

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 576**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

C07H 15/12 (2006.01)

C07H 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2007 E 07705530 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1991266**

54 Título: **Composiciones coadyuvantes glucolípídicas novedosas**

30 Prioridad:

26.01.2006 US 762279 P

20.06.2006 US 814984 P

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

16.10.2013

73 Titular/es:

**ZOETIS P LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park, New Jersey 07932, US**

72 Inventor/es:

**DOMINOWSKI, PAUL JOSEPH;
MANNAN, RAMASAMY MANNAR y
MEDIRATTA, SANGITA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 425 576 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

Composiciones coadyuvantes glucolípídicas novedosas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de coadyuvantes glucolípídicos novedosas, a procedimientos para su uso y a su preparación. Las nuevas composiciones de la presente invención son estables durante una larga duración sin floculación. Son particularmente útiles en el suministro de diversas medicinas, incluyendo vacunas.

Antecedentes de la invención

10 Las vacunas se utilizan típicamente para proteger a seres humanos y animales veterinarios de enfermedades infecciosas causadas por bacterias, virus y organismos parásitos. Los antígenos utilizados en vacunas pueden ser cualquier variedad de agentes, pero están compuestos típicamente por organismos patógenos muertos, organismos patógenos que están vivos pero modificados o atenuados, proteínas, proteínas recombinantes o fragmentos de las mismas. Cualquiera que sea la fuente del antígeno, a menudo es necesario añadir un coadyuvante para potenciar la respuesta inmune del huésped al antígeno.

15 Los coadyuvantes se utilizan para conseguir dos objetivos: retardan la liberación de los antígenos desde el sitio de inyección y estimulan el sistema inmune.

20 El primer coadyuvante reseñado en la bibliografía fue el coadyuvante completo de Freund (FCA). El FCA contiene una emulsión de agua en aceite y extractos de micobacterias. Los extractos de micobacterias proporcionan moléculas inmunoestimulantes en forma bruta. La emulsión de agua en aceite actúa creando un efecto de depósito donde los antígenos se liberan lentamente. Desgraciadamente el FCA es poco tolerado y puede causar inflamación incontrolada. Desde el descubrimiento del FCA hace 80 años se han realizado esfuerzos para reducir los efectos secundarios indeseados de los coadyuvantes.

25 Actualmente se conocen análogos glucolípídicos que comprenden una nueva clase de compuestos que tienen propiedades coadyuvantes. La patente de EE.UU. N.º: 4.855.283 (en adelante en la presente memoria '283) da a conocer la síntesis de análogos glucolípídicos, incluyendo *N*-glucosilamidas, *N*-glucosilureas, carbamatos de *N*-glucosilo y específicamente: acetato de *N*-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanamida (conocido como Bay R1005, O. Lockhoff, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., (1991) 30: 1611-1620). Los compuestos descritos en la patente '283 son particularmente adecuados para su uso como coadyuvantes.

30 Las formulaciones coadyuvantes glucolípídicas necesitan ser fáciles de fabricar y estables cuando se almacenan durante largos periodos de tiempo sin mostrar floculación del componente lipídico. Las formas no acetato de las amidas glucolípídicas o glucosilamidas son altamente insolubles y típicamente se separan por floculación de la solución tras almacenamiento a temperatura ambiente o inferior.

35 Las soluciones y coadyuvantes que comprenden glucosilamidas proporcionados aquí muestran poca floculación y son bastante estables. Son fáciles de fabricar y pueden prepararse a escala comercial. Las formulaciones coadyuvantes glucolípídicas líquidas pueden utilizarse como diluyente para rehidratar una preparación de antígeno liofilizado. Se proporcionan también procedimientos para ensayar la estabilidad de estas formulaciones a tiempo real y mediante protocolos de ensayo de estabilidad acelerada.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona solamente para información.

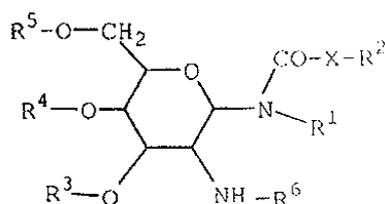
40 Esta invención comprende la composición y el procedimiento de preparación o fabricación tanto de solución **madre de glucosilamida** como de solución **coadyuvante glucolípídica**. La solución **madre de glucosilamida** se prepara disolviendo un glucolípido de fórmula I en un alcohol y combinando esto con una cantidad apropiada de un ácido débil más un tensioactivo "no iónico". El ácido débil se añade a la solución de alcohol glucolípídico en un exceso molar de ácido débil con respecto al glucolípido. En una realización, el glucolípido es hidroacetato de *N*-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanoilamida. En una realización, el alcohol es etanol. En una realización, el ácido débil es ácido acético. En una realización, los tensioactivos no iónicos son diversos sorbitanos (Span®) o polioxietilensorbitanos (Tween®), en particular monolaurato de sorbitanos (Span 20®) y monolaurato de polioxietilensorbitanos (Tween 20®). La solución **coadyuvante glucolípídica** se prepara introduciendo una cantidad apropiada de la solución madre de glucosilamida en un "tampón adecuado". El pH de las soluciones **coadyuvantes glucolípídicas** estables finales aquí descritas debe ser entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. Se prefiere un pH final de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7. Se describe un pH final de entre aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,4. Deben evitarse concentraciones altas de sal de **coadyuvante glucolípídico**, aquellas que exceden de NaCl 30 mM.

Estas dos soluciones se ejemplifican con más detalle a continuación:

55 La solución **madre de glucosilamida** es una composición que comprende:

a) un glucolípido de fórmula I;

en el que la fórmula I es



en la que

R¹ es hidrógeno o radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos de carbono;

X es -CH₂-, -O- o -NH-;

5 R² es hidrógeno o radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos de carbono;

R³, R⁴ y R⁵ son independientemente hidrógeno, -SO₄²⁻, -PO₄²⁻, -CO-alquilo C₁₋₁₀;

10 R⁶ es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo, L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxi-propilo, L-iso-leucilo, L-leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitino, L-fenilalanilo, L-prolilo, L-serilo, L-treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o sus isómeros D; en una forma de sal, en la que la forma de sal se deriva de un ácido débil;

b) un alcohol, en el que el alcohol es HO-alquilo C₁₋₃;

c) un ácido débil, en el que el ácido débil 1) está en exceso molar con respecto al contenido de glucolípido y 2) es cualquier ácido que tenga un valor de pKa entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 9,5 utilizando las tablas o valores estándar; y

15 d) un tensioactivo no iónico, en el que el tensioactivo no iónico es un agente que reduce la tensión superficial del material que se disuelve en él y tiene un componente que es hidrófobo y otro componente que es hidrófilo.

La solución **coadyuvante glucolípida** es una composición que comprende:

a) una solución **madre de glucosilamida**; y

20 b) un tampón adecuado, en el que el tampón es aquel apropiado para uso veterinario o médico y puede mantener un pH relativamente constante en una solución acuosa de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.

Descripción detallada de la invención

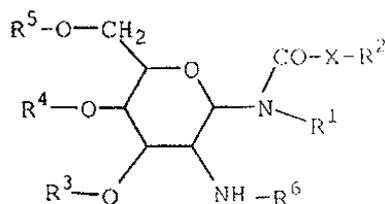
A menos que se indique cósalo contrario, los siguientes términos utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tienen los significados dados a continuación.

25 El término "**alcohol**" designa un compuesto de fórmula HO-alquilo C₁₋₃. Puede ser metanol, etanol o propanol en cualquier forma, tal como n-propanol o isopropanol. Se prefiere etanol.

El término "**alquilo**" designa tanto restos hidrocarburo saturados de cadena lineal como ramificada.

30 El término "**glucolípidos**" designa los compuestos de fórmula I siguientes. Estos compuestos se describen en la patente de EE.UU. 6.290.971 y la patente de EE.UU. N.º: 4.855.283, expedida el 8 de agosto de 1989. Tanto la patente de EE.UU. 6.290.971 como la patente de EE.UU. N.º: 4.855.283 se incorporan a la presente como referencia en su totalidad. Un glucolípido descrito en particular aquí, cuando está en su forma acetato, tiene el nombre comercial Bay R1005® y el nombre químico "acetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanamida". La forma amida de este compuesto tiene el nombre comercial Bay 15-1583® y el nombre químico "N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanamida".

35 Los glucolípidos de fórmula I son:



Fórmula I

en la que

R¹ es hidrógeno o radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos de carbono; X es -CH₂-, -O- o -NH-;

R² es hidrógeno o radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos de carbono; R³, R⁴ y R⁵ son independientemente hidrógeno, -SO₄²⁻, -PO₄²⁻ o -CO-alquilo C₁₋₁₀;

5 R⁶ es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo, L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxipropilo, L-iso-leucilo, L-leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitino, L-fenilalanilo, L-prolilo, L-serilo, L-treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o sus isómeros D; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Otra realización especificada describe los glucolípidos de fórmula I en la que:

R¹ es hidrógeno o alquilo C₁₂₋₁₈ saturado;

R² es hidrógeno o alquilo C₇₋₁₁ saturado;

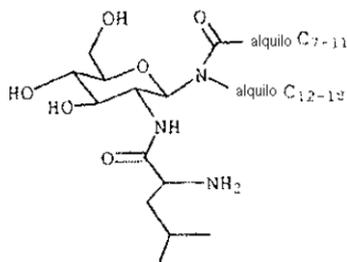
10 X es -CH₂;

R⁴ y R⁵ son independientemente hidrógeno;

R⁶ es seleccionado de L-leucilo.

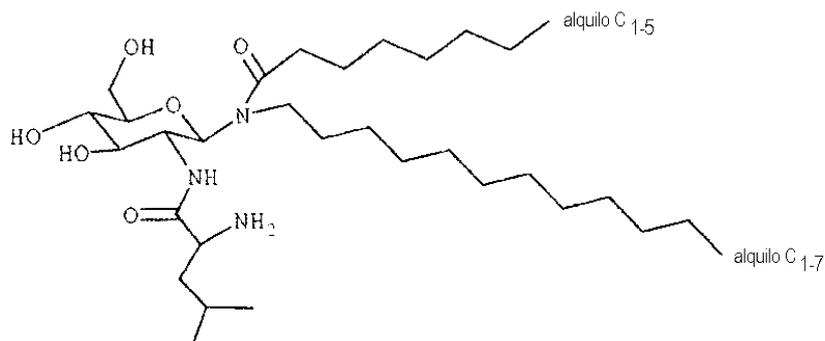
Las variables para la fórmula I son separadas e independientes y todas las combinaciones de variables están descritas y reivindicadas en la presente memoria.

