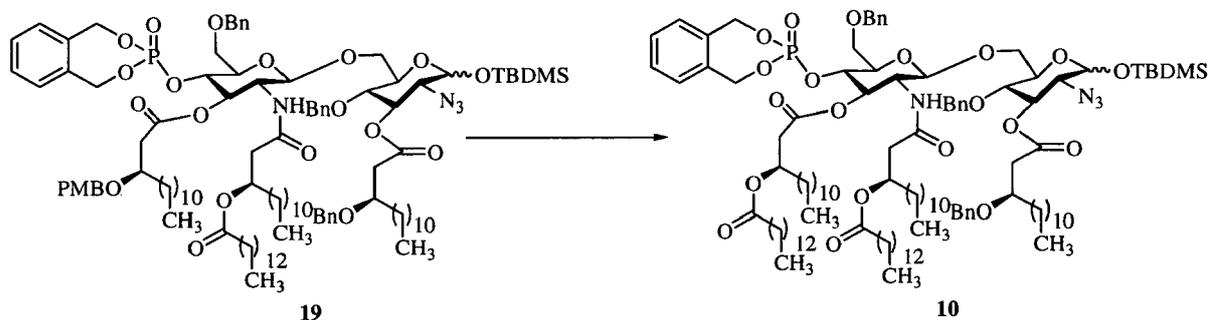
TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHI-DRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(*R*)-3-DODECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]-3-O-[(*R*)-3-(*P*-METOXI)BENCILOXITETRADECANOIL]- β -D-GLUCOPIRANOSIL]-2-AZIDO-4-O-BENCIL-3-O-[(*R*)-3-BENCILOXI-TETRADECANOIL]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (19)



Se agitó una disolución de ácido (*R*)-3-(*p*-metoxi)enciloxi-tetradecanoico (véase la preparación a continuación, compuesto 34, 424 mg, 1,16 mmol) y DCC (369 mg, 1,79 mmol) en DCM (15 ml) a temperatura ambiente durante 10 min, y se añadieron el alcohol 18 (1,43 g, 0,896 mmol) en DCM (10 ml) y DMAP (54,72 mg, 0,4479 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante otras 14 h, después de lo cual se retiraron los sólidos por filtración y se lavó con DCM (2 x 5 ml). Se concentraron a vacío los filtrados combinados. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexanos/acetato de etilo, 4:1 (v/v)) para proporcionar 19 (1,15 g, 66%) como un sólido blanco. $R_f = 0,46$ (hexanos/acetato de etilo, 2:1 (v/v)). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,38-6,79 (m, 23H), 5,73 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 5,55 (t, $J = 9,5$ Hz, 1H), 5,20-4,88 (m, 8H), 4,66-4,47 (m, 12H), 4,33 (d, $J = 12,5$ Hz, 1H), 4,0-3,66 (m, 12H), 3,61-3,40 (m, 5H), 3,36-3,27 (m, 3H), 2,67 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,60-2,22 (m, 6H), 1,27 (s a, 72H), 0,93 (s, 9H), 0,92-0,87 (m, 12H), 0,16 (s, 6H). EMAR (m/z) calc. para $\text{C}_{111}\text{H}_{173}\text{N}_4\text{O}_{20}\text{PSi}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 1942,2228; hallado, 1942,2289.

EJEMPLO 18

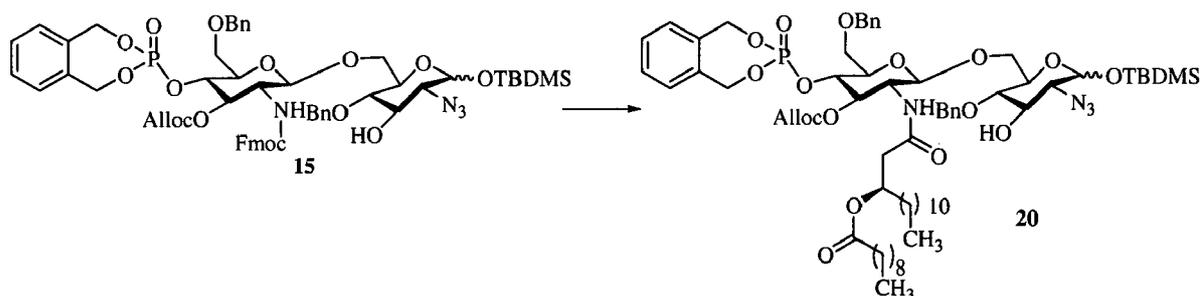
TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHIDRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(*R*)-3-DODECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]-3-O-[(*R*)-3-TETRADECANOILOXI-TETRADECANOIL]- β -D-GLUCOPIRANOSIL]-2-AZIDO-4-O-BENCIL-3-O-[(*R*)-3-BENCIOXI-TETRADECANOIL]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (10)



A una disolución con agitación de 19 (1,15 g, 0,592 mmol) en una mezcla de DCM y H_2O (11 ml, 10:1 (v/v)) Se añadió 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) (202 mg, 0,890 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h, después de lo cual se diluyó con DCM. Se lavó la mezcla con salmuera (20 ml), se secó (MgSO_4), y se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexanos/acetato de etilo, 3:1 (v/v)) para dar el alcohol como un sirope incoloro (1,01 g, 94%). $R_f = 0,50$ (hexanos/acetato de etilo, 5:3 (v/v)). Se añadió cloruro de miristoilo (0,74 ml, 2,7 mmol) a una disolución del alcohol (1,01 g, 0,554 mmol) y piridina (0,35 ml, 4,33 mmol) en DCM (20 ml). Después de agitarse la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 12 h, se diluyó con DCM y se lavó con NaHCO_3 acuoso saturado (2 x 40 ml) y salmuera (40 ml). Se secó la fase orgánica (MgSO_4) y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexanos/acetato de etilo, 4:1 (v/v)) para proporcionar 10 (680 mg, 57%) como un sólido blanco. $R_f = 0,46$ (hexanos/acetato de etilo, 5:2 (v/v)). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,37-7,24 (m, 19H), 6,23 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 5,58 (t, $J_1 = J_2 = 9,5$ Hz, 1H), 5,32-5,27 (m, 1H), 5,16-4,99 (m, 6H), 4,78-4,44 (m, 7H), 4,03 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 3,99-3,20 (m, 10H), 2,65-2,21 (m, 10H), 1,61-1,51 (m, 10H), 1,27 (s a, 94H), 1,21 (s a, 25H), 0,12 (s, 6H).

EJEMPLO 19

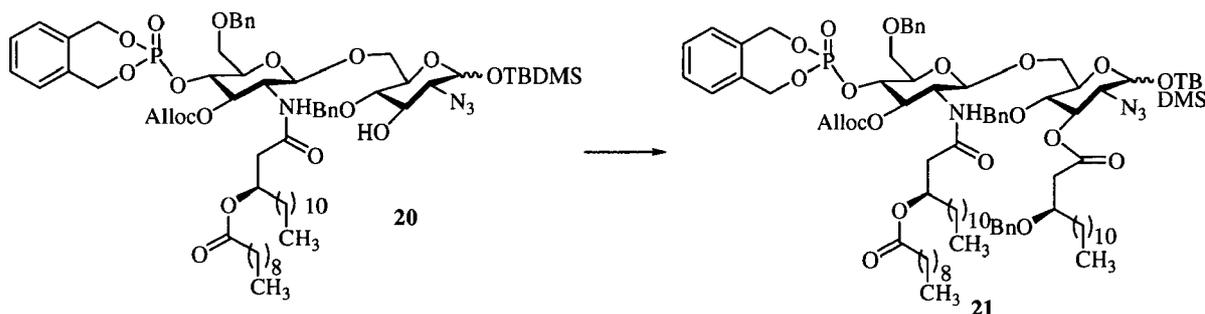
TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(3-O-ALIOXICARBONIL-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHIDRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(*R*)-3-DECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]- β -D-GLUCOPIRANOSIL]-2-AZIDO-4-O-BENCIL-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (20)



- 5 Se aciló el compuesto 15 (1,23 g, 1,07 mmol) de manera similar a la síntesis del compuesto 16 (ejemplo 14) usando (DCC, 430 mg, 2,08 mmol), el lípido requerido (compuesto 40, ejemplo 36, 630 mg, 1,59 mmol) y trietilamina (161 mg, 1,59 mmol) para proporcionar 20 (1,05 g, 81%) como un aceite incoloro. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,35-7,17 (m, 14H), 5,91-5,86 (m, 2H), 5,47 (t, $J = 9,0, 10,5$ Hz, 1H), 5,34 (d, $J = 17$ Hz, 1H), 5,24 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 5,10-4,98 (m, 8H), 4,75 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H), 4,66-4,49 (m, 8H), 4,00 (d, $J = 11,0$ Hz, 2H), 3,83 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 3,75-3,69 (m, 2H), 3,49-3,36 (m, 4H), 3,20 (m, 1H), 2,40-2,26 (m, 4H), 1,24 (s a, 32H), 0,92 (s, 9H), 0,89-0,86 (m, 6H), 0,14 (s, 6H); EM (multimodal, pos.) $m/z = 1307$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

EJEMPLO 20

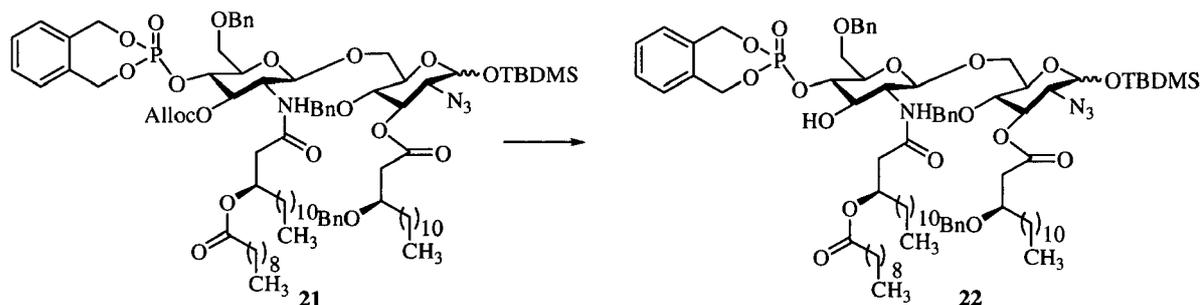
- 10 TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(3-O-ALIOXICARBONIL-6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHIDRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(R)-3-DECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]- β -D-GLUCOPIRANOSIL)-2-AZIDO-4-O-BENCIL-3-O-[(R)-3-BENCIOLOXI-TETRADECANOIL]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (21)



- 15 Se aciló el compuesto 20 (1,43 g, 1,18 mmol) de manera similar a la síntesis del compuesto 17 (ejemplo 15) usando (DCC, 453 mg, 2,20 mmol), el lípido requerido (477 mg, 1,43 mmol) y N,N-dimetil-4-aminopiridina (67 mg, 0,548 mmol) para proporcionar 21 (1,60 g, 83%) como un aceite incoloro. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,33-7,15 (m, 19H), 5,94-5,85 (m, 2H), 5,48 (t, $J = 9,0$ Hz, 1H), 5,34 (d, $J = 17,5$ Hz, 1H), 5,22 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 5,12-4,96 (m, 7H), 4,63-4,46 (m, 11H), 3,97 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 3,89-3,85 (m, 2H), 3,74-3,68 (m, 3H), 3,55-3,52 (m, 2H), 3,47-3,41 (m, 1H), 3,28 (m, 1H), 2,61-2,22 (m, 8H), 1,59-1,52 (m, 6H), 1,98 (m, 2H), 1,23 (s a, 44H), 0,90 (s, 9H), 0,88-0,84 (m, 9H), 0,12 (s, 6H); EM (multimodal, pos.) $m/z = 1625$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

EJEMPLO 21

- 25 TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHIDRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(R)-3-DODECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]- β -D-GLUCOPIRANOSIL)-2-AZIDO-4-O-BENCIL-3-O-[(R)-3-BENCIOLOXI-TETRADECANOIL]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (22)