15 En otra realización, los glucolípidos son aquellos descritos por la fórmula II(a):



Fórmula II(a)

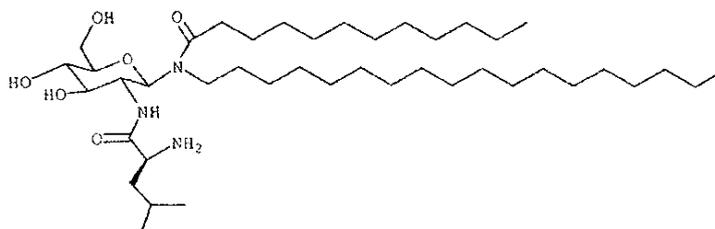
En otra realización, los glucolípidos son aquellos descritos por la fórmula II(b):



20

Fórmula II(b)

En otra realización, los glucolípidos tienen la estructura de fórmula III:

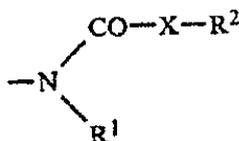


Fórmula III

5 Un compuesto de fórmula III puede existir en forma amida o forma acetato. La forma amida de este compuesto tiene el nombre comercial Bay 15-1583®. La forma acetato tiene el nombre comercial Bay R1005®.

Los glucolípidos de fórmula I pueden prepararse utilizando los siguientes procedimientos, tomados de la patente de EE.UU. N.º: 4.855.283.

10 Como puede observarse en la fórmula I, los compuestos según la invención están basados en una 2-amino-2-desoxihexosa sustituida. Estos azúcares están siempre unidos *N*-glucosídicamente a través de C-1, el átomo de carbono anomérico, al grupo acilamido, carbamido o alcoxicarbonilamido



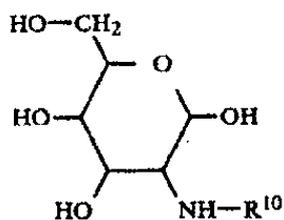
(I)

con los significados citados anteriormente para R¹, R² y X.

El grupo 2-amino de los aminoazúcares de los compuestos según la invención, de fórmula I, está unido amídicamente a un α-aminoácido o un derivado de α-aminoácido.

15 Los aminoácidos son los L-aminoácidos naturales tales como glicina, sarcosina, ácido hipúrico, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina, ornitina, citrulina, arginina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, tirosina, prolina, triptófano e histidina. Se describen también D-aminoácidos tales como D-alanina, o ácidos aminocarboxílicos tales como ácido alfa-aminobutírico, ácido α-aminovalérico, ácido α-aminocaproico o ácido α-aminoheptanoico, tanto en la forma D como L, para actuar como sustituyentes en el aminoazúcar.

Se proporcionan también los procedimientos de preparación de los compuestos según la fórmula I. Esto conlleva partir de un derivado de 2-amino-2-desoxiglicopiranososa (fórmula IV) que está protegido en el grupo amino,



(IV)

25 en la que R¹⁰ representa un grupo protector para la protección de grupos amino, que es conocido por la síntesis de péptidos y puede eliminarse selectivamente, cuando sea apropiado.

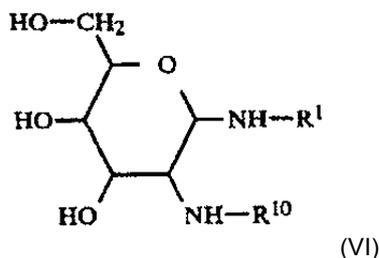
30 Son ejemplos de grupos protectores adecuados grupos acilo tales como trifluoroacetilo o tricloroacetilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2,4-dinitrofenilsulfenilo o grupos alcoxicarbonilo inferior opcionalmente sustituidos tales como grupos metoxycarbonilo, *tert*-butiloxicarbonilo, benciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo o 2,2,2-tricloroetiloxicarbonilo. Se conocen derivados de aminohexosa *N*-protegidos adecuados. Por ejemplo, M. Bergmann y L. Zervas, *Ber.* 64, 975 (1931); D. Horton, *J. Org. Chem.* 29, 1776 (1964); P.H. Gross y R.W. Jeanloz, *J. Org. Chem.* 32, 2759 (1967); M.L. Wolfrom y H.B. Bhat, *J. Org. Chem.* 32, 1821 (1967); general: J.F.W. McOmie (editor), "Prot. Groups. Org. Chem.", Plenum Press (1973); Geiger en "The Peptides", vol. 3, páginas 1-99 (1981) Academic Press; y la bibliografía citada en los mismos. Los grupos protectores de amino preferidos para la preparación de los compuestos según la fórmula I son el grupo BOC (*tert*-butiloxicarbonilo) o el grupo Z (benciloxicarbonilo).

35 Los derivados de aminoazúcar bloqueados (IV) se hacen reaccionar, en una primera etapa de reacción, con aminas

(fórmula V)



en las que R^1 tiene el significado dado anteriormente, proporcionando glucosilaminas (fórmula VI)

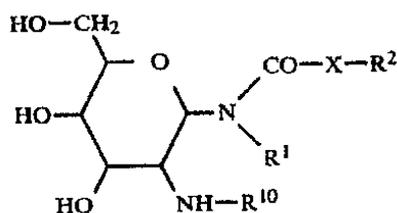


- 5 Las preparaciones de glucosilamina de este tipo se conocen en principio (Ellis, *Advances in Carbohydrate Chemistry* 10, 95, (1955)) y se describen, específicamente, en la DE-OS (memoria descriptiva alemana publicada) N.º: 3.213.650.

En la segunda etapa de reacción, se hacen reaccionar las glucosilaminas (VI) bien con derivados de ácido carboxílico adecuados (fórmula VII) tales como haluros de carboxilo, o bien con anhídridos carboxílicos,



teniendo R^2 el significado anteriormente citado y representando R^{11} halógeno tal como, por ejemplo, cloro, o representando $-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^2$, con el significado anteriormente citado para R^2 , o representando $-\text{O}-\text{CO}-\text{O}$ -alquilo inferior. De este modo, se obtienen glucosilamidas (fórmula VIII)



- 15 en las que R^1 y R^2 tienen los significados citados anteriormente y R^{10} es igual que R^6 y X representa $-\text{CH}_2-$. Las condiciones para N-acilaciones de este tipo se indican en la DE-OS (memoria descriptiva alemana publicada) N.º: 3.213.650.

20 En una realización preferida, las glucosilaminas de fórmula VI se hacen reaccionar con uno a dos equivalentes de un cloruro de carbonilo (fórmula VII) o con uno a dos equivalentes de un anhídrido mixto que se ha obtenido a partir del ácido carboxílico relevante $\text{R}^2-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ y cloroformiato de etilo o cloroformiato de isobutilo, en presencia de una base orgánica auxiliar, mediante procedimientos conocidos en la bibliografía, proporcionando la glucosilamida de fórmula VIII con $\text{X}=-\text{CH}_2-$.

25 Esto se lleva a cabo en disolventes orgánicos o acuosos-orgánicos entre 0 °C y 50 °C, cuando sea apropiado en presencia de una base inorgánica u orgánica. Son diluyentes adecuados alcoholes, tales como metanol, etanol, 1-propanol o 2-propanol, o éteres tales como dietiléter, tetrahidrofurano o 1,4-dioxano, o hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, triclorometano o 1,2-dicloroetano, o N,N-dimetilformamida.

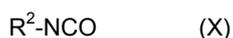
Cuando las glucosilaminas (VI) que se obtienen en la primera etapa se hacen reaccionar con ésteres halogenofórmicos (IX)



representando R^{12} halógeno tal como, por ejemplo, cloro o bromo y teniendo R^2 el significado anteriormente citado, entonces se obtienen carbamatos de glucosilo (VIII), representando X oxígeno en la fórmula III.

35 En una realización, las glucosilaminas de fórmula VIII se hacen reaccionar con uno a dos equivalentes de un éster clorocarbónico IX, proporcionando el carbamato de glucosilo. Esto se lleva a cabo preferiblemente en disolventes orgánicos o acuosos-orgánicos a temperaturas entre 0 °C y 50 °C, pero de forma particularmente preferible a temperatura ambiente. Son disolventes adecuados alcoholes, éteres, hidrocarburos halogenados o dimetilformamida, tal como se mencionan anteriormente.

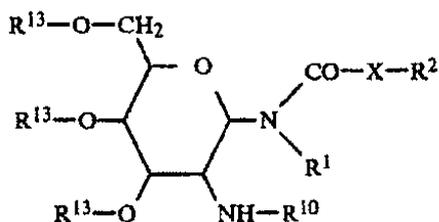
Cuando se hacen reaccionar glucosilaminas (VI) que se obtienen en la primera etapa con uno a dos equivalentes de un isocianato orgánico (fórmula X)



teniendo R^2 el significado anteriormente citado, se obtienen glucosilureas de fórmula VIII y X es $-NH-$. Esta reacción de acilación, como las reacciones anteriormente citadas, se lleva a cabo preferiblemente en disolventes orgánicos, estando las temperaturas de reacción entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferiblemente entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Son disolventes adecuados los alcoholes, éteres, hidrocarburos halogenados o dimetilformamida anteriormente citados.

5 Las glucosilamidas (fórmula VIII, $X = -CH_2-$), carbamatos de glucosilo (fórmula VIII, $X = -O-$) o glucosilureas (fórmula VIII, $X = -NH-$) obtenidos de este modo se aíslan en forma de sólidos cristalinos o amorfos mediante procedimientos conocidos *per se* y si es necesario, se purifican mediante procedimientos estándar tales como recristalización, cromatografía, extracción, etc.

10 En muchos casos, es también ventajoso llevar a cabo, en paralelo o en lugar de las etapas de purificación anteriormente citadas, una derivatización química que conduce a un derivado de las glucosilamidas, carbamatos de glucosilo y glucosilureas de fórmula VIII que tiene buenas propiedades de cristalización. Las derivatizaciones químicas de este tipo son, en el caso de las glucosilamidas, carbamatos de glucosilo y glucosilureas según la invención, por ejemplo, reacciones de esterificación en los grupos hidroxilo de los residuos de azúcar. Son ejemplos de grupos éster adecuados grupos acetilo, benzoilo o p-nitrobenzoilo. Para preparar derivados de tri-O-acilo de las glucosilamidas, glucosilureas o carbamatos de glucosilo, se hacen reaccionar los correspondientes trioles (fórmula VIII) con agente acilantes en presencia de bases auxiliares inorgánicas u orgánicas. Son agentes acilantes adecuados cloruros de ácido tales como cloruro de acetilo, cloruro de benzoilo o cloruro de p-nitrobenzilo, o anhídridos tales como, por ejemplo, anhídrido acético. Esto da como resultado la formación de ésteres según la fórmula XI



(XI)

20 con R^1 , R^2 , R^{10} y X teniendo los significados dados anteriormente y

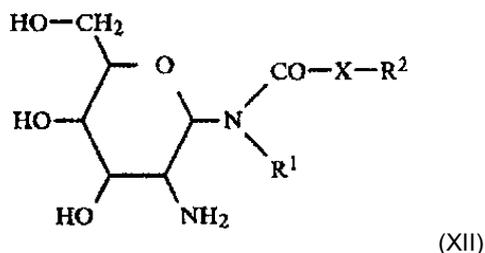
R^{13} representando acetilo, benzoilo o p-nitrobenzoilo.

25 Las reacciones de O-acilación se llevan a cabo preferiblemente en disolventes orgánicos inertes. Aquellos que pueden utilizarse son hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, triclorometano o 1,2-dicloroetano, éteres tales como tetrahidrofurano o 1,4-dioxano, ésteres tales como acetato de etilo y amidas tales como dimetilformamida.

30 Es también posible que estén indicadas como disolventes adecuados bases orgánicas solas tales como trietilamina o piridina. Las bases que pueden utilizarse son todas las bases utilizadas en la química orgánica para O-acilaciones. Preferiblemente, se utilizan trietilamina, piridina o la mezcla piridina/4-dimetilaminopiridina. Los triésteres (fórmula XI) pueden cristalizarse fácilmente a partir de disolventes orgánicos. Se prefieren particularmente para la cristalización los disolventes polares, tales como alcoholes de cadena corta, es decir, metanol, etanol, n-propanol o isopropanol. Otros disolventes adecuados para la cristalización de los triésteres (fórmula XI) son mezclas de disolventes orgánicos con disolventes inorgánicos u orgánicos polares, por ejemplo, tetrahidrofurano-metanol, tetrahidrofurano-agua, etanol-agua e isopropanol-agua. Los triésteres (fórmula XI) que se han purificado mediante recristalización única o, cuando sea apropiado, múltiple, se vuelven a transformar en trioles (fórmula VIII) mediante hidrólisis o transesterificación de los tres grupos O-acetilo. Se conocen una multiplicidad de tipos de escisión de éster en la química orgánica. Para la preparación de los trioles (fórmula VIII) a partir de los triésteres (fórmula XI) citados puede hacerse la transesterificación de los grupos acilo en presencia de metanol y cantidades catalíticas de metanolato de sodio, que es conocido como hidrólisis ZEMPLEN en química orgánica.

40 La tercera etapa de reacción en la preparación de los compuestos de fórmula 1 según la invención comprende la escisión selectiva del grupo protector del grupo 2-amino en el azúcar en los compuestos de fórmula VIII. En esta reacción, ha de tenerse particular cuidado de que no haya ninguna eliminación simultánea del grupo 1-amido o 1-carbamido o 1-(alcoxicarbonilamido) en el azúcar de los compuestos de fórmula VIII.

45 El grupo benciloxicarbonilo, que se utiliza preferiblemente en C-2 de los aminohexanos puede escindirse cuantitativa y selectivamente, con retención del grupo 1-amido, 1-carbamido o 1-alcoxicarbonilamido, en las condiciones de hidrogenólisis. Esta hidrogenólisis proporciona las glucosilamidas, glucosilureas o carbamatos de glucosilo con un grupo 2-amino libre en el azúcar con la siguiente fórmula estructural (XII)



con los significados anteriormente indicados para R^1 , R^2 y X.

5 Son ejemplos de catalizadores adecuados para la hidrogenólisis metales nobles tales como platino o paladio que se adsorben sobre carbono activo. Se utiliza preferiblemente paladio/carbono (al 5 % o al 10 %). La hidrogenólisis puede llevarse a cabo a presión atmosférica o a presión elevada en un recipiente a presión adecuado. Los disolventes inertes son adecuados para la hidrogenación tales como, por ejemplo, alcoholes tales como metanol, etanol o propanol, éteres tales como tetrahidrofurano o 1,4-dioxano, o ácidos carboxílicos tales como ácido acético, o mezclas de los mismos. Cuando sea apropiado, se mezcla el disolvente con agua o ácidos diluidos tales como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. Por supuesto, cuando se añaden dichos ácidos, se obtienen las 2-amino-2-desoxiglucosilamidas, carbamatos de 2-amino-2-desoxiglucosilo y 2-amino-2-desoxiglucosilureas según la fórmula XII en forma de las sales de amonio de estos ácidos. El grupo protector *tert*-butiloxicarbonilo, que se prefiere utilizar igualmente en los compuestos de fórmula VIII, puede escindir-se mediante procedimientos conocidos a partir de la bibliografía utilizando ácidos minerales tales como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. En este caso también, se obtienen selectivamente las 2-amino-2-desoxiglucosilamidas, carbamatos de 2-amino-2-desoxiglucosilo y 2-amino-2-desoxiglucosilureas de fórmula XII en forma de las sales de amonio de los ácidos utilizados para la escisión.

La cuarta etapa de reacción para la síntesis de los compuestos de fórmula I, según la invención, comprende el ligamiento de las aminoglucosilamidas, amidas, carbamatos de aminoglucosilo o aminoglucosilureas según la fórmula XII, o de sus sales, con un derivado de aminoácido adecuado. Los derivados de aminoácido adecuados son aminoácidos *N*-bloqueados (fórmula XIII)



con R^7 teniendo el significado citado anteriormente,

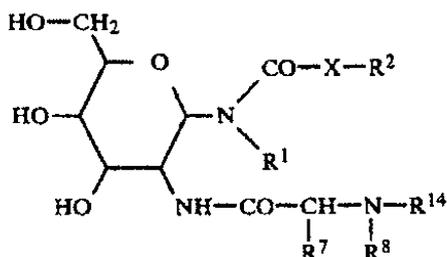
R^8 representando hidrógeno o metilo y

R^{14} representando un grupo protector que se utiliza habitualmente en síntesis peptídica y que puede eliminarse selectivamente de nuevo reteniendo el enlace peptídico.

25 Los grupos protectores para el grupo amino en la fórmula XIII que se utilizan preferiblemente son los anteriormente citados y se prefieren particularmente los grupos benciloxicarbonilo o *t*-butiloxicarbonilo. El ligamiento de la 2-amino-2-desoxiglucosilamida, carbamato de 2-amino-2-desoxiglucosilo o 2-amino-2-desoxiglucosilurea de fórmula XII con un derivado de aminoácido de fórmula XIII puede llevarse a cabo mediante procedimientos convencionales de síntesis peptídica (E. Wunsch y *co/s.*: Synthese von Peptiden (Synthesis of peptides) en: Methoden der Org. Chemie (Methods of Org. Chemistry) (Houben-Weyl) (E. Muller, editor), vol. XV/1 y XV/2, 4^a edición, publicado por Thieme, Stuttgart (1974).

Son ejemplos de procedimientos convencionales la condensación del grupo amino en el compuesto de fórmula XII con un derivado de aminoácido de fórmula XIII en presencia de agentes deshidratantes, por ejemplo, dicitohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida.

35 La condensación de los compuestos de fórmula XII con los de fórmula XIII puede llevarse a cabo también cuando se activa el grupo carboxilo. Es un grupo carboxilo activado posible, por ejemplo, un anhídrido de ácido, preferiblemente un anhídrido mixto, tal como un acetato del ácido, o una amida del ácido, tal como una imidazolida, o un éster activado. Son ejemplos de ésteres activados ésteres cianometílicos, ésteres pentaclorofenílicos y ésteres de *N*-hidroxifitalimida. Los ésteres activados pueden obtenerse también a partir del ácido (fórmula XIII) y *N*-hidroxisuccinimida o 1-hidroxibenzotiazol en presencia de un agente deshidratante, tal como carbodiimida. Los derivados de aminoácidos se conocen y pueden prepararse de una manera conocida. La condensación del compuesto amino de fórmula XII con los compuestos de carboxilo opcionalmente activados de fórmula XIII proporciona los peptidoglucolípidos de fórmula XIV.

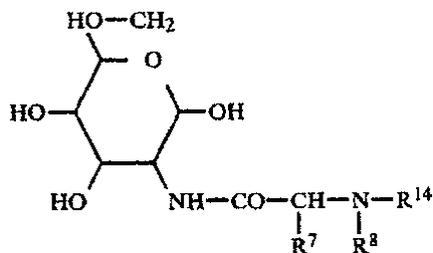


(XIV)

con los significados anteriormente citados para R^1 , R^2 , R^7 , R^8 , R^{14} y X.