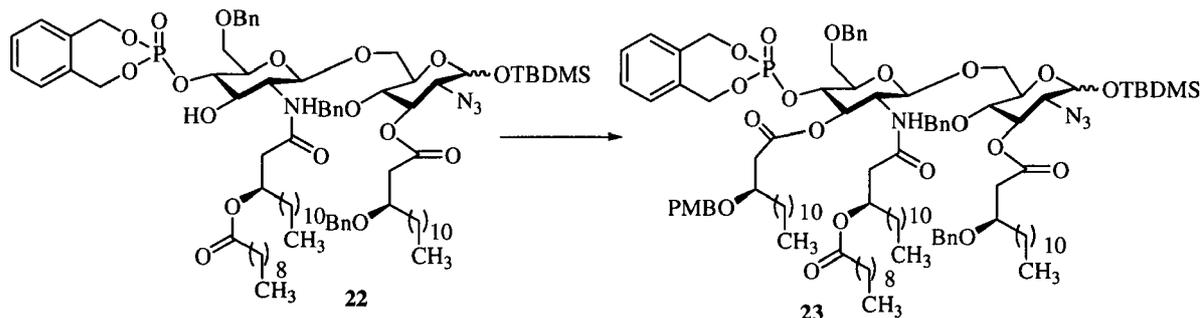


Se hizo reaccionar el compuesto 21 (1,60 g, 0,985 mmol) de manera análoga a la síntesis del compuesto 18 (ejemplo 16). Por consiguiente, tetrakis(trifenilfosfina)paladio, (227 mg, 0,196 mmol), ácido fórmico (74 μl ,

1,97 mmol) y n-butilamina (144 mg, 1,97 mmol) para proporcionar 22 (1,25 g, 82%) como un sólido amarillo. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,33-7,15 (m, 19H), 6,20 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 5,38-4,95 (m, 6H), 4,86 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 4,60-4,46 (m, 10H), 3,97-3,71 (m, 8H), 3,68-3,48 (m, 5H), 3,31-3,27 (m, 3H), 2,62-2,55 (m, 2H), 2,50-2,42 (m, 3H), 2,40-2,22 (m, 5H), 1,23 (s a, 44H), 0,90 (s, 9H), 0,88-0,84 (m, 9H), 0,12 (s, 6H); EM (multimodal, pos.) $m/z = 1539$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5 EJEMPLO 22

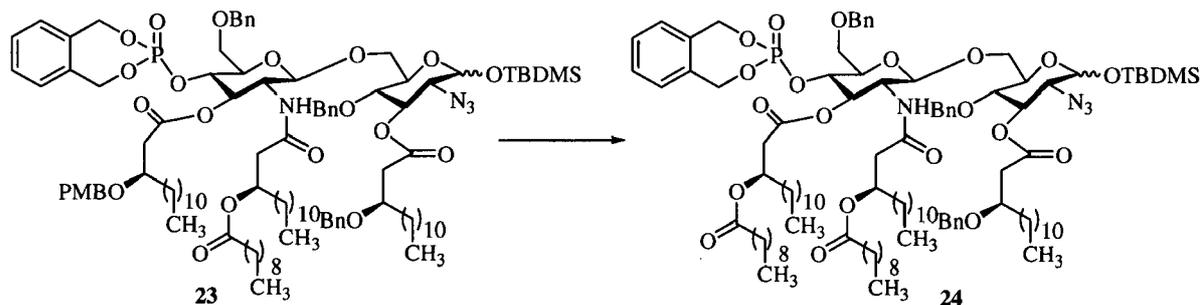
-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHIDRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(R)-3-DECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]-3-O-[(R)-3-(P-METOXI)BENCILOXITETRADECANOIL]- β -D-GLUCOPIRANOSIL]-2-AZIDO-4-O-BENCIL-3-O-[(R)-3-BENCILOXI-TETRADECANOIL]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (23)



Se aciló el compuesto 22 (1,25 g, 0,811 mmol) de manera similar a la síntesis del compuesto 19 (ejemplo 17) usando (DCC, 335 mg, 1,62 mmol), el lípido requerido (compuesto 34, ejemplo 32, 386 mg, 1,06 mmol) y N,N-dimetil-4-aminopiridina (50 mg, 0,41 mmol) para proporcionar 23 (440 mg, 29%) como un aceite incoloro. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,38-6,79 (m, 23H), 5,71 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 5,55 (t, $J = 9,5$ Hz, 1H), 5,06-4,85 (m, 9H), 4,66-4,45 (m, 12H), 3,97 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 3,90-3,69 (m, 9H), 3,60-3,55 (m, 3H), 3,37-3,29 (m, 2H), 2,65 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,61-2,55 (m, 1H), 2,48-2,42 (m, 1H), 2,35-2,21 (m, 3H), 2,11-2,05 (m, 1H), 1,62-1,59 (m, 8H), 1,27 (s a, 62H), 0,93 (s, 9H), 0,92-0,87 (m, 12H), 0,16 (s, 6H); EM (multimodal, pos.) $m/z = 1886$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

EJEMPLO 23

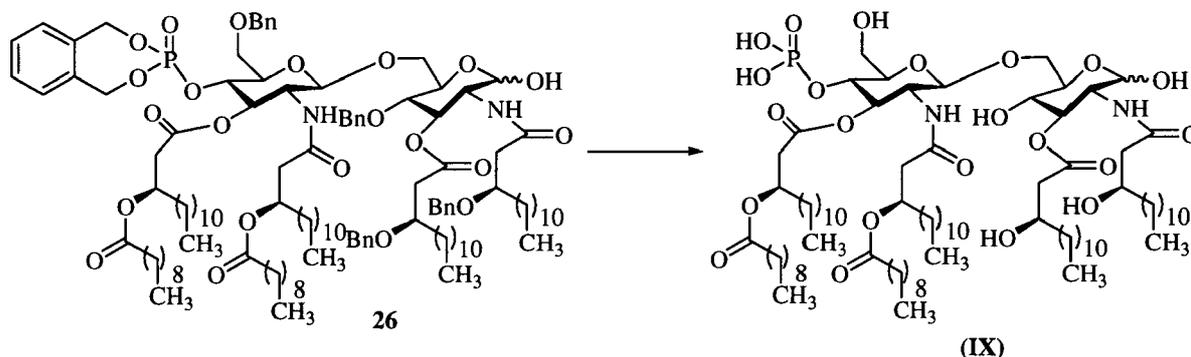
TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHIDRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(R)-3-DECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]-3-O-[(R)-3-DECANOILOXI-TETRADECANOIL]- β -D-GLUCOPIRANOSIL]-2-AZIDO-4-O-BENCIL-3-O-[(R)-3-BENCILOXI-TETRADECANOIL]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (24)



En primer lugar se desprotegió el compuesto 23 (446 mg, 0,236 mmol) usando DDQ (80 mg, 0,35 mmol) siguiendo el procedimiento para el producto intermedio 10 para el objetivo A. Luego se aciló este producto intermedio (343 mg, 0,194 mmol) de manera similar a la síntesis del compuesto 10 para el objetivo A usando cloruro de decanoilo (185 mg, 0,970 mmol) y piridina (123 mg, 1,55 mmol) para proporcionar 24 (343 mg, 76%) como un aceite incoloro. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,39-7,22 (m, 14H), 6,15 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 5,54 (t, $J = 9,5$ Hz, 1H), 5,28-5,24 (m, 1H), 5,14-4,96 (m, 8H), 4,60-4,45 (m, 10H), 3,99 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 3,90-3,85 (m, 1H), 3,80-3,65 (m, 4H), 3,55 (m, 3H), 3,46-3,39 (m, 1H), 3,32-3,27 (m, 1H), 2,66-2,53 (m, 3H), 2,46-2,41 (m, 1H), 2,35-2,18 (m, 7H), 1,61-1,51 (m, 10H), 1,26 (s a, 78H), 0,95 (s, 9H), 0,92-0,90 (m, 15H), 0,19 (s, 3H), 0,18 (s, 3H).

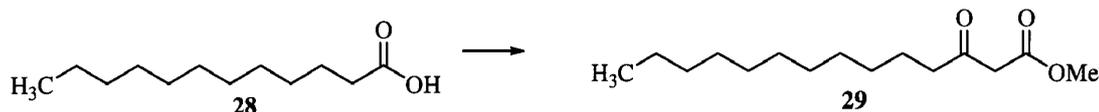
EJEMPLO 24

TERC-BUTILDIMETILSILIL-6-O-(6-O-BENCIL-2-DESOXI-4-O-(1,5-DIHIDRO-3-OXO-3 λ^5 -3H-2,4,3-BENZODIOXAFOSFEPIN-3-IL)-2-[(R)-3-DECANOILOXI-TETRADECANOILAMINO]-3-O-[(R)-3-DECANOILOXI-TETRADECANOIL]- β -D-GLUCOPIRANOSIL]-4-O-BENCIL-3-O-[(R)-3-BENCILOXITETRADECANOIL]-2-[(R)-3-BENCILOXI-TETRADECANOILAMINO]-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (25)

(FOSFONOXI)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-ILO) (IX)

Se disolvió el compuesto 26 (180 mg, 0,0858 mmol) en THF anhidro (15 ml). Se añadió negro de paladio (0,225 g) a la mezcla y se hidrogenó bajo una atmósfera de hidrógeno a 50 psi durante la noche. Se filtró la mezcla a través de un lecho de tierra de diatomeas. Se enfrió el filtrado hasta -40°C y se añadió una disolución de amoníaco en metanol (1,8 ml, 4 M). Se concentró la mezcla a vacío sin calentar. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de cloroformo/metanol/agua, 80:20:1 (v/v) para dar el compuesto (IX) deseado (102 mg, 73%). El análisis mediante CCF y ^1H -RMN mostró la presencia de grasa y una mancha débil que discurría próxima (CCF en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CMA}$, 4:1). Se sometió el residuo a cromatografía (columna Rediseq, 12 g, se eluyó con un gradiente de CH_2Cl_2 isocrático para 5 volúmenes de columna (VC), un gradiente hasta CMA al 25% a lo largo de 10 VC, isocrático para 10 VC, un gradiente hasta CMA al 100% a lo largo de 10 VC, isocrático para CMA al 100% para 10 VC, 20 ml/min) para dar el producto deseado (57 mg, 25%). El análisis mediante CCF de las fracciones combinadas y concentradas todavía indicó una cantidad muy pequeña de impureza que discurría justo por encima del producto deseado. Se purificó de nuevo el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (dos columnas Rediseq, 12 g en serie, mismo gradiente que anteriormente) para proporcionar 8,9 mg del producto deseado puro mediante CCF y 11,9 mg de producto ligeramente impuro después de disolverlo en metanol/agua/cloroformo y someterlo a liofilización. Rendimiento total (20,8 mg, 14%) como un sólido blanquecino. $R_f = 0,40$ CMA. ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,40-5,30 (s a, 2H), 4,10-4,00 (m, 4H), 3,70-3,60 (m, 4H), 2,83-2,76 (m, 1H), 2,75-2,20 (m, 13H), 2,10-1,90 (ancho, 9H), 1,40-1,00 (ancho, 106H), 0,90-0,70 (ancho, 18H). EM (multimodal, neg.) $m/z = 1632$ [M - H] $^-$.

EJEMPLO 27

3-OXOTETRADECANOATO DE METILO (29)

A una suspensión de etóxido de magnesio (10,82 g, 94,61 mmol) en 1,4-dioxano (100 ml) se le añadió hidrogenomalonato de metilo (25,0 g, 189 mmol) en 1,4-dioxano (100 ml). Se agitó la suspensión espesa resultante durante la noche. Se concentró la mezcla a vacío. En un matraz independiente, se disolvió ácido láurico (28, 20,85 g, 104,1 mmol) en 1,4-dioxano (50 ml) y se añadió una disolución de CDI (16,88 g, 104,1 mmol) en 1,4-dioxano (150 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la disolución resultante durante la noche. Luego se transfirió la mezcla al matraz con malonato de metilmagnesio. Se puso a reflujo la suspensión resultante durante la noche. Se concentró la mezcla a vacío. Se redisolvió el residuo en DCM (300 ml) y se filtró a través de una capa de sílice (10 g). Se evaporó el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (columna RediSep, 360 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 30%/hexanos a lo largo de 80 min, 100 ml/min) para proporcionar el producto 29 (17 g, 61%) como un sirope de color amarillo pálido.