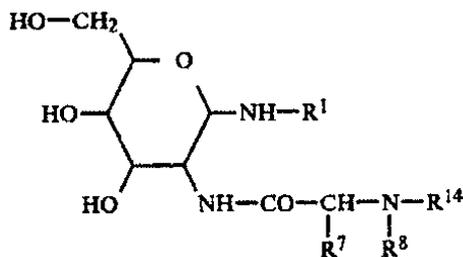
En una etapa de procedimiento final para la preparación de los compuestos según la fórmula I, se elimina el grupo protector R^{14} de los compuestos de fórmula XIV. Ha de tenerse cuidado durante esta etapa de que no se escindan los otros grupos amida, uretano o urea presentes en los compuestos de fórmula XIV. Los grupos protectores R^{14} que se utilizan preferiblemente en los compuestos de fórmula XIV, el grupo *N*-carbobenzoilo y el grupo *N*-*tert*-butiloxicarbonilo, pueden eliminarse reteniendo el grupo amida, uretano o urea. El grupo carbobenzoilo puede eliminarse selectivamente mediante hidrogenólisis en presencia de un metal noble tal como, por ejemplo, paladio sobre carbono, en un disolvente adecuado tal como etanol, metanol, ácido acético glacial o tetrahydrofurano. Los disolventes pueden utilizarse en forma del disolvente puro o combinados entre sí o con agua. La reacción puede llevarse a cabo bien a presión atmosférica o bien a presión elevada. El grupo *tert*-butiloxicarbonilo R^{14} en los compuestos de fórmula XIV puede eliminarse mediante procedimientos acidolíticos. Los ejemplos de condiciones adecuadas son el uso de cloruro de hidrógeno en disolventes adecuados tales como, por ejemplo, ácido acético glacial, éter dietílico, dioxano o acetato de etilo, a temperatura ambiente. Los procedimientos de este tipo para la escisión de los carbamatos de *tert*-butilo se conocen en principio. Las peptidoglucosilamidas, carbamatos de peptidoglucosilo y peptidoglucosilureas de fórmula I que se obtienen de esta manera se aíslan en forma de sólidos cristalinos o amorfos, mediante procedimientos conocidos *per se* y si es necesario, se purifican mediante procedimientos estándar tales como recristalización, cromatografía, extracción, etc.

Los compuestos según la invención de fórmula I pueden prepararse también mediante una segunda ruta sintética con resultados similarmente buenos. Esta segunda ruta sintética difiere de la primera, que se describe anteriormente, porque es diferente la secuencia de ligamiento de los sintones aminoácidos de aminoazúcar, amina R^1-NH_2 y ácido carboxílico $R^2-CH_2-CO_2-H$, o derivado de ácido carbónico $R^2-O-CO-halógeno$, o R^2-NCO , con los significados anteriormente citados de R^1 y R^2 . En esta segunda ruta, se utilizan como componente de partida 2-*N*-(aminoacil)aminoazúcares adecuados de fórmula XV



(XV)

con el significado anteriormente citado para R^7 y R^8 y en la que R^{14} representa un grupo protector de amino conocido en la química de péptidos, preferiblemente el grupo benciloxicarbonilo o *tert*-butiloxicarbonilo. Los compuestos de fórmula XV que se obtienen así se condensan después con los compuestos amino de fórmula III, proporcionando glucosilaminas de fórmula general XVI



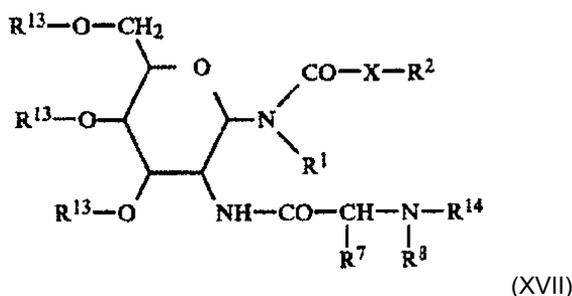
(XVI)

con R^1 , R^7 , R^8 y R^{14} teniendo significados consistentes con la fórmula I y la definición de R^6 .

Todos los procedimientos descritos anteriormente para la preparación de los compuestos de fórmula general VI pueden utilizarse para la preparación de los compuestos de fórmula general XVI. Se hacen reaccionar después los compuestos de fórmula XVI con los derivados de ácido carboxílico anteriormente citados (fórmula VII) o con ésteres

halogenofórmicos (fórmula IX) o con isocianatos orgánicos (fórmula X) para dar las 2-(aminoacil)aminoglucosilamidas de fórmula XIV (con X=-CH₂-) o los carbamatos de 2-(aminoacil)aminoglucosilo de fórmula XIV (con X=-O-) o las 2-(aminoacil)aminoglucosilureas de fórmula XIV (con X=-NH-). Estas reacciones de acilación pueden llevarse a cabo generalmente mediante los procedimientos descritos anteriormente para la reacción de glucosilaminas con derivados de ácido carboxílico o carbónico.

Los intermedios (fórmula XIV) que se obtienen de este modo pueden purificarse mediante el procedimiento de purificación física anteriormente citado. Sin embargo, es preferible convertir los compuestos de fórmula XIV, mediante los procedimientos de O-acilación descritos anteriormente, en los tri-O-acetatos o los tri-O-benzoatos de fórmula general XVII



con significado para las variables consistente con la fórmula I.

Estos compuestos pueden cristalizarse fácilmente, preferiblemente a partir de disolventes polares tales como metanol o etanol y así purificarse. Los derivados cristalinos purificados de fórmula XVII se convierten después en los trioles de fórmula XIV mediante los procedimientos anteriormente citados de hidrólisis de éster, que se utilizan ampliamente especialmente en química de azúcares. La eliminación final de los grupos protectores en el aminoácido de los compuestos de fórmula XIV se ha descrito ya anteriormente para la preparación de los compuestos de fórmula I. La invención se refiere también a sales de los compuestos de fórmula I. Estas son principalmente las sales no tóxicas que pueden utilizarse habitualmente en farmacia, por ejemplo, cloruros, acetatos y lactatos, o sales inertes de los compuestos de fórmula I.

El término “ácido débil” significa cualquier ácido que tenga un valor de pKa (el -log de la Ka) de entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 9,5 utilizando tablas o valores estándar. Aunque sin pretender limitar esta invención, se describen los siguientes ejemplos de ácidos débiles con nombre, fórmula y pKa aproximado. Ácido acético, H(C₂H₃O₂) (pKa 4,76); ácido ascórbico (1), H₂(C₆H₆O₆) (pKa 4,10); ácido acetilsalicílico, H₈(C₉O₄) (pKa 3,5); ácido butanoico H(C₄H₇O₂) (pKa 4,83); ácido carbónico, H₂CO₃ (pKa 4,83, forma 1); ácido crómico HCrO₄⁻ (pKa 6,49, forma 2); ácido cítrico, H₃(C₆H₅O₇)⁻, (pKa 3,14 forma 1); ácido cítrico, H₂C₆H₅O₇⁻, (pKa 4,77, forma 2); ácido cítrico, (HC₆H₅O₇)⁻, (pKa 6,39 forma 3); ácido fórmico, H(CHO₂)⁻, (pKa 3,75); ácido fumárico, H₄(C₄O₄) (pKa 3,03); ácido heptanoico H(C₇H₁₃O₂) (pKa 4,89); ácido hexanoico H(C₆H₁₁O₂) (pKa 4,84), ácido fluorhídrico, HF, (pKa 3,20); isocitrato H₈(C₆O₇)⁻ (pKa 3,29); ácido láctico, H(C₃H₅O₃)⁻, (pKa 3,08); ácido maleico, H₄(C₄O₄) (pKa 1,83); ácido nicotínico, H₅(C₆NO₂) (pKa 3,39); ácido oxálico H₂(C₂O₄) (pKa 1,23 forma 1); ácido oxálico (HC₂O₄)⁻ (pKa 4,19, forma 2); ácido pentanoico, H(C₅H₉O₂)⁻, (pKa 4,84); ácido fosfórico, H₃PO₄, (pKa 2,16 forma 1); ácido propanoico, H(C₃H₅O₂)⁻, (pKa 4,86); ácido pirúvico, H₄(C₃O₃) (pKa 2,39) y ácido succínico H₆(C₄O₄) (pKa 4,19). Cualquier combinación de estos ácidos está también ejemplificada.

Se prefiere el ácido acético. Ácido acetilsalicílico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido fluorhídrico, isocitrato, ácido maleico, ácido nicotínico, ácido fosfórico, ácido pirúvico, ácido succínico y ácido tricloroacético son ácidos débiles más comunes que están abarcados individualmente, en combinación y en conjunto.

El término “tensioactivo no iónico” significa un tensioactivo que es una sustancia que reduce la tensión superficial del material que se disuelve en él y no iónico significa que tiene un grupo polar que no está cargado eléctricamente. El término tensioactivo anfífilo significa un tensioactivo en el que una parte de la molécula de tensioactivo es hidrófoba y otra parte es hidrófila. Los tensioactivos adecuados serán tanto no iónicos como anfífilos y aceptables para uso veterinario o médico. Puede determinarse fácilmente por los expertos en la técnica si un tensioactivo no iónico particular es aceptable o no para uso médico o veterinario. Hay muchos tensioactivos no iónicos adecuados que pueden utilizarse con esta invención y se proporcionan numerosos ejemplos a continuación.

Se incorporan aquí dos tipos bien conocidos de tensioactivos no iónicos. Estos se conocen como sorbitanos, habitualmente comercializados con la marca comercial Span® y polioxietilensorbitanos, habitualmente comercializados con la marca comercial Tween®. Se incorporan específicamente aquí los siguientes:

monolaurato de sorbitán (Span 20®), monopalmitato de sorbitán (Span 40®), monoestearato de sorbitán (Span 60®), triestearato de sorbitán (Span 65®), monooleato de sorbitán (Span 80®), trioleato de sorbitán (Span 85®), monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween 20®), monopalmitato de polioxietilensorbitán (Tween 40®), monoestearato de polioxietilensorbitán (Tween 60®), monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80) y trioleato de polioxietilensorbitán (Tween 85). Se pretende que estas descripciones incluyan los ingredientes del nombre comercial, o ingredientes equivalentes, como se enumeran en los catálogos de suministro para estos tensioactivos. Los tensioactivos pueden utilizarse individualmente o en cualquier combinación. Se describen particularmente monolaurato de sorbitán (Span 20®), monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween 20®), monooleato de sorbitán (Span 80®), trioleato de sorbitán (Span 85®), monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80), trioleato de polioxietilensorbitán (Tween 85).

El término “**tampón adecuado**” significa un tampón que es adecuado para uso veterinario o médico y puede mantener un pH relativamente constante en una solución acuosa de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. Los tampones fosfato son una realización descrita aquí. Los tampones fosfato pueden prepararse a un pH específico en un amplio intervalo mediante el mezclado de sales monobásicas y dibásicas de fosfato de sodio y/o fosfato de potasio en diferentes proporciones. La preparación y uso de diversos tampones de sodio y potasio se conocen bien por un experto en la técnica.

Son otros ejemplos de tampones los siguientes:

ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (también conocido como MES);

ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (también conocido como MOPS);

10 ácido *N*-[tris(hidroximetil)]-2-aminoetanosulfónico (también conocido como TES);

ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (también conocido como HEPES);

[tris(hidroximetil)metil]glicina (también conocida como TRIS).

Parte I. Preparación de las soluciones

15 Las nuevas formulaciones dadas a conocer aquí son: 1) soluciones **madre de glucosilamida** y 2) soluciones **coadyuvantes glucolípídicas**.

1) Se prepara una **solución madre de glucosilamida** disolviendo un glucolípido en un alcohol y combinando cantidades apropiadas de un ácido débil. Se añade el ácido débil a la solución de glucolípido-alcohol en exceso molar del ácido débil con respecto al glucolípido. Se añade un tensioactivo no iónico a la mezcla de glucolípido-alcohol-ácido, para crear una solución **madre de glucosilamida**. El glucolípido ejemplificado es acetato de *N*-(2-desoxi-2-*L*-leucilamino- β -*D*-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanoilamida. El alcohol ejemplificado es etanol. El ácido débil ejemplificado es ácido acético. Los tensioactivos no iónicos son como se describen anteriormente.

25 **Preparación de soluciones madre de glucosilamida.** Se añade ácido débil a una solución alcohólica que contiene un glucolípido. Se añade el ácido débil en exceso molar con respecto al contenido de glucolípido. El componente ácido débil debería añadirse de 1,25 a 5 veces la cantidad de glucolípido, en equivalentes molares del glucolípido. En ciertas realizaciones se recomiendan las siguientes cantidades relativas de ácido. El ácido débil debería ser 2,0 veces, 2,5 veces, 2,7 veces, 3,0 veces y 5,0 veces y lo más preferiblemente es 2,7 veces tantos moles de ácido como moles de glucolípido.

Se añade un tensioactivo no iónico a la mezcla de alcohol-glucolípido anterior, bien antes o bien después de añadir el ácido débil, creando la solución madre de glucosilamida final.

30 En presencia del ácido débil, la glucosilamida se convierte en la forma acetato del glucolípido. Los glucolípidos de fórmula I no son totalmente solubles cuando simplemente se introducen directamente en soluciones acuosas tamponadas. La solución obtenida típicamente de disolver un glucolípido de fórmula I en una solución acuosa tamponada es una mezcla lechosa. Investigadores anteriores han intentado homogeneizar tales soluciones de mezclas mediante sonicación de la solución lechosa. Sin embargo, la sonicación no asegura que la solución permanecerá homogénea durante el almacenamiento. El enfoque químico para suspender estos compuestos da como resultado una solución totalmente soluble, casi ópticamente transparente de glucolípido tamponado acuoso a pH apropiado. Cuando se añade ácido débil en cantidad en exceso comparada con el glucolípido, se asegura que todo el glucolípido se convierte en forma soluble y se evita su reversión de vuelta a la forma no soluble.

40 El ácido débil convierte el glucolípido en una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales preferidas son sales no tóxicas, que se utilizan habitualmente en preparaciones farmacéuticas y biológicas. Por ejemplo, se obtienen cloruros, acetatos, lactatos y sales inertes de los compuestos de fórmula I con los ácidos débiles descritos en la presente memoria.

45 Los alcoholes utilizados para disolver el glucolípido pueden ser metanol, etanol, cualquier forma isomérica de propanol o cualquier combinación de los mismos. La solución de glucolípido-alcohol resultante será ópticamente transparente. Cualquier reacción química que pudiera convertir la forma acetato de glucolípido de vuelta a la forma no acetato causaría floculación de los glucolípidos dentro de la solución acuosa. Cuando ocurre la floculación de glucolípido, las moléculas de glucolípido salen de la solución en forma de copos finos, asentándose en el fondo del recipiente. La concentración inicial de ácido débil en la solución **madre de glucosilamida** de glucolípido y alcohol determina si habrá alguna floculación de glucolípido. El ácido débil debería estar en exceso molar con respecto al glucolípido para evitar la floculación.

50 2) Las soluciones **coadyuvantes glucolípídicas** se preparan introduciendo una cantidad apropiada de la solución **madre de glucosilamida** en un “tampón adecuado”. El pH de las soluciones **coadyuvantes glucolípídicas** estables finales aquí descritas debería estar entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. Se prefiere un pH final de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7. Se describe un pH final de entre aproximadamente 6,3 y aproximadamente 6,4.

60 La solución **madre de glucosilamida** contiene ácido en exceso de modo que debería tamponarse para usar como un coadyuvante. Por ejemplo, puede prepararse un tampón fosfato a un pH específico en un amplio intervalo mediante mezclado de sales monobásicas y dibásicas de fosfato de sodio o fosfato de potasio en diferentes proporciones. Si se utiliza un tampón fosfato se puede preparar aproximadamente a 20 mM y este tiene un pH de aproximadamente 7,8. Cuando se añade la solución **madre de glucosilamida** al tampón, se reduce el pH del tampón. Una solución tamponada con fosfato a pH 7,8 da como resultado una solución **coadyuvante glucolípídica**

final con un pH de aproximadamente 6,4. Pueden hacerse ajustes finales al pH, pero típicamente no son necesarios.

La solución **madre de glucosilamida** que contiene ácido débil y un glucolípido tiene un pH muy bajo. Puede ser necesario elevar el pH a un nivel aceptable. Debería evitarse una base fuerte para este fin, debido a que la adición de una base fuerte puede convertir la forma de sal del glucolípido de vuelta a la forma no salina, dando como resultado la precipitación (floculación) de la forma no salina en el entorno acuoso. Sin embargo, si se desea una base fuerte, solamente deberían utilizarse pequeñas cantidades. Por ejemplo, se recomienda no utilizar NaOH más de 100 mM, aunque 4,0 mM o menos es óptimo.

La solución de tamponación puede incluir opcionalmente algo de NaCl, pero no es necesario. Las concentraciones de NaCl pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mM. Se prefieren cantidades menores de NaCl frente a cantidades mayores. Los ejemplos aquí no tienen nada de NaCl o tienen NaCl 15 mM. NaCl 100 mM no es adecuado ya que ocurre floculación. No se espera floculación con concentraciones de NaCl 15 mM o menores. No se espera floculación con concentraciones de NaCl 30 mM o menores. No se espera floculación con concentraciones de NaCl 50 mM o menores.

Parte II. Caracterización de la solución coadyuvante glucolipídica

Puede controlarse la estabilidad de la solución **coadyuvante glucolipídica** durante almacenamiento mediante simple observación visual o utilizando instrumentos analíticos apropiados. Las moléculas glucolipídicas forman micelas cuando están en solución acuosa y es posible determinar precisamente el tamaño de las micelas con un difractor láser. Dicha medida puede utilizarse para determinar si hay floculación de las moléculas glucolipídicas.

Un enfoque alternativo para medida de la estabilidad a tiempo real es realizar ensayos de estabilidad acelerada. Con ensayos de estabilidad acelerada, se somete la solución coadyuvante a una temperatura de aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 7 días, seguido de incubación a aproximadamente 4 °C durante aproximadamente 2 días con agitación constante. La incubación aproximadamente a 37 °C durante aproximadamente 7 días representa el almacenamiento aproximadamente a 4 °C durante un periodo de aproximadamente 1 año. La incubación aproximadamente a 4 °C durante aproximadamente 2 días con agitación constante representa la condición de estrés a la que la solución **coadyuvante glucolipídica** podría enfrentarse durante el transporte.

Para determinar si la solución **coadyuvante glucolipídica** es isotónica con el citoplasma, puede determinarse la osmolaridad. Pueden añadirse diferentes concentraciones de cloruro de sodio y determinarse la osmolaridad de la solución resultante utilizando un osmómetro. Aumentar las concentraciones de cloruro de sodio, además de aumentar la osmolaridad, tiende también a hacer a la solución más turbia. La turbidez se cree que está causada por la agregación de micelas en partículas mayores. Las soluciones que son difíciles o imposibles de filtrar utilizando un filtro de 0,2 µm generalmente no son aceptables para uso comercial porque a menudo se utiliza filtro terminal para asegurar la esterilidad de las soluciones coadyuvantes preparadas a escala comercial. Puede utilizarse un análisis de microscopía electrónica para determinar si hay agregación de micelas como resultado de demasiada sal.

Pueden utilizarse coadyuvantes no glucolípidos adicionales en la solución **coadyuvante glucolipídica** en combinación con los descritos anteriormente. En otra realización de la invención se añaden moléculas inmunoestimulantes adicionales a la solución **coadyuvante glucolipídica**. Las moléculas inmunoestimulantes se conocen bien en la técnica, e incluyen saponinas, Quil A, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) y Carbopol.

Quil A es un extracto purificado de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria*. Quil A induce tanto respuestas humorales como respuestas mediadas por células. A menudo, se utiliza Quil A con colesterol porque el colesterol elimina los efectos secundarios menos deseables cuando se añade en las proporciones apropiadas. El colesterol forma complejos insolubles con Quil A que forman estructuras de tipo hélice a medida que el colesterol se une a Quil A, exponiendo así las unidades de azúcar de la molécula que ayudan a estimular la respuesta inmune.

El bromuro de dimetildioctadecilamonio, DDA, es un tensioactivo catiónico con cadenas alquilo de 18 carbonos. Es una amina cuaternaria anfífila. La interacción directa de DDA y antígeno es necesaria para obtener una respuesta inmune óptima, porque el DDA actúa como vehículo del antígeno mediante la unión directa del antígeno a la interfase aceite/agua. Estimula tanto las respuestas inmunes humoral como las mediadas por células.

El Carbopol es otra molécula inmunoestimulante útil que puede utilizarse con esta invención. Es un homopolímero de ácido acrílico que está reticulado con éter polialquénico.

Parte III. Uso de la solución coadyuvante glucolipídica

La solución **coadyuvante glucolipídica**, en una forma de sal farmacéuticamente aceptable, puede mezclarse con un antígeno. Los antígenos convenientes incluyen: proteínas patógenas microbianas, glucoproteínas, lipoproteínas, péptidos, glicopéptidos, lipopéptidos, toxoides, carbohidratos y antígenos específicos de tumor. Los antígenos pueden derivar de una diversidad de fuentes. Los antígenos de patógenos microbianos incluyen bacterias, virus y organismos parásitos que causan enfermedades. Pueden emplearse mezclas de dos o más antígenos. El antígeno puede estar muerto, naturalmente atenuado, vivo modificado o ser un extracto de proteína, proteína producida recombinantemente, un péptido sintetizado químicamente o cualquier otra cosa que estimule una respuesta inmune. El antígeno peptídico puede existir en forma de un péptido libre o conjugado con el glucolípido o conjugado con otros epítopes de células B o células T conocidos.