EJEMPLO 28

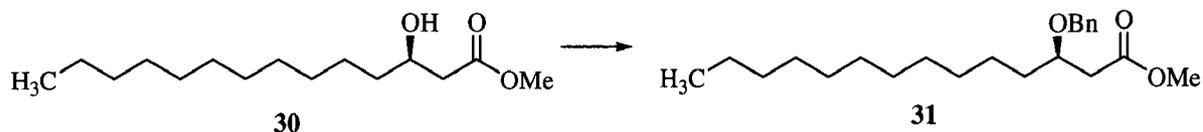
(R)-3-HIDROXITETRADECANOATO DE METILO (30)

Se purgó con N_2 una suspensión espesa de 3-oxotetradecanoato de metilo (29, 29,0 g, 113 mmol) en metanol (120 ml) en una camisa de vidrio de reactor de alta presión de 300 ml durante 10 minutos. Se añadió dicloro-*R*-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil-rutenio (897 mg, 1,10 mmol). Se puso la mezcla en un reactor compacto de la serie 5500 de Parr. Se cargó el reactor con H_2 (60 psi) y se ventiló 3 veces. Se cargó el reactor con H_2 (60 psi) y se agitó

(1200 rpm) y se calentó hasta 50°C durante 20 h. Se enfrió el reactor hasta temperatura ambiente, y se concentró a vacío la disolución de color naranja resultante. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 40%/hexanos a lo largo de 60 min, 85 ml/min) para proporcionar el producto 30 (28,5 g, rendimiento del 97%) como un sólido blanco.

5 EJEMPLO 29

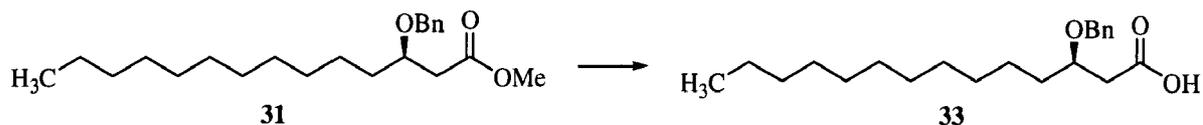
(R)-3-(BENCILOXI)TETRADECANOATO DE METILO (31)



A una disolución del compuesto 30 (2,8 g, 10,83 mmol) y tricloroacetimidato de bencilo (3,4 g, 14 mmol) en DCM (100 ml) se le añadió ácido trifluorometanosulfónico (0,24 ml, 2,7 mmol) gota a gota a 0°C. Se agitó la mezcla resultante a 0°C durante 6 h y se calentó hasta temperatura ambiente. Se lavó la mezcla con una disolución saturada de NaHCO₃ (300 ml) y agua (300 ml) y se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄. Se retiró el agente de secado por filtración, y se eliminaron los disolventes usando un evaporador rotatorio. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna Redisepp, 80 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 30%/hexanos a lo largo de 60 min, 60 ml/min) para dar el producto 31 (1,2 g, 32%) como un líquido incoloro. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,30-7,05 (m, 5H), 4,51 (s, 2H), 3,90-3,80 (m, 1H), 3,70 (s, 3H), 2,58-2,45 (m, 2H), 1,80-1,60 (m, 2H), 1,50-1,20 (m, 18H), 0,85 (t, J = 5,8 Hz, 3H).

EJEMPLO 30

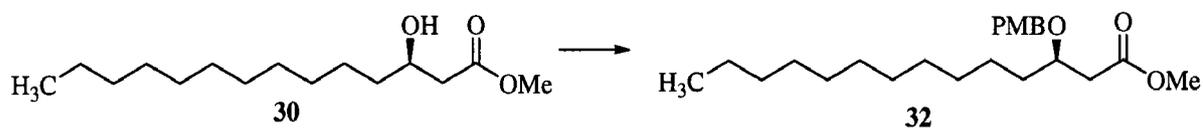
ÁCIDO (R)-3-(BENCILOXI)TETRADECANOICO (33)



Se disolvió el éster 31 (1,3 g, 3,73 mmol) en una mezcla de THF/MeOH/CH₃CN (v/v/v, 1/1/1, 90 ml). Se añadió hidróxido de litio monohidratado (235 mg, 5,6 mmol) como una disolución en agua (30 ml), y se agitó la mezcla durante la noche. Se redujo a vacío la cantidad de disolvente hasta aproximadamente 30 ml. A la disolución acuosa restante se le añadió ácido clorhídrico 1 M para reducir el pH hasta 3. Se extrajo la fase acuosa con dietil éter (3 x 40 ml). Se secaron los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio. Se retiró el agente de secado por filtración, y se eliminaron los disolventes usando un evaporador rotatorio. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna Redisepp, 40 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 50%/hexanos a lo largo de 40 min, 40 ml/min) para dar el producto 33 (990 mg, 79%) como un líquido incoloro. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,30-7,05 (m, 5H), 4,51 (s, 2H), 3,90-3,80 (m, 1H), 2,58-2,45 (m, 2H), 1,80-1,60 (m, 2H), 1,50-1,20 (m, 18H), 0,85 (t, J = 5,8 Hz, 3H).

30 EJEMPLO 31

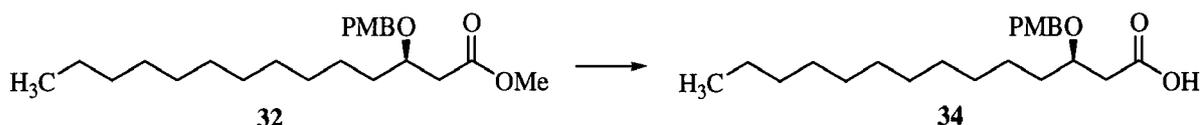
(R)-3-(4-METOXIBENCILOXI)TETRADECANOATO DE METILO (32)



A una disolución del compuesto 30 (3,50 g, 12,9 mmol) y tricloroacetimidato de 4-metoxibencilo (4,65 g, 17,3 mmol) en DCM (100 ml) se le añadió ácido canforsulfónico (450 mg, 1,92 mmol). Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Se lavó la mezcla con una disolución saturada de NaHCO₃ (300 ml) y agua (300 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. Se retiró el agente de secado por filtración y se eliminaron los disolventes usando un evaporador rotatorio. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 30%/hexanos a lo largo de 70 min, 85 ml/min) para dar el producto 32 (4,01 g, 81%) como un líquido incoloro.

40 EJEMPLO 32

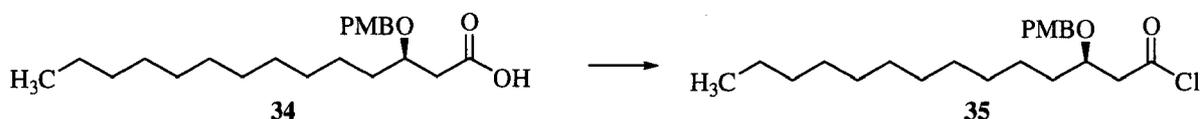
ÁCIDO (R)-3-(4-METOXIBENCILOXI)TETRADECANOICO (34)



Se disolvió el éster 32 (4,01 g, 10,4 mmol) en una mezcla de THF/MeOH/CH₃CN (v/v/v, 1/1/1, 90 ml). Se añadió hidróxido de litio monohidratado (874 mg, 20,8 mmol) como una disolución en agua (30 ml), y se agitó la mezcla durante la noche. Se redujo a vacío la cantidad de disolvente hasta aproximadamente 30 ml. A la disolución acuosa restante se le añadió ácido clorhídrico (1 M) para reducir el pH hasta 3. Se extrajo la fase acuosa con dietil éter (3 x 40 ml). Se secaron los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio. Se retiró el agente de secado por filtración y se eliminaron los disolventes usando un evaporador rotatorio. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 50%/hexanos a lo largo de 60 min, 85 ml/min) para dar el producto 34 (3,37 g, 89%) como un líquido incoloro. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,22 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 6,82 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 4,46 (s, 2H), 3,81 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,65-2,49 (m, 2H), 1,80-1,60 (m, 2H), 1,50-1,20 (m, 18 H), 0,85 (t, *J* = 5,8 Hz, 3H).

EJEMPLO 33

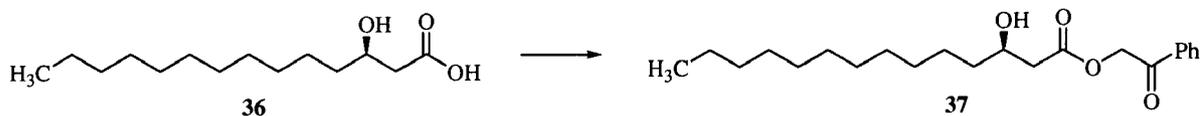
CLORURO DE (R)-3-(4-METOXIBENCILOXI)TETRADECANOÍLO (35)



A una disolución del ácido 34 (500 mg, 1,37 mmol) en DCM (5 ml) se le añadió dimetilformamida (DMF) (100 mg, 1,37 mmol), y se enfrió la mezcla resultante hasta -10°C. Se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (174 mg, 1,37 mmol) en DCM (5 ml). Se permitió que se calentase la disolución hasta temperatura ambiente a lo largo de 1 h. Después, el análisis mediante CCF no mostró ácido presente, se concentró la mezcla a vacío y se usó sin purificación adicional.

EJEMPLO 34

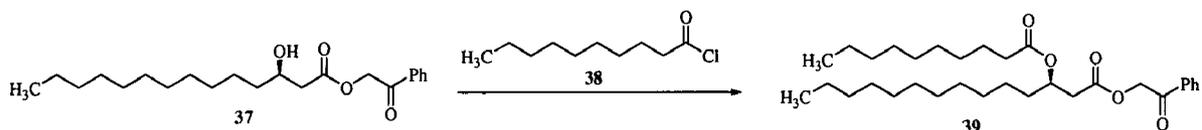
3-HIDROXITETRADECANOATO DE (R)-2-OXO-2-FENILETILO (37)



A una disolución de ácido (R)-3-hidroxitetradecanoico (36, véase la preparación a continuación) (9,55 g, 39,1 mmol) y trietilamina (5,90 g, 58,6 mmol) en acetato de etilo (500 ml) se le añadió 2-bromoacetofenona (7,90 g, 39,1 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 14 h. Se retiró el precipitado por filtración, y se concentró el filtrado a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 30%/hexanos a lo largo de 50 min, 85 ml/min) para dar el producto 37 (10,2 g, rendimiento del 72%) como un sólido blanco.

EJEMPLO 35

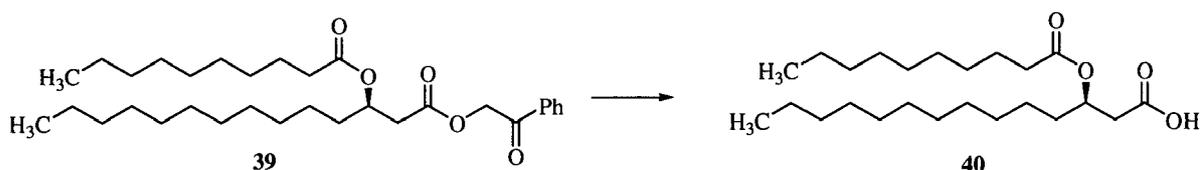
3-DECANOILOXITETRADECANOATO DE (R)-2-OXO-2-FENILETILO (39)



A una disolución de 37 (4,80 g, 13,2 mmol) y piridina (2,10 g, 26,5 mmol) en DCM (100 ml) a 0°C se le añadió cloruro de decanoílo (38, 2,8 g, 4,8 mmol). Se agitó la mezcla durante 14 h permitiendo que se elevase la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente. Se lavó la mezcla con una disolución saturada de NaHCO₃ (100 ml) y salmuera (100 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. Se retiró el agente de secado por filtración y se eliminaron los disolventes usando un evaporador rotatorio. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 40%/hexanos a lo largo de 50 min, 85 ml/min) para dar el producto 39 (6,68 g, 97%) como un líquido incoloro.