La solución **coadyuvante glucolipídica** estable puede combinarse con coadyuvantes o componentes que se conocen por tener propiedades coadyuvantes adicionales. Los coadyuvantes adicionales que pueden combinarse con la solución **coadyuvante glucolipídica** incluyen polímeros, compuestos terpenoides de origen natural en su forma bruta o parcialmente purificada, amina cuaternaria anfífila, derivados de materiales de pared celular bacteriana y análogos sintéticos de pared celular bacteriana o componentes de ADN. La solución **coadyuvante glucolipídica** puede utilizarse con o combinarse con uno o más agentes tales como antibióticos o antígenos diferentes. Los

antígenos bacterianos o virales pueden estar muertos o vivos modificados. Los antígenos virales muertos se preparan haciendo crecer virus en cultivo de tejido e inactivando los virus mediante tratamientos químicos. Algunos virus pueden hacerse crecer en huevos con embrión. El antígeno viral muerto puede añadirse a una solución que contiene solución **coadyuvante glucolipídica** y la solución resultante puede utilizarse para vacunar a los animales para conseguir protección contra las infecciones virales.

En una realización de esta invención, la solución **coadyuvante glucolipídica** puede utilizarse como diluyente para antígenos virales vivos modificados. Los patógenos virales pueden atenuarse en su virulencia pasándolos a cultivo de tejido durante varias generaciones o mediante manipulaciones específicas del genoma viral. Dichas cepas atenuadas de virus pueden hacerse crecer hasta muy altos títulos en cultivo de tejido y pueden utilizarse como antígenos de vacuna. Las cepas virales atenuadas se designan como antígenos virales vivos modificados. Aunque estas cepas son menos virulentas, son aún altamente inmunogénicas cuando se utilizan como antígenos en la vacuna y ofrecen protección contra la infección por cepas virulentas. En caso de utilizar la solución **coadyuvante glucolipídica** como diluyente para antígenos virales vivos modificados, la solución **coadyuvante glucolipídica** debería ensayarse para asegurar que no tiene efecto viricida sobre el virus particular de interés.

La propiedad viricida de la solución **coadyuvante glucolipídica** sobre antígenos virales vivos modificados puede determinarse en un experimento *in vitro*. Se rehidratan antígenos virales liofilizados con la solución **coadyuvante glucolipídica** o con agua. Se siembran las soluciones virales resultantes sobre una monocapa de células permisivas. Se determina el título del antígeno viral mediante el recuento del número de placas formadas sobre la monocapa. La diferencia en los títulos virales obtenidos entre las muestras rehidratadas con agua y la solución **coadyuvante glucolipídica** puede utilizarse para determinar el efecto viricida, si lo hubiera, de la solución **coadyuvante glucolipídica** sobre cualquier virus vivo.

Los antígenos virales vivos modificados pueden liofilizarse y proporcionarse en forma de tortas liofilizadas en una preparación de vacuna comercial. En general, estas tortas liofilizadas de antígenos virales vivos modificados se rehidratan con una solución diluyente y se utilizan para vacunación parenteral. Los ejemplos de diluyentes incluyen una solución de agua que contiene solución salina tamponada con fosfato. Si la solución diluyente contiene una molécula inmunoestimulante conocida, puede mejorarse la eficacia de la vacunación con los antígenos virales vivos modificados. En una realización de la presente invención, se utiliza la solución **coadyuvante glucolipídica** como solución diluyente.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de una composición de glucosilamida insoluble con igual concentración de Bay 15-5831® y ácido acético.

Tabla 1. Una composición no adecuada para uso comercial.

Reactivo	Cantidad (200 ml)
Etanol (100 %)	176,1 ml
Tween 20	4,0 ml
Acido acético glacial	1,5 ml
Bay 15-5831®	18,4 g

Bay 15-5831®, registrado en la compañía Bayer, es el nombre comercial de *N*-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanoil-amida. Cuando se utiliza este compuesto preparando una solución coadyuvante utilizando las composiciones descritas en la tabla 1 anterior, en la que se utiliza el ácido acético en igual concentración molar que el glucolípido y el glucolípido está en su forma de base libre, el glucolípido es insoluble y flocula.

Ejemplo 2. Una solución **madre de glucosilamida** soluble utilizando los mismos componentes que en el **ejemplo 1**, pero con un aumento de la concentración de ácido acético respecto a la concentración de glucolípido, da como resultado una solución **madre de glucosilamida** soluble.

Tabla 2. Composición de una solución **madre de glucosilamida**.

Reactivo	Cantidad (50 ml)
Etanol (60 % v/v)	44,64 ml
Tween 20	1,12 ml
Acido acético glacial	0,68 ml
Bay 15-5831®	3,49 g

En este caso se utilizó etanol al 60 % (v/v) y la relación molar de ácido acético a glucolípido es de 2,0. Se reemplazó el etanol anhidro del ejemplo 1 por etanol al 60 % en agua. La solución **madre de glucosilamida** resultante era ópticamente transparente y no había sedimentación en el fondo del recipiente. Se añade esta solución **madre de**

glucosilamida a diversos tampones, preparando la solución **coadyuvante glucolipídica** del **ejemplo 3** siguiente.

Ejemplo 3. Preparación de soluciones **coadyuvantes glucolipídicas**. Se prepararon soluciones de tampón fosfato a diferentes pH. Se preparó una solución madre 2 M de fosfato de sodio monobásico disolviendo 138 g de sal $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de agua DI en un vaso de precipitados y completando un volumen final de 500 ml. De forma similar, se preparó una solución madre 2 M de fosfato de sodio dibásico disolviendo 142 g de NaH_2PO_4 en 300 ml de agua DI en un vaso de precipitados y completando un volumen final de 500 ml. Ambas soluciones madre se esterilizaron por filtración utilizando un filtro de 0,2 μm .

Tabla 3. Composiciones de solución madre 1 M de tampón fosfato de sodio a diferentes pH.

pH calculado	Solución de Na_2HPO_4 (ml)	Solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ml)	Volumen total de solución madre 2 M (ml)	Agua estéril DI añadida (ml)	Volumen total de solución madre 1 M (ml)
6,0	87,7	12,3	100	100	200
6,5	68,5	31,5	100	100	200
7,0	39,0	61,0	100	100	200
7,5	16,0	84,0	100	100	200
7,8	8,5	91,5	100	100	200

Se prepararon diferentes volúmenes de soluciones madre 2 M de fosfato de sodio monobásico y fosfato de sodio dibásico como se muestra en la Tabla 3, después se obtuvieron soluciones madre 1 M de tampón fosfato de sodio a diferentes niveles de pH. Se diluyeron después las soluciones tampón fosfato 1 M 50 x consiguiendo tampones fosfato 20 mM.

Se prepararon soluciones **coadyuvantes glucolipídicas** utilizando estos tampones madre y las soluciones madre de **glucosilamida** del **ejemplo 2**.

Se añadieron 5 ml de solución madre de glucosilamida preparada como en el **ejemplo 2** a 96 ml de cada una de estas soluciones de fosfato 20 mM. La **solución coadyuvante glucolipídica** resultante contenía ácido acético 12,5 mM y glucolípido 6,33 mM. El glucolípido está ahora en forma acetato.

Ejemplo 4. Significación del pH final de la solución coadyuvante glucolipídica.

En otro conjunto de experimentos, se ensayó la significación del pH final de diversas soluciones evaluando cómo afecta el pH a la floculación. Se preparó un tampón fosfato 20 mM a un pH inicial de 7,8. La **Tabla 4** muestra el coadyuvante glucolípido preparado utilizando la glucosilamida preparada como en el **ejemplo 1**, en el que glucolípido y ácido acético se utilizaron a iguales concentraciones molares. Nota: el pH final no cayó mucho (**Tabla 4**), indicando la efectividad del tampón. Las concentraciones de NaCl variaron. Se compararon las lecturas de densidad óptica (D.O.) a 600 nm en la **Tabla 4** con lecturas similares en la **Tabla 5**, en la que las soluciones **coadyuvantes glucolipídicas** se prepararon con soluciones **madre de glucosilamida** que contenían dos veces la relación molar de ácido acético a glucolípido, preparadas como en el **ejemplo 2**. Utilizar la concentración o cantidad de ácido acético mayor da como resultado una floculación mínima. La floculación era mayor en la muestra no filtrada que en las muestras filtradas. Además, al aumentar la concentración de NaCl, hay un aumento de la floculación e incluso precipitación. Se preparó la solución **coadyuvante glucolipídica** descrita en la **Tabla 5** con un tampón fosfato que tiene un pH inicial de 8,0; el pH final de la solución coadyuvante glucolipídica era entre 6,8 y 7,0. Una reducción adicional del pH final de la solución coadyuvante glucolipídica puede dar como resultado una solución **coadyuvante glucolipídica** con menos turbidez y sin floculación.

Tabla 4. Preparación de composiciones de glucosilamida que contienen una cantidad equimolar de ácido acético y glucolípidos (**véase el ejemplo 1**).

Concentración de NaCl (mM)	Volumen de tampón (ml)	Volumen de composiciones madre glucolipídicas (ml)	pH final	D.O. a 600 nm
0	480	25	7,42	1,693
15	480	25	7,39	1,873
100	480	25	7,33	2,742

Tabla 5. Preparación de solución **coadyuvante glucolipídica** utilizando solución **madre de glucosilamida** que contiene dos veces la cantidad molar de ácido acético que de glucolípido (véase el **ejemplo 2**).

Concentración de NaCl (mM)	Volumen de tampón (ml)	Volumen de solución madre de glucosilamida (ml)	pH final	D.O. a 600 nm
0	480	25	6,93	0,146
15	480	25	6,88	0,487
100	480	25	6,84	2,826

Una densidad óptica (D.O.) menor de 0,1 representa una solución translúcida. Una densidad óptica de entre 0,1 y 0,5 es homogénea con ligera turbidez, una densidad óptica de 0,5 a 1,0 tiene cierta turbidez, una densidad óptica de 1,0 a 1,5 se considera turbia. Una densidad óptica superior a 1,5 es turbia y no es probable que sea filtrable utilizando un filtro de 0,2 μm . La última generalmente no se consideraría comercialmente adecuada.

Ejemplo 5. Titulación de coadyuvante glucolipídico con ácido acético mostrando que la floculación puede revertirse. Determinando si añadir cantidades crecientes de ácido acético al coadyuvante glucolipídico que muestra floculación revertiría la floculación, se preparó un coadyuvante glucolipídico como se describe en el ejemplo 1. Este coadyuvante glucolipídico mostró floculación incluso en ausencia de NaCl. Se añadió una concentración creciente de ácido acético a esta mezcla coadyuvante glucolipídica floculada. Se diluyó el ácido acético 16,6 veces con agua, consiguiendo una concentración de la solución de trabajo 1 M. Después, se añadieron 15 μl de esta solución 1 M a 15 ml de mezcla coadyuvante glucolipídica aumentando la concentración de ácido acético en 1 mM. Al aumentar la concentración de ácido acético, se reducía el pH del coadyuvante glucolipídico y se disolvían los flóculos. Sin embargo, el coadyuvante glucolipídico permanecía algo turbio. Esta observación confirma que aumentar la concentración de ácido acético convierte la base libre de Bay 15-5381 en una forma acetato, que es más soluble en solución acuosa.

Tabla 7. Titulación de coadyuvante glucolipídico con ácido acético.

Volumen de coadyuvante glucolipídico	Volumen de ácido acético 1 N añadido	pH de la solución
15 ml	0	7,25
15 ml	15 μl (1 mM)	7,21
15 ml	30 μl (2 mM)	7,10
15 ml	60 μl (4 mM)	6,97
15 ml	150 μl (10 mM)	6,44
15 ml	750 μl (50 mM)	4,57

Ejemplo 6. Preparación de una segunda solución **coadyuvante glucolipídica** estable con y sin NaCl. Después de establecer la importancia de un aumento de la cantidad de ácido acético en el mantenimiento de la estabilidad de las soluciones glucolipídicas, se decidió utilizar la composición mostrada en la **Tabla 8** preparando en primer lugar una solución **madre de glucosilamida** y utilizar después esta preparando otra solución **coadyuvante glucolipídica** con y sin NaCl. Esta solución **madre de glucosilamida** es similar a la solución del **ejemplo 2**, con 4 veces el volumen total y cantidades relativamente mayores de ácido acético y Tween 20.

Tabla 8. Composición de una solución **madre de glucosilamida**.

Reactivo	Cantidad (200 ml)
Etanol al 60 % (v/v)	179 ml
Tween 20	4,0 ml
Acido acético	3,0 ml
Bay 15-5381	13,96 g

Se prepararon tres soluciones **coadyuvantes glucolipídicas** diferentes con concentraciones variables de NaCl utilizando el tampón fosfato del **ejemplo 3** y la solución **madre de glucosilamida** preparada como en la **Tabla 8**.

Como la formulación del **ejemplo 4**, **Tabla 5**, se preparó una solución **coadyuvante glucolipídica** que contenía NaCl 0 mM, 15 mM y 100 mM. Las soluciones de NaCl 0 mM y 15 mM pudieron filtrarse a través de un filtro de 0,2 μm . La solución coadyuvante glucolipídica que contenía NaCl 100 mM no pudo filtrarse a través de un filtro de 0,2 μm .

Tabla 9. Preparación de soluciones **coadyuvantes glucolipídicas** estables con y sin NaCl.

Concentración de cloruro de sodio (mM)	Volumen de tampón (ml)	Volumen de solución madre de glucosilamida (ml)	pH final	D.O. a 600 nm
0	465	35	6,39	0,039
15	465	35	6,37	0,073
100	465	35	6,29	0,439

Se dispusieron 20 ml de cada una de las soluciones **coadyuvantes glucolipídicas** en viales de vidrio de 30 ml y se incubaron a temperatura ambiente y a 4 °C. Se hicieron observaciones visuales a intervalos regulares. Inicialmente, la solución **coadyuvante glucolipídica** con NaCl 0 mM era ópticamente transparente. La solución **coadyuvante glucolipídica** que contenía NaCl 15 mM era ligeramente turbia y tenía una D.O. de 0,073 a 600 nm. La solución **coadyuvante glucolipídica** que contenía NaCl 100 mM era turbia y tenía una D.O. de 0,439 a 600 nm. **Tabla 9.** Ninguna de estas soluciones **coadyuvantes glucolipídicas** mostró ningún signo de floculación tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. Se observaron estas soluciones **coadyuvantes glucolipídicas** durante un periodo de un año sin cambios de apariencia.

Ejemplo 7. Titulación de una solución coadyuvante glucolipídica estable con NaOH

Se obtuvo inicialmente una solución **coadyuvante glucolipídica** ópticamente transparente y estable sin NaOH. Estableciendo que la eliminación o uso de una cantidad mínima de NaOH era esencial evitando la floculación, es necesario mostrar que una adición gradual de NaOH induciría la floculación en una mezcla glucolipídica que de lo contrario sería estable. Se añadieron volúmenes apropiados de NaOH 1 N a 15 ml de solución **coadyuvante glucolipídica** sin NaCl añadido, como se prepara en la Tabla 10 a continuación. Se aumentó gradualmente el NaOH desde 1 mM a 12 mM (**Tabla 10**). Se preparó la solución **coadyuvante glucolipídica** utilizada en este experimento utilizando la solución **madre de glucosilamida** descrita en el **ejemplo 6**. Al aumentar la concentración de NaOH en la solución **coadyuvante glucolipídica**, aumentó gradualmente el pH de la formulación junto con la aparición de floculación.

Tabla 10. Titulación de una solución coadyuvante glucolipídica estable con NaOH.

Volumen de coadyuvante glucolipídico	Volumen de NaOH 1 N añadido (mM)	pH de la solución
15 ml	0	6,21
15 ml	15 µl (1 mM)	6,38
15 ml	30 µl (2 mM)	6,48
15 ml	60 µl (4 mM)	6,68
15 ml	150 µl (10 mM)	7,11
15 ml	750 µl (50 mM)	12,17

Ejemplo 8. Cuantificación del componente glucolipídico utilizando HPLC

Se utilizó la siguiente metodología en el análisis por HPLC de Bay 15-5831®. Se utilizaron los parámetros de HPLC descritos en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Sumario de los parámetros utilizados en el procedimiento de HPLC cuantificando Bay 15-5381.

Parámetro	Detalles
Columna	Hamilton PRP-1, 7 µm, 250 x 4,6 mm
Flujo	1,5 ml/min
Volumen de inyección	10 µl
Longitud de onda del detector	210 nm
Fase móvil A	Acido perclórico al 0,4 %, v:v
Fase móvil B	Acetonitrilo
Gradiente	0 min 40 % de A/60 % de B 15 min 30 % de A/70 % de B 20 min 30 % de A/70 % de B 35 min 10 % de A/90 % de B 50 min 10 % de A/90 % de B 51 min 40 % de A
Tiempo de funcionamiento	65 min
Tiempo de retención de Bay 15-5381	Aproximadamente 25 minutos

Tabla 12. Patrones de Bay 15-5831®

Patrón	Concentración
1	0,103 mM
2	0,206 mM
3	0,412 mM
4	0,618 mM
5	0,824 mM
6	1,03 mM

5 Se prepararon patrones en el intervalo de 0,10 a 1,03 mM y se inyectaron en una HPLC. Se muestra en la **Tabla 12** un sumario de los patrones. Se calentaron las muestras a temperatura ambiente y se invirtieron 5 veces antes del uso. Se añadió 1 ml de muestra a 6 ml de metanol en un matraz volumétrico de 10 ml. Se sometieron después a sonicación las muestras durante 10 minutos y después se diluyeron al volumen y se mezclaron. Se realizó una regresión lineal de los patrones con áreas de pico representadas frente a concentración. Se calcularon después las muestras frente a la curva.

10 **Ejemplo 9.** Producción a escala de treinta (30) litros. Se preparó un lote de 30 l de solución coadyuvante glucolípídica con una composición como se describe en el **ejemplo 6**. Este lote contenía NaCl 15 mM.

15 Utilizando esta preparación de 30 l, se prepararon cinco subsoluciones diferentes con concentración creciente de NaOH. La concentración de NaOH aumentó de 0 mM a 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM y 12 mM. Se tomaron alícuotas de la muestra para cada concentración de NaOH para medida del pH y observación visual. Al aumentar las concentraciones de NaOH, aumentó el pH del coadyuvante glucolípídico, junto con una floculación aumentada. La floculación empezó a aparecer a una concentración de NaOH 2 mM a temperatura ambiente y a 4 °C la floculación empezó a aparecer a NaOH 4 mM.

Tabla 13. Características del coadyuvante glucolipídico de lote de 30 l con concentración creciente de NaOH

N.º de muestra	Descripción	Concentración medida (mM)	D.O. a 600 nm	pH
Muestra 1 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 0 mM	6,21	0,218	6,42
Muestra 2 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 1 mM	6,3	0,137	6,52
Muestra 3 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 2 mM	6,24	0,137	6,59
Muestra 4 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 4 mM	6,17	0,15	6,80
Muestra 5 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 8 mM	6,26	0,129	7,06
Muestra 6 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 12 mM	6,15	0,062	7,54

Se cuantificó la cantidad de Bay 15-5381 en todas las seis muestras mostradas en la Tabla 13 utilizando el procedimiento de HPLC descrito en el **ejemplo 8**. Las muestras con pH variable mostraron la misma concentración de Bay 15-5381, sugiriendo que el componente coadyuvante no se degrada durante el aumento de pH con la adición de NaOH y floculación acompañante.

Ejemplo 10. Evaluaciones de estabilidad utilizando ensayos de estrés acelerado. Este ejemplo describe los procedimientos y resultados de ensayo de estrés acelerado sobre solución **coadyuvante glucolipídica**. Se prepararon tres lotes de soluciones **coadyuvantes glucolipídicas** como se describe en el ejemplo 6 a escala de 500 l. Los tres lotes tenían NaCl 15 mM y no contenían NaOH. Se utilizaron las soluciones **coadyuvantes glucolipídicas** de estos tres lotes de 500 l estudiando la estabilidad del glucolípido utilizando un ensayo de estabilidad acelerada.