EJEMPLO 36

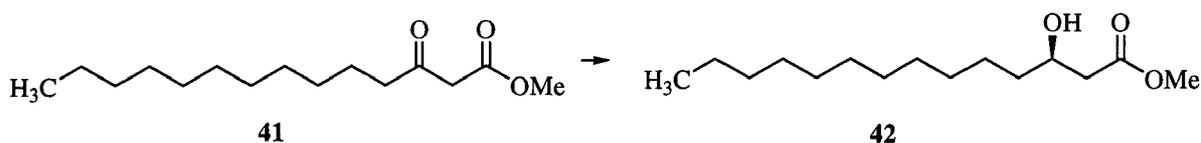
ÁCIDO (R)-3-(DECANOILOXI)TETRADECANOICO (40)



Se disolvió el éster 39 (10,15 g, 20,77 mmol) en ácido acético (100 ml). Se añadió zinc (15,5 g, 237 mmol), y se calentó la mezcla hasta reflujo durante 4 h. Se eliminó el ácido acético a vacío y se sometió el residuo a destilación azeotrópica con tolueno hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (columna RediSep, 120 g, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 60%/hexanos a lo largo de 50 min, 85 ml/min) para dar el producto 40 (7,2 g, 89%) como un líquido incoloro. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 5,23-5,19 (m, 1H), 2,62-2,55 (m, 2H), 2,34-2,25 (m, 2H), 1,65-1,58 (m, 2H), 1,28-1,20 (m, 32H), 0,85 (m, 6H).

EJEMPLO 37

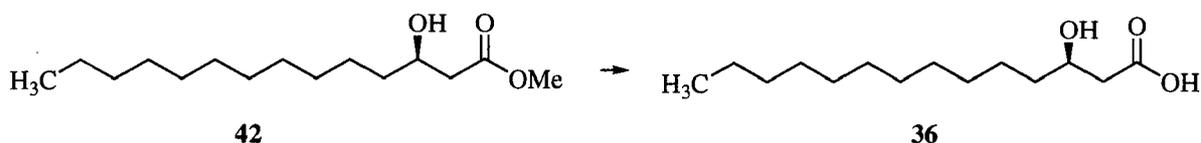
(R)-3-HIDROXITETRADECANOATO DE METILO (39)



Se purgó con N_2 una suspensión espesa de 3-oxotetradecanoato de metilo (41, 5,27 g, 20,6 mmol) en metanol (30 ml) en una camisa de vidrio de reactor de alta presión de 300 ml durante 10 minutos. Se añadió dicloro-*R*-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil-rutenio (142 mg, 1,1 mmol) y se puso la mezcla en un reactor compacto de la serie 5500 de Parr. Se cargó el reactor con H_2 (60 psi) y se ventiló tres veces. Luego se cargó el reactor con una porción final de H_2 (60 psi), se agitó (600 rpm) y se calentó hasta 50°C durante 20 h. Luego se enfrió el reactor hasta temperatura ambiente y se concentró la mezcla a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 50%/hexanos para proporcionar 42 (3,97 g, 74%) como un sólido blanquecino. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 4,00-3,98 (m, 1H), 3,71 (s, 3H), 2,82 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H), 2,62-2,30 (m, 2H), 1,54-1,39 (m, 3H), 1,27 (s a, 17H), (m, 20H), 0,86 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H).

EJEMPLO 38

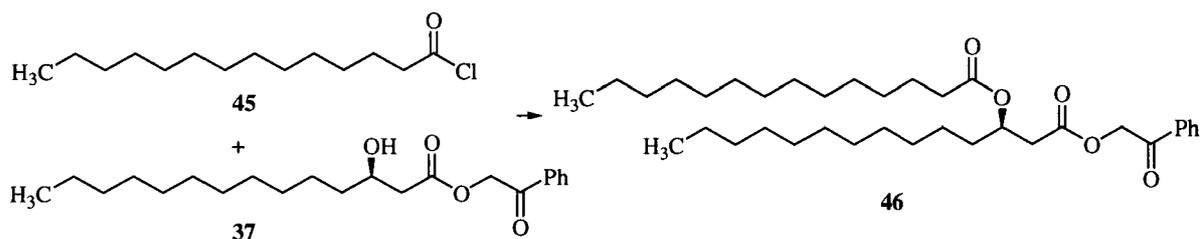
ÁCIDO (R)-3-HIDROXITETRADECANOICO (36)



Se añadió hidróxido de litio monohidratado (1,98 g, 47,2 mmol) a una disolución de (*R*)-3-hidroxitetradecanoato de metilo (42, 8,17 g, 31,5 mmol) en THF (66 ml) y agua (66 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Luego se diluyó la mezcla con dietil éter (1 l) y se ajustó el pH a ~ 3 con una disolución de ácido clorhídrico (1 N). Luego se extrajo la disolución con dietil éter (200 ml), y se combinaron las fracciones orgánicas y se secaron sobre Na_2SO_4 . Se retiró el Na_2SO_4 por filtración y se concentró el filtrado a vacío para proporcionar el ácido (*R*)-3-hidroxitetradecanoico (36, 7,59 g, 98%) como un sólido blanquecino. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 3,99-3,94 (m, 1 H), 2,45-2,39 (m, 2H), 1,47 (s a, 3H), 1,29 (s a, 17H), 0,89 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H).

EJEMPLO 39

3-TETRADECANOILOXITETRADECANOATO DE (R)-2-OXO-2-FENILETILO (46)

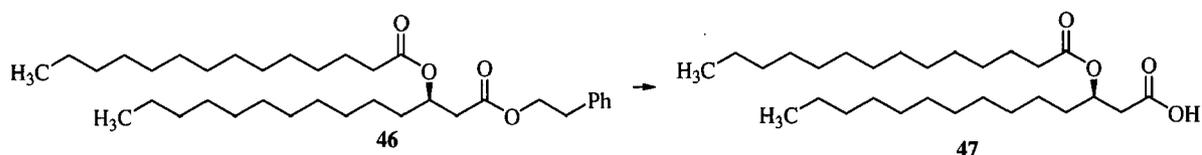


Se añadió cloruro de miristoílo (45, 8,83 g, 35,8 mmol) a una disolución de 3-hidroxitetradecanoato de (*R*)-2-oxo-2-feniletilo (37, preparado según el ejemplo 34, 10,8 g, 29,8 mmol) en piridina (40 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 14 h. Luego se concentró la mezcla a vacío, y se eliminó la piridina residual

disolviendo el residuo en tolueno (100 ml) y concentrando a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 20%/hexanos, para proporcionar 46 (16,31 g, 83%) como un aceite incoloro. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 7,90 (m, 2H), 7,64-7,57 (m, 1H), 7,50-7,45 (m, 2H), 5,33 (s, 2H), 5,31-5,27 (m, 1H), 2,80-2,70 (m, 2H), 2,33-2,26 (t, $J = 4,5$ Hz, 2H), 1,65-1,58 (m, 2H), 1,31-1,21 (m, 40H), 0,85 (t, $J = 10,0$ Hz, 6H).

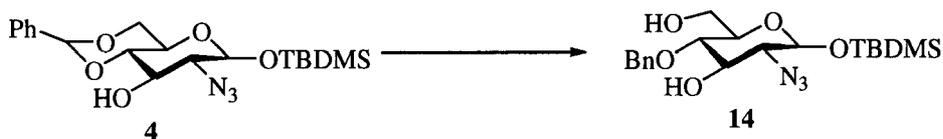
EJEMPLO 40

ÁCIDO (R)-3-(TETRADECANOILOXI)TETRADECANOICO (47)



Se añadió polvo fino de zinc (24,42 g, 373,3 mmol) a una disolución de 46 (16,28 g, 28,42 mmol) en ácido acético (150 ml). Luego se calentó la mezcla hasta reflujo (115°C) durante 3 h. Luego se concentró la mezcla a vacío, y se eliminó la piridina residual disolviendo el residuo en tolueno (100 ml) y concentrando a vacío. Se sometió el residuo resultante a cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo a del 0% al 30%/hexanos para proporcionar ácido (R)-bencil-3-(tetradecanoiloxi)tetradecanoico (47, 11,14 g, rendimiento del 86%) como un aceite incoloro. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 5,29-5,18 (m, 1H), 2,62-2,55 (m, 2H), 2,34-2,25 (m, 2H), 1,65-1,58 (m, 3H), 1,28-1,20 (m, 40H), 0,85 (m, 6H).

EJEMPLO 41

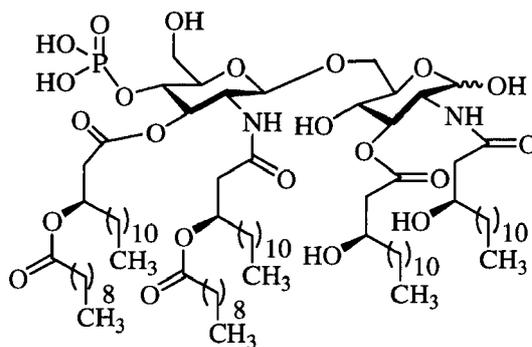
TERC-BUTILDIMETILSILIL-2-AZIDO-4-O-BENCIL-2-DESOXI- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO (47)

Se disolvió el compuesto 4 (preparado según el ejemplo 3, 1,32 g, 3,36 mmol) en una disolución de BH_3 (1 M) en THF (18,1 ml, 18,1 mmol). Después de agitarse la mezcla a 0°C durante 5 min, se añadió gota a gota triflato de dibutilboro (1 M en DCM, 3,62 ml, 3,62 mmol), y se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante otra hora. Posteriormente, se añadieron trietilamina (0,5 ml) y metanol (~0,5 ml) hasta que hubo cesado el desprendimiento de gas H_2 . Se evaporaron los disolventes a vacío, y se evaporó el residuo conjuntamente con metanol (3 x 50 ml). Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexanos/acetato de etilo, 8:1 (v/v)) para dar 14 (0,67 g, 49%) como un aceite incoloro. $R_f = 0,40$ (hexanos/acetato de etilo, 3:1 (v/v)). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,32-7,31 (m, 5H), 4,81 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), 4,70 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), 4,55 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,70 (dd, 1H, $J = 12,0, 1,5$ Hz, 1H), 3,49-3,43 (m, 2H), 3,33 (s a, 1H), 3,22-3,17 (m, 1H), 0,92 (s, 9H), 0,14 (s, 6H).

EJEMPLO 42

INDUCCIÓN DE RESPUESTA INMUNITARIA DE TIPO TH1 *IN VIVO*

Este ejemplo demuestra la actividad inmunostimulante de tipo Th1 *in vivo* para un compuesto de GLA ilustrativo de la invención que tiene la siguiente estructura (IX):



IX

Se usó el compuesto IX en una vacuna que contenía un polipéptido antigénico de *Mycobacterium tuberculosis*

denominado ID83. Se emplearon metodologías y reactivos inmunológicos convencionales (Current Protocols in Immunology, Coligan *et al.* (eds.) 2006 John Wiley & Sons, NY). Se inmunizaron ratones (cuatro animales C57BL/6 por grupo) tres veces a intervalos de tres semanas con el antígeno ID83 (8 µg por animal para cada inmunización) en agua, el antígeno ID83 (8 µg por animal para cada inmunización) formulado en un vehículo de emulsión estable, o el antígeno ID83 (8 µg por animal para cada inmunización) formulado en una emulsión estable que contiene (i) GLA-SE (10 µg por animal para cada inmunización) o (ii) compuesto IX (10 µg por animal para cada inmunización).

Una semana después de cada inyección, se extrajo sangre de los ratones para evaluar respuestas de anticuerpos (IgG1 e IgG2c) específicos de antígeno. Tres semanas después de la última inmunización, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los bazo para analizar las respuestas de citocina IFN-γ dependientes de células T para la estimulación con antígeno *in vitro* mediante ELISPOT según métodos publicados (*id.*). Las respuestas de citocina IFN-γ se han asociado con un fenotipo protector TH1 frente a la infección por *M. tuberculosis*.

La figura 1 muestra datos de ELISPOT de la producción de citocina IFN-γ anti-ID83 inducida en ratones tres semanas después de la tercera inmunización usando el antígeno ID83 y antígenos componentes de ID83 (Rv2608, Rv1813 y Rv3620) formulados con una emulsión estable (SE) de 10 µg de compuesto IX, en comparación con ID83 formulado en GLA-SE, SE o agua. Se muestran las medias y el E.E.M. de células secretoras de IFN-γ por millón de esplenocitos en cada grupo. "GLA-SE", tal como se usa en los ejemplos del presente documento se refiere a una emulsión estable de un compuesto tal como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 20080131466 de titularidad conjunta con la presente, en el que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo lineal C₁₁; y R² y R⁴ son alquilo lineal C₁₃.

Todos los animales respondieron de manera equivalente a ConA, un potente mitógeno y activador celular. La vacunación con ID83 + compuesto IX indujo respuestas de citocinas específicas del antígeno robustas, mientras que se observaron pocas o ninguna de tales respuestas en los grupos de control de ID83 + agua o ID83 + SE. Se produjeron niveles similares de células secretoras de IFN-γ en esplenocitos purificados a partir de ratones inmunizados con ID83 + compuesto IX o ID83 + GLA-SE tras una nueva estimulación con los antígenos componentes de ID83, Rv2608, Rv1813 y Rv3620.

En conclusión, el compuesto IX en una formulación en aceite estable con el candidato a antígeno de vacuna frente a *M. tuberculosis*, ID83, indujo respuestas inmunitarias específicas de antígeno predominantemente del tipo celular (células T) asociadas con el fenotipo protector TH1.

EJEMPLO 43

INDUCCIÓN DE RESPUESTAS INMUNITARIAS DE TIPO TH1 Y TH₂ IN VIVO

Este ejemplo demuestra la actividad inmunoestimulante de tipo Th1 y Th2 *in vivo* del compuesto IX en una vacuna que contiene un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* denominado ID83. Se emplearon metodologías y reactivos inmunológicos convencionales (Current Protocols in Immunology, Coligan *et al.* (Eds.) 2006 John Wiley & Sons, NY).

Se inmunizaron ratones (cuatro animales C57BL/6 por grupo) tres veces a intervalos de tres semanas con el antígeno ID83 (8 µg por animal para cada inmunización) usado solo o formulado en una emulsión estable que contiene el compuesto IX (10 µg por animal para cada inmunización). Se recogieron los sueros extrayendo sangre a los animales una semana después de cada inmunización, y se examinaron los niveles en suero de los anticuerpos IgG1 e IgG2c específicos para ID83 mediante ELISA según métodos publicados (*id.*) El predominio del isotipo de anticuerpo o bien IgG1 de o bien IgG2c se asocia con respuestas de tipo TH2 o TH1, respectivamente. Se ha demostrado que es necesaria una respuesta de tipo TH1 para la protección frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

Tal como se muestra en la figura 2, la vacunación con ID83 en agua indujo anticuerpo IgG1 específico de antígeno predominantemente. En cambio, la vacunación con ID83 + SE, ID83 + compuesto IX-SE o ID83 + GLA-SE indujo mayores títulos de anticuerpos IgG2c, y convirtió el fenotipo en una respuesta de anticuerpos específicos de antígeno IgG1:IgG2c mixto.

EJEMPLO 44

INDUCCIÓN DE INMUNOESTIMULACIÓN DEPENDIENTE DE TLR4 EN CÉLULAS HUMANAS

Este ejemplo demuestra la actividad inmunoestimuladora del compuesto IX en células humanas. Se sometió a prueba el compuesto IX *in vitro* usando células HEK 293 (InvivoGen) con vectores de expresión que codifican para 1) TLR4, MD-2 y CD14, o 2) TLR2 y TLR6 para definir la actividad del compuesto y la dependencia de TLR4, y para excluir la activación de TLR2. Se transfectaron de manera estable además estas líneas celulares HEK 293 con el vector indicador de NF-κB, pNifty-2 de tal manera que se secreta fosfatasa alcalina en los medios de crecimiento con la activación de la ruta de señalización de TLR. Se sembraron las líneas celulares transfectadas a 5x10⁴ células por pocillo en placas de 96 pocillos y se estimularon durante 16-24 horas cultivadas en medio que contiene diluciones en

5 serie del compuesto IX y otros adyuvantes. Se midió la actividad fosfatasa alcalina secretada en los medios de cultivo usando el ensayo QUANTIBLue® (InvivoGen). Se midieron los datos como potenciación de NF-κB por encima del control negativo de PBS. Usando este ensayo, el compuesto IX mostró una potenciación de NF-κB de más de dos veces a concentraciones de tan sólo 0,1 µg/ml (figura 3). Los resultados de estos experimentos demostraron una clara actividad agonista de TLR4 para el compuesto IX que no pareció estar asociada con la inducción de TLR2. Se diseñó el compuesto IX basándose en consideraciones estructurales de la estructura atómica notificada de MD2 y TLR4. Como tal, el hecho de que se une y produce un perfil que es similar al de un agonista de TLR4 aprobado comercialmente (MPL®) es un resultado sorprendente e inesperado. Más específicamente, el perfil para el compuesto IX alcanza ventajosamente una meseta rápidamente a medida que se aumentan las concentraciones, antes de lo que se esperaría que se elevaran los niveles de citocina hasta un punto en el que pueden ejercerse efectos secundarios negativos por sí mismos. Por tanto, se espera que el compuesto IX y otros compuestos ilustrativos de la invención puedan administrarse de manera segura en un amplio intervalo de concentraciones, lo que se desea enormemente en el contexto de la reproducibilidad de los desenlaces clínicos entre pacientes y para la seguridad al variar la dosis para adultos y niños. A este respecto, la menor actividad frente a citocina para el compuesto IX es un resultado sorprendente y deseado que facilitará adicionalmente su uso seguro en formulaciones clínicas.

EJEMPLO 45

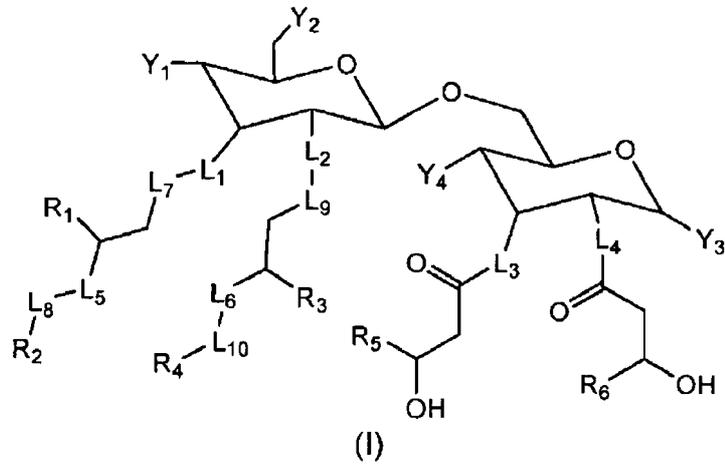
INDUCCIÓN DE CITOCINAS INMUNOESTIMULADORAS EN CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS

20 En este ejemplo, se estimularon células de sangre completa humanas con el compuesto IX y se realizaron ensayos ELISA para detectar la inducción de citocinas inmunoestimuladoras. Se realizaron diluciones en serie (1:5) del compuesto IX y otros adyuvantes con solución salina tamponada con fosfato en una placa de 96 pocillos para un total de 7 diluciones. Se mezclaron 100 µl de sangre humana recién extraída de dos donantes diferentes y se incubaron con 100 µl de diluciones de adyuvante. Tras una incubación durante 20 horas, se centrifugaron las placas y se recogieron los sobrenadantes (~70 µl), evitando los glóbulos rojos, y se almacenaron a -20°C antes de realizar ELISA de MIP-1-α y TNF-α usando procedimientos bioquímicos convencionales. Los resultados de estos experimentos confirmaron adicionalmente que el compuesto IX tiene actividad inmunoestimuladora en células sanguíneas humanas primarias (figura 4). Adicionalmente, estos resultados de donantes primarios imitaron los resultados observados en líneas celulares humanas y extendieron estos importantes hallazgos en relación con los posibles intervalos de dosis y perfiles de seguridad para este compuesto.

30 A partir de lo anterior se apreciará que, aunque se han descrito en el presente documento realizaciones específicas de la invención con fines de ilustración, pueden realizarse diversas modificaciones. Por consiguiente, la invención no está limitada excepto según las reivindicaciones adjuntas.

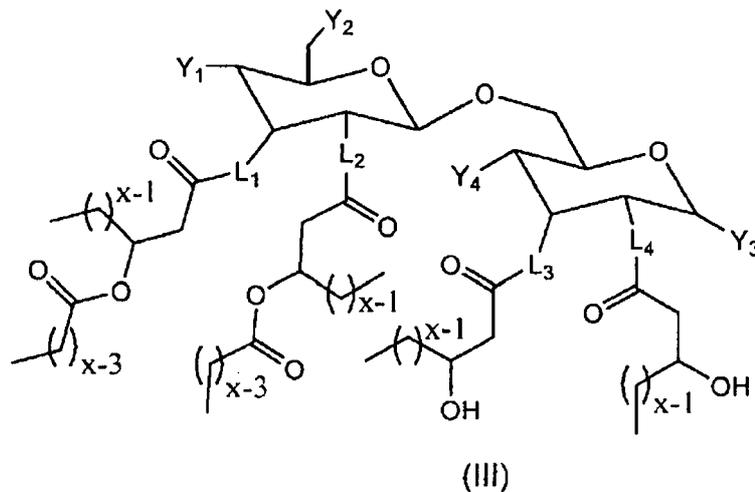
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de GLA que tiene la siguiente estructura (I):

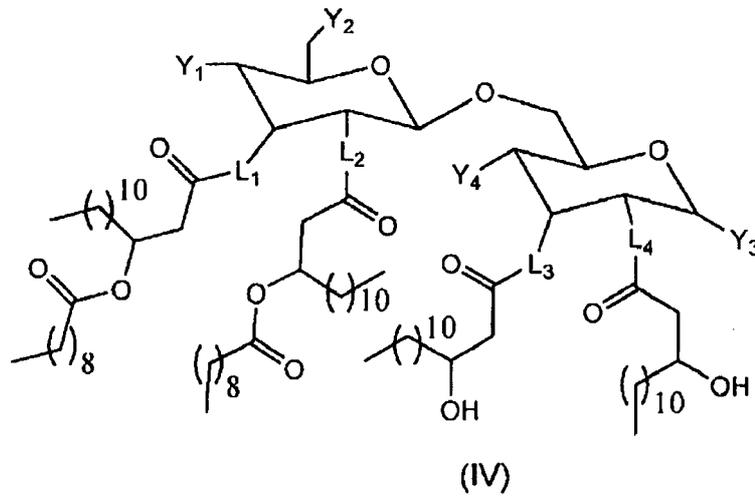


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

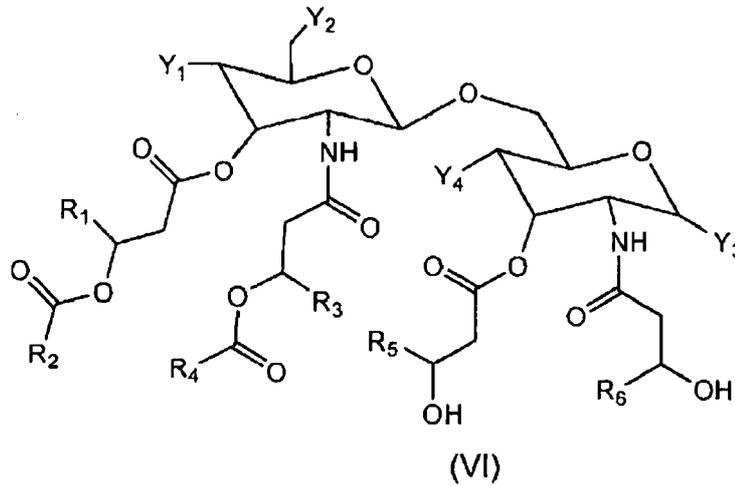
- 5 L₁, L₂, L₃ y L₄ son iguales o diferentes e independientemente -O-, -NH- o -(CH₂)_n;
- L₅ y L₆ son -O-;
- L₇, L₈, L₉ y L₁₀ son -C(=O)-;
- Y₁ es -OP(=O)(OH)₂;
- Y₂, Y₃ e Y₄ son cada uno -OH;
- 10 R₁, R₃, R₅ y R₆ son iguales o diferentes e independientemente alquilo C₈₋₁₃; y
- R₂ y R₄ son iguales o diferentes e independientemente alquilo C₆₋₁₁.
2. Compuesto de GLA según la reivindicación 1, en el que R₁, R₃, R₅ y R₆ son cada uno alquilo C_x, en el que x es constante y se selecciona de un número entero de 8-13, y R₂ y R₄ son ambos alquilo C_{x-2}, y el compuesto de GLA tiene la siguiente fórmula (III):



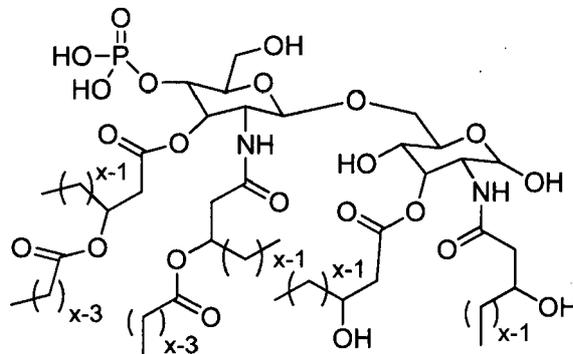
- 15 3. Compuesto de GLA según la reivindicación 2, en el que x se selecciona de un número entero de 10-12.
4. Compuesto de GLA según la reivindicación 3, en el que x es 11, y el compuesto de GLA tiene la siguiente estructura (IV):



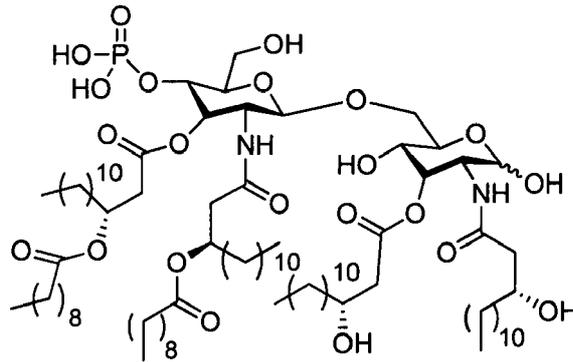
5. Compuesto de GLA según la reivindicación 1, en el que L₁ y L₃ son ambos -O- y L₂ y L₄ son ambos -NH-, y el compuesto de GLA tiene la siguiente fórmula (VI):



- 5 6. Compuesto de GLA según la reivindicación 1, en el que Y₁ es -OP(O)(OH)₂, Y₂, Y₃ e Y₄ son cada uno -OH, L₁ y L₃ son ambos -O-, L₂ y L₄ son ambos -NH-, R₁, R₃, R₅ y R₆ cada uno son alquilo C_x en el que x es constante y se selecciona de un número entero de 8-13, y R₂ y R₄ son ambos alquilo C_{x-2}, y el compuesto de GLA tiene la siguiente fórmula (VIII):



- 10 7. Compuesto de GLA según la reivindicación 6, en el que x es 11, y el compuesto de GLA tiene la siguiente estructura (IX):



8. Composición de vacuna que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en combinación con un antígeno o un vector de expresión recombinante que codifica para un antígeno.
- 5 9. Composición de vacuna según la reivindicación 8, en la que el constructo de expresión recombinante es un vector viral.
10. Composición de vacuna según la reivindicación 9, en la que el vector viral se selecciona del grupo que consiste en un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado, un vector de herpesvirus, un vector de lentivirus, un vector de poxvirus y un vector de retrovirus.
- 10 11. Composición de vacuna según la reivindicación 8, para su uso en la producción o potenciación de una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto.
12. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, para estimular una respuesta inmunitaria inespecífica en un sujeto.

15

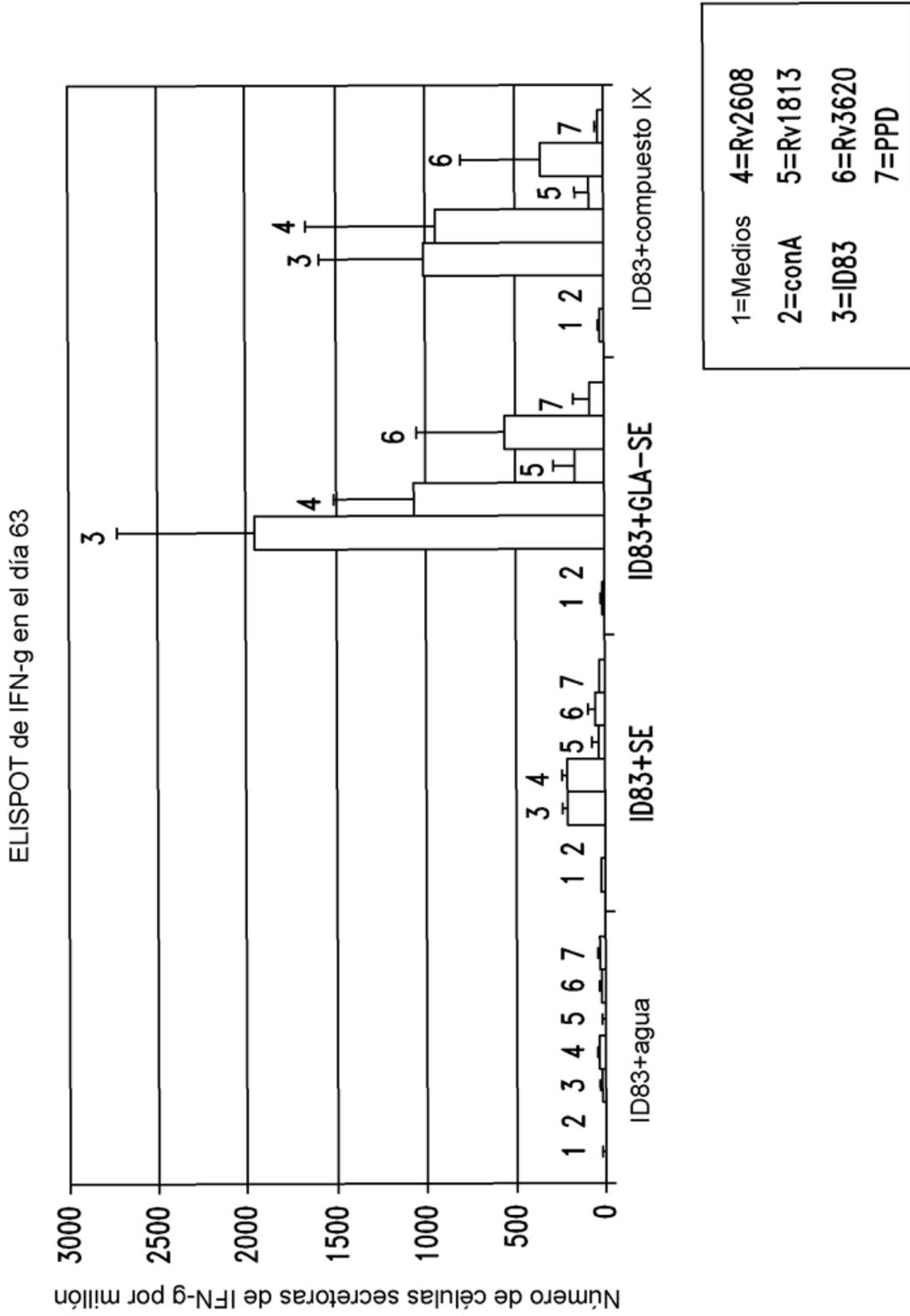


FIG. 1

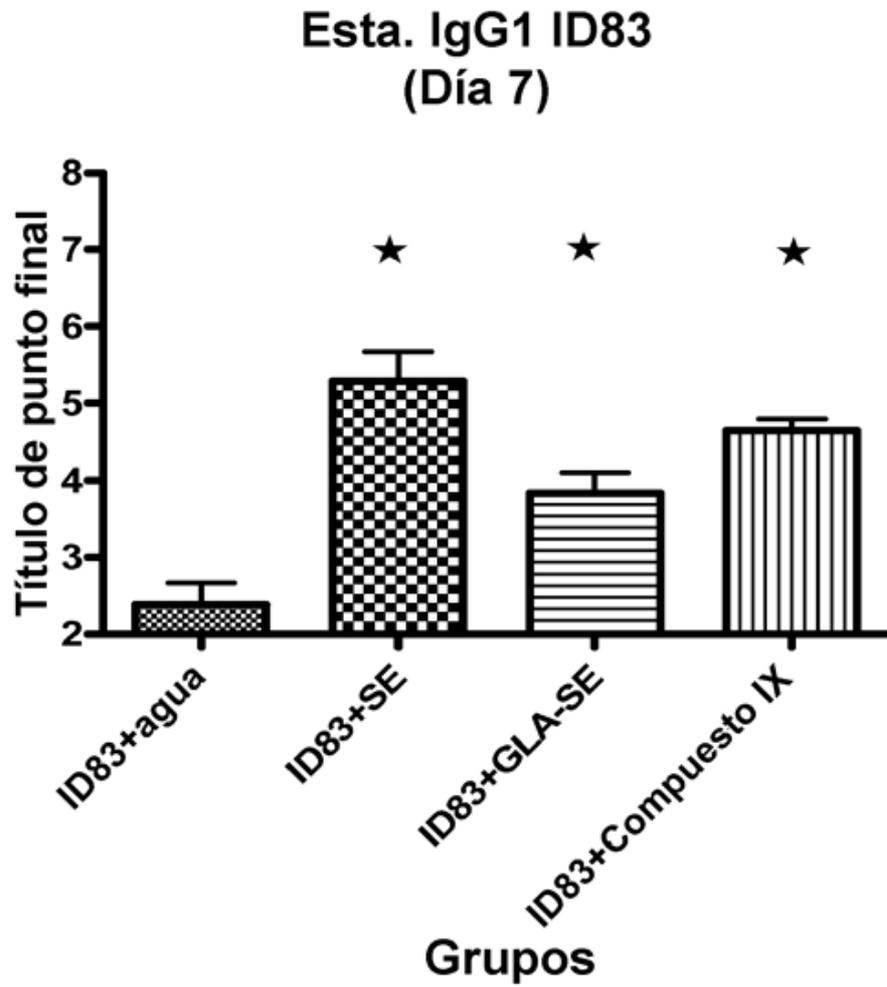


FIG. 2A

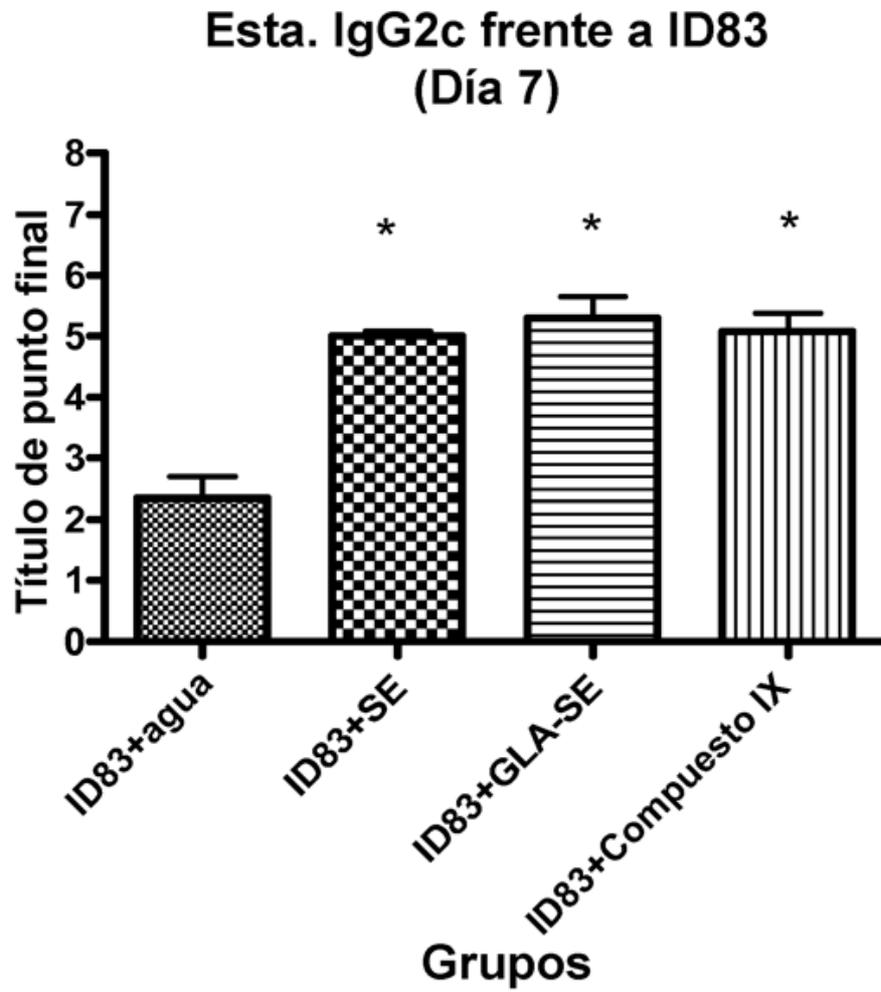


FIG. 2B

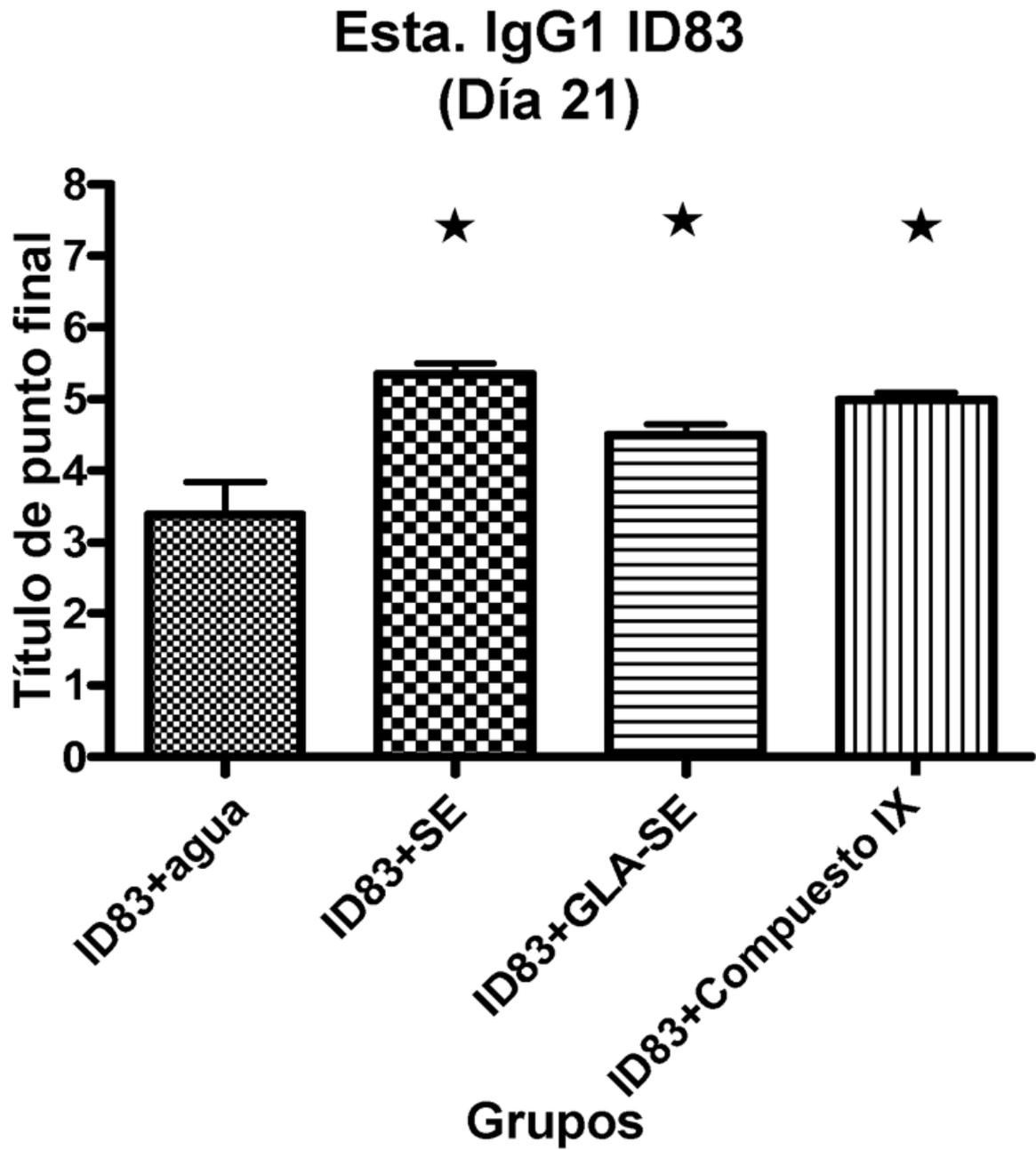


FIG. 2C

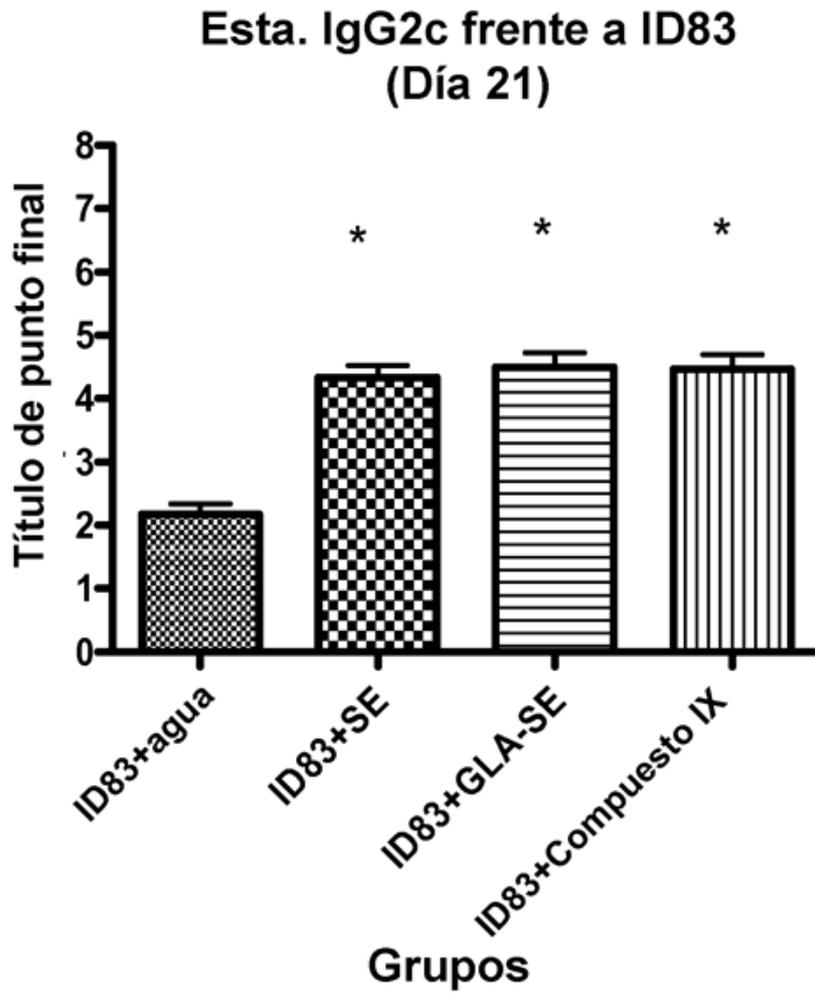


FIG. 2D

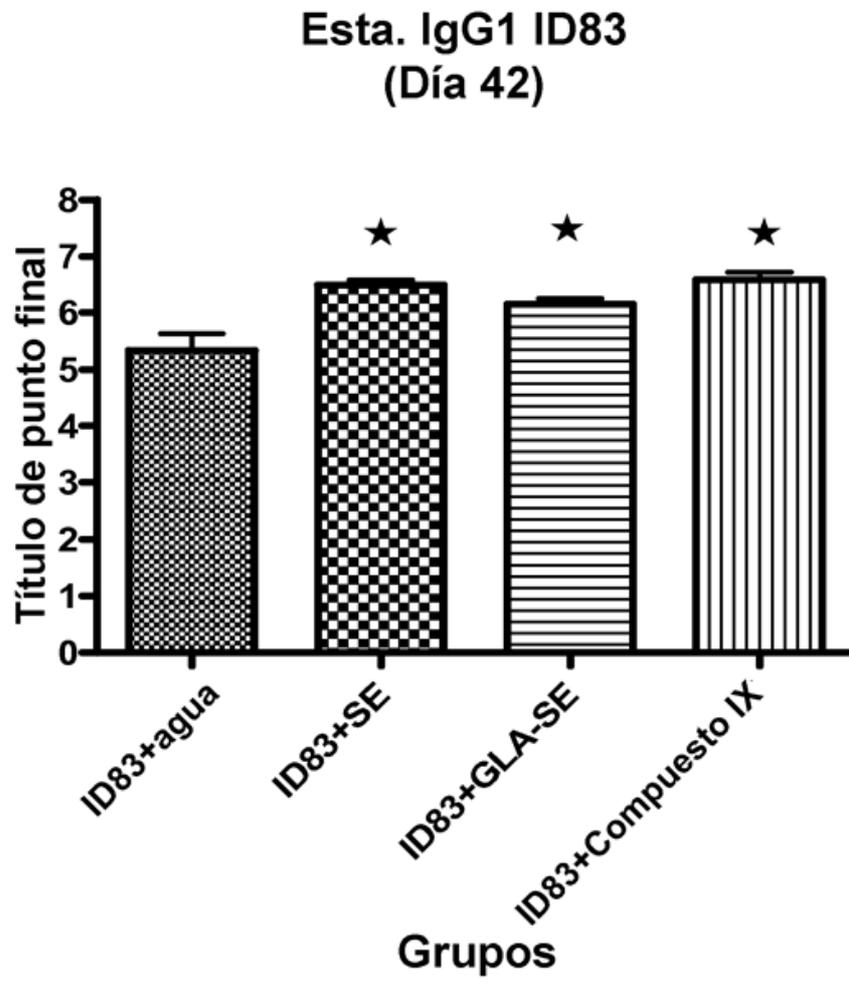


FIG. 2E

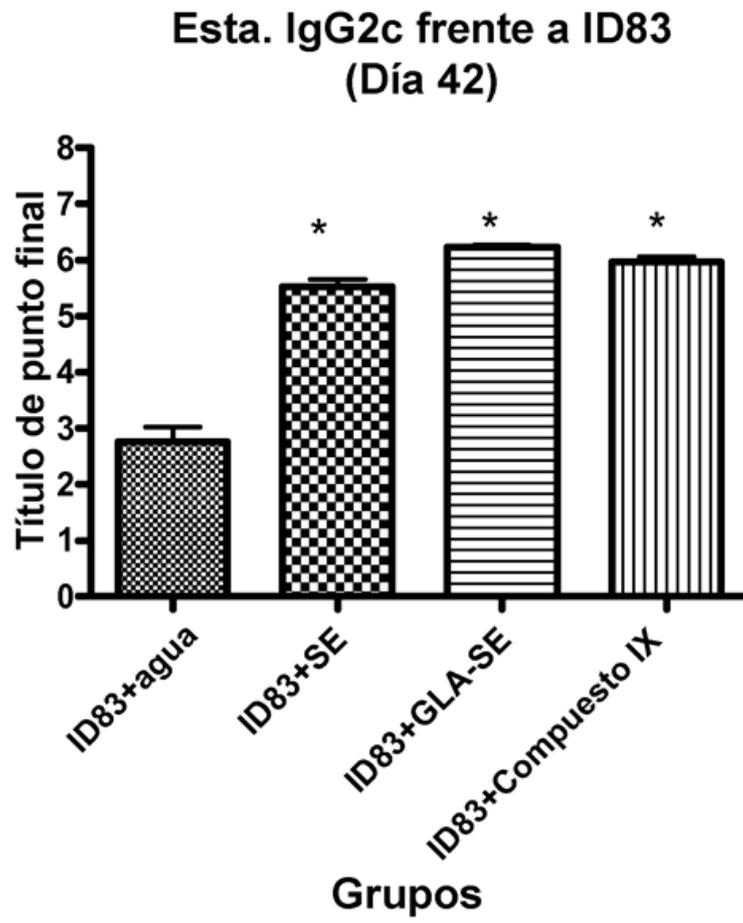


FIG. 2F

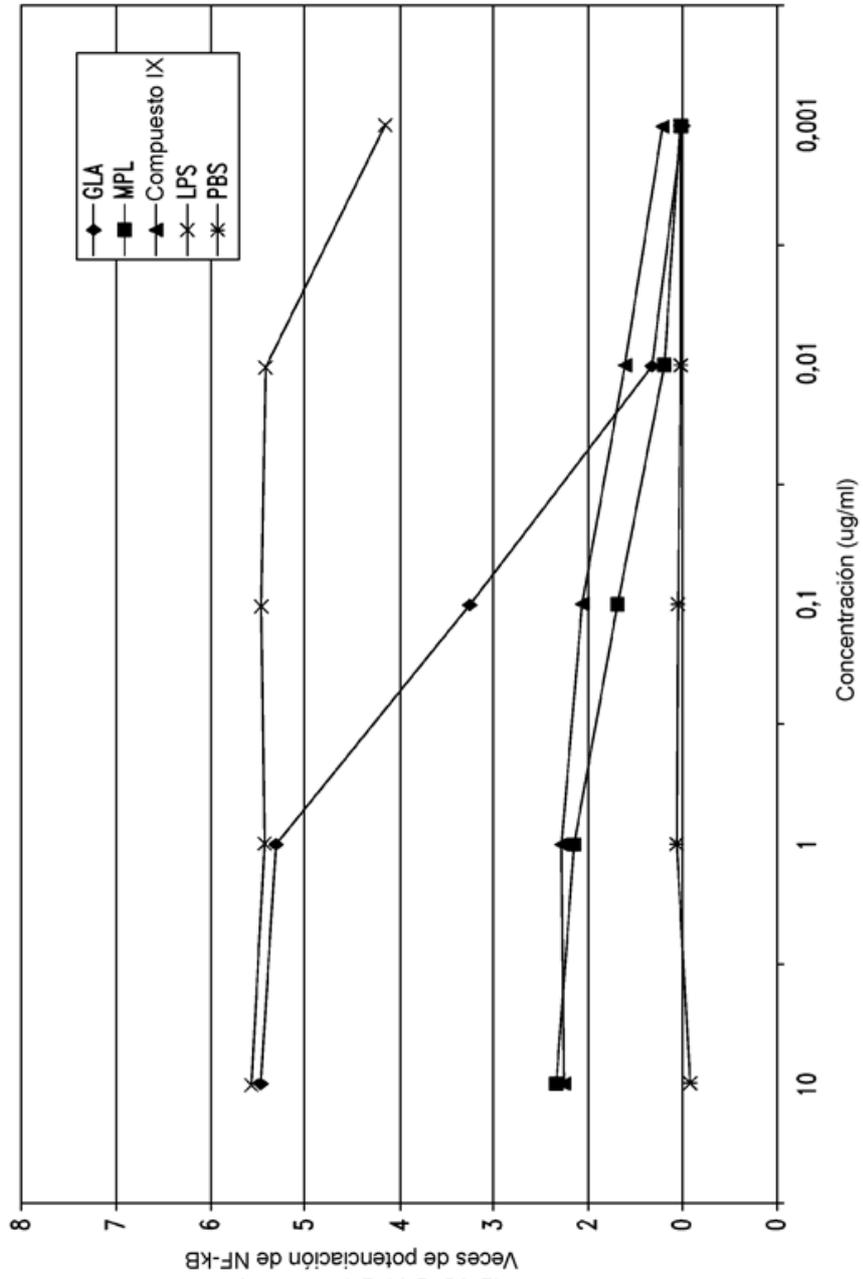


FIG. 3

MIP-1b

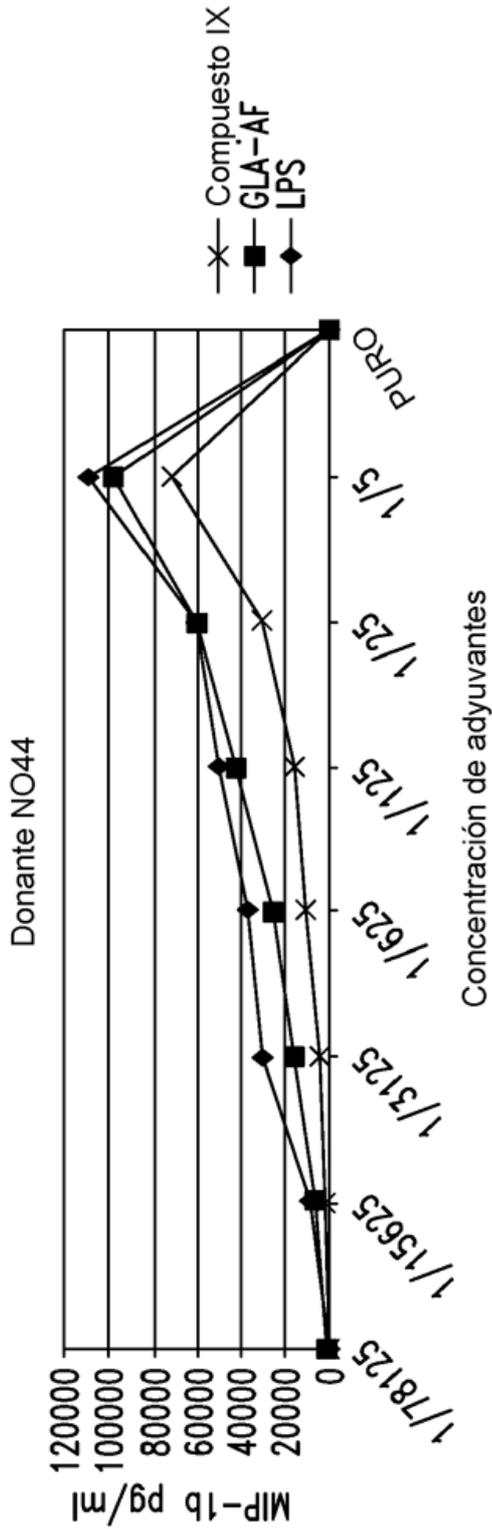


FIG. 4A

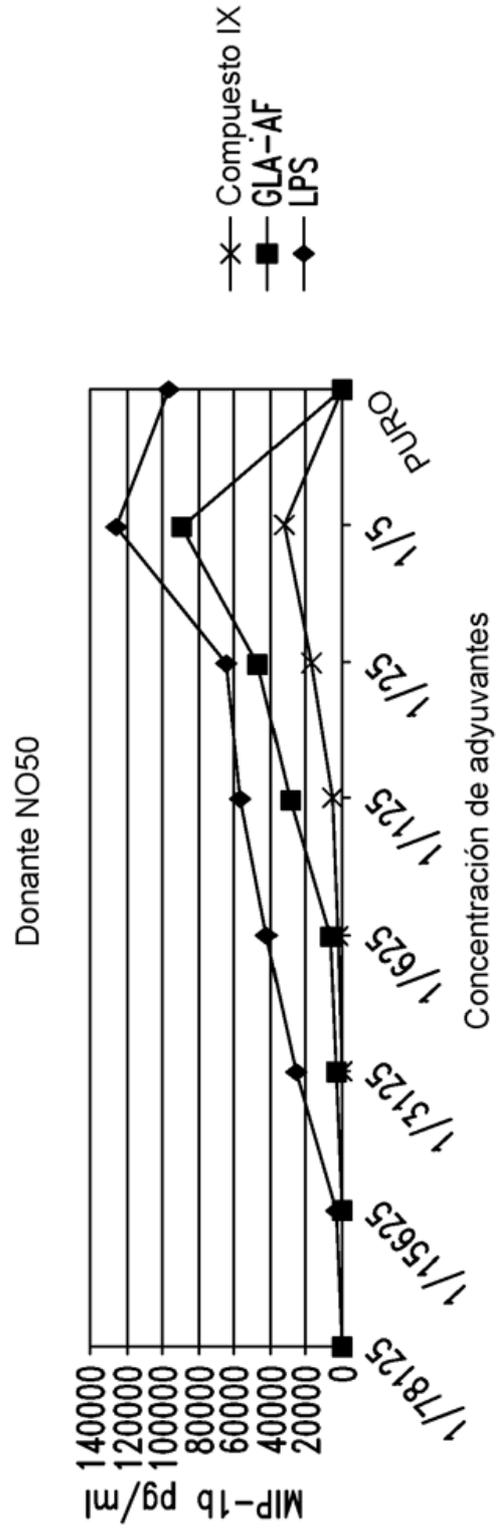


FIG. 4B

TNF α

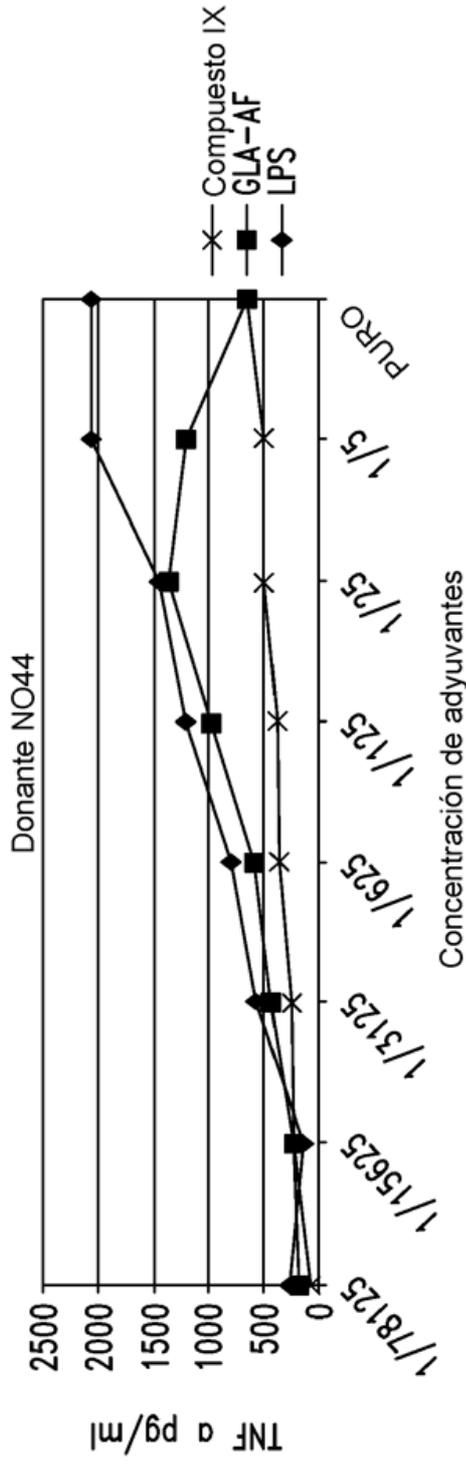


FIG. 4C

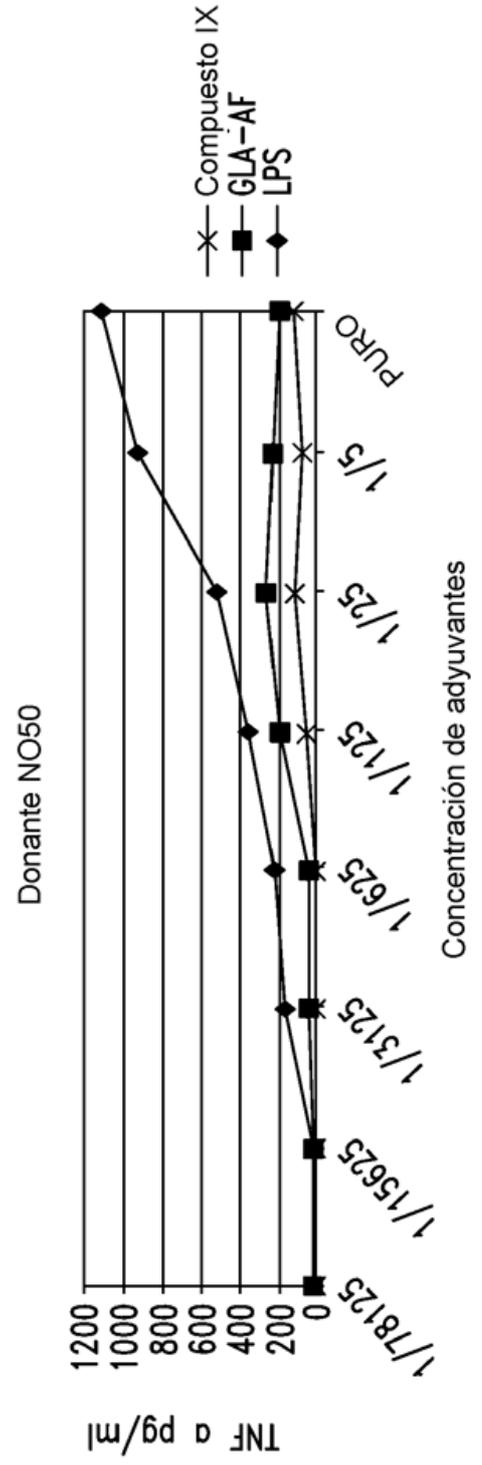


FIG. 4D