Para ensayo de estrés acelerado, se sometió la solución **coadyuvante glucolipídica** a agitación durante 7 días a 37 °C, seguido de agitación a 4 °C durante 2 días. Los 7 días de agitación a 37 °C representan una maduración a 4 °C durante un año. La agitación a 4 °C durante 2 días representa el estrés durante el transporte.

Se mantuvo estático un conjunto de solución **coadyuvante glucolipídica** a 37 °C durante 7 días, después se agitó a 100 rpm a 4 °C durante 2 días adicionales. En cuatro puntos temporales, concretamente, T= 0, 3, 7 y 9 días, se registraron la observación y foto. En dos puntos temporales, concretamente, T= 0 y 9 días, se realizaron después análisis del índice de refracción y del tamaño de partícula.

Se agitó el segundo conjunto de solución **coadyuvante glucolipídica** a 100 rpm a 37 °C durante 7 días, después se agitó a 100 rpm a 4 °C durante 2 días adicionales. En cuatro puntos temporales, concretamente T= 0, 3, 7 y 9 días, se registraron la observación y foto. En dos puntos temporales, concretamente, T= 0 y 9 días, se realizaron después análisis del índice de refracción y del tamaño de partícula.

El tercer conjunto de solución **coadyuvante glucolipídica** estuvo estático a 4 °C durante 9 días como control. En cuatro puntos temporales, concretamente, T= 0, 3, 7 y 9 días, se registraron la observación y foto. En dos puntos temporales, concretamente, T= 0 y 9 días, se realizaron después análisis del índice de refracción y del tamaño de partícula.

No hubo cambios en el tamaño de partícula como resultado del ensayo de estrés. Todas las muestras mantuvieron los tamaños de partícula submicrométricos observados en las muestras inmediatamente después que se prepararon. Además, una medida de HPLC del componente Bay 15-5831® en las muestras mantenidas a 4 °C o sometidas a estrés a 37 °C durante siete días no mostró ningún cambio en la cantidad de Bay 15-5831®.

Tabla 15. Cuantificación de Bay 15-5831® después de ensayo de estrés

Número de lote de la solución coadyuvante glucolipídica y tratamiento	Concentración medida (mM)
Lote 1- 4 °C	6,23
Lote 1- Agitación a 37 °C	6,29
Lote 2- 4 °C	6,32
Lote 2- Agitación a 37 °C	6,30
Lote 3- 4 °C	6,28
Lote 3- Agitación a 37 °C	6,29

En la Tabla 15, se mantuvieron las muestras control a 4 °C durante siete días, mientras se agitaban las muestras de ensayo a 37 °C durante siete días. Las muestras agitadas a 37 °C durante siete días tienen concentraciones similares a las almacenadas a 4 °C.

Ejemplo 11. Ensayo viricida de la solución coadyuvante glucolipídica

Se realizó el ensayo viricida en la solución **coadyuvante glucolipídica** preparada a escala de 30L como se describe anteriormente en el **ejemplo 9**. Esta solución **coadyuvante glucolipídica** contenía NaCl 15 mM y no NaOH.

5 Se ensayó la idoneidad del **coadyuvante glucolipídico** para uso como diluyente con virus vivos modificados. Se preparan antígenos virales vivos modificados en forma de bloques liofilizados. Tras rehidratación de estos bloques con solución **coadyuvante glucolipídica** adecuada, se confirmó que la solución coadyuvante glucolipídica utilizada no mata los virus vivos modificados. Se ensayó la solución **coadyuvante glucolipídica** frente a tres antígenos virales bovinos: virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus paragripal tipo 3 (PI3) y virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR).

10 Se rehidrataron los bloques virales utilizando la solución **coadyuvante glucolipídica**. Después de incubación a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora, se sembraron las muestras sobre una monocapa de una línea celular permisiva con una dilución en serie. Contando el número de bloques virales que aparecen sobre la monocapa, se obtuvo el valor del 50 % de la dosis infecciosa en cultivo de tejido por ml (TCID₅₀/ml) para cada antígeno viral rehidratado con agua estéril o solución **coadyuvante glucolipídica**. En este ensayo, se trató como viricida una reducción del título de 0,7 después de rehidratar con la solución **coadyuvante glucolipídica** de ensayo.

15 Se presentan los resultados en la **Tabla 16**. La solución **coadyuvante glucolipídica** no mostró ningún efecto viricida sobre estos tres virus bovinos.

Tabla 16. Ensayo viricida para la solución **coadyuvante glucolipídica**

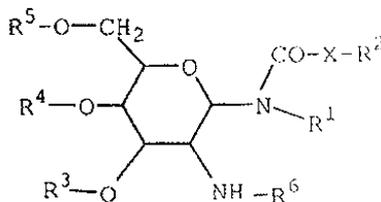
Virus	Título original	Título final con coadyuvante glucolipídico	Título final con agua estéril	Pérdida de título
tsIBR	7,3 ± 0,5	7,08	7,49	0,42
051404				
tsPI3 052604	7,6 ± 0,5	7,74	7,49	-0,25
BRSV 081103	6,4 ± 0,5	6,57	6,82	0,25

20 Este ejemplo muestra que la solución **coadyuvante glucolipídica** puede utilizarse en una formulación comercial de una vacuna para salud animal. Rispoval® contiene tres enfermedades virales bovinas diferentes utilizando 3 antígenos virales vivos modificados. Estos antígenos virales bovinos son herpesvirus bovino vivo modificado, virus sincitial respiratorio bovino vivo modificado y virus de parainfluenza 3 vivo modificado. Estos antígenos virales se producen en forma de tortas liofilizadas y la solución **coadyuvante glucolipídica** producida mediante esta invención puede utilizarse como solución diluyente para estos antígenos. El glucolípido utilizado era acetato de *N*-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanamida.

25 Los ejemplos se presentan para ilustrar la invención. No debe considerarse que limitan el ámbito de la invención. Resultarán evidentes para los expertos en la técnica muchos cambios, variaciones, modificaciones y otros usos y aplicaciones de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 a) un glucolípidio de fórmula I; en el que la fórmula I es



5 en la que

R¹ y R² son independientemente hidrógeno o un radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos de carbono;
 X es -CH₂-, -O- o -NH-;

R³, R⁴ y R⁵ son independientemente hidrógeno, -SO₄²⁻, -PO₄²⁻, -CO-alquilo C₁₋₁₀;

10 R⁶ es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo, L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxipropilo, L-iso-leucilo, L-leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitino, L-fenilalanilo, L-prolilo, L-serilo, L-treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o sus isómeros D; en una forma de sal, en la que la forma de sal deriva de un ácido débil,

b) un alcohol, en el que el alcohol es HO-alquilo C₁₋₃;

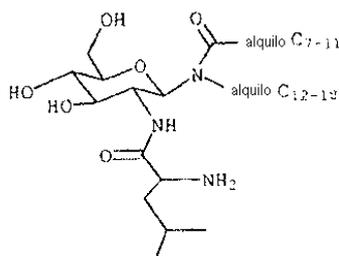
c) un ácido débil, en el que el ácido débil

15 1) está en una cantidad desde 1,25 hasta 5,0 veces la cantidad del glucolípidio, en equivalentes molares al glucolípidio y

2) es cualquier ácido que tenga un valor de pKa (el -log de Ka) entre 1,0 y 9,5 utilizando las tablas o valores estándar;

20 d) un tensioactivo no iónico, en el que el tensioactivo no iónico es un agente que reduce la tensión superficial del material que se disuelve en él y tiene un componente que es hidrófobo y otro componente que es hidrófilo.

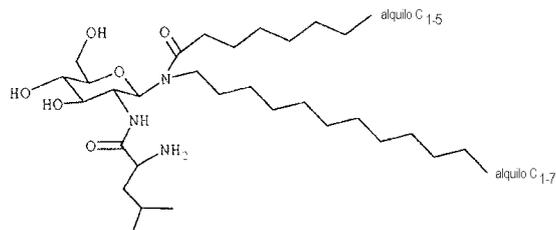
2. Una composición de la reivindicación 1 en la que el glucolípidio es un compuesto de fórmula II(a)



Fórmula II(a)

25 y el ácido débil es seleccionado de uno o cualquier combinación de los siguientes ácidos débiles: ácido acético, H(C₂H₃O₂) (pKa 4,76); ácido ascórbico (1), H₂(C₆H₆O₆) (pKa 4,10); ácido acetilsalicílico, H₃(C₉O₄) (pKa 3,5); ácido butanoico H(C₄H₇O₂) (pKa 4,83); ácido carbónico, forma 1, H₂CO₃, (pKa 4,83); ácido crómico, forma 2, HCrO₄⁻ (pKa 6,49); ácido cítrico, forma 1, H₃(C₆H₅O₇)⁻, (pKa 3,14); ácido cítrico, forma 2, (H₂C₆H₅O₇)²⁻, (pKa 4,77); ácido cítrico, forma 3, (HC₆H₅O₇)³⁻, (pKa 6,39); ácido fórmico, H(CHO₂)⁻, (pKa 3,75); ácido fumárico, H₄(C₄O₄) (pKa 3,03); ácido heptanoico, H(C₇H₁₃O₂)⁻, (pKa 4,89); ácido hexanoico, H(C₆H₁₁O₂)⁻, (pKa 4,84); ácido fluorhídrico, HF, (pKa 3,20); isocitrato, H₈(C₆O₇) (pKa 3,29); ácido láctico, H(C₃H₅O₃)⁻, (pKa 3,08); ácido maleico, H₄(C₄O₄) (pKa 1,83); ácido nicotínico, H₅(C₆NO₂) (pKa 3,39); ácido oxálico, forma 1, H₂(C₂O₄)²⁻, (pKa 1,23); ácido oxálico, forma 2, (HC₂O₄)⁻, (pKa 4,19); ácido pentanoico, H(C₅H₉O₂)⁻, (pKa 4,84); ácido fosfórico, forma 1, H₃PO₄, (pKa 2,16); ácido propanoico, H(C₃H₅O₂)⁻, (pKa 4,86); ácido pirúvico, H₄(C₃O₃) (pKa 2,39); y ácido succínico H₆(C₄O₄) (pKa 4,19).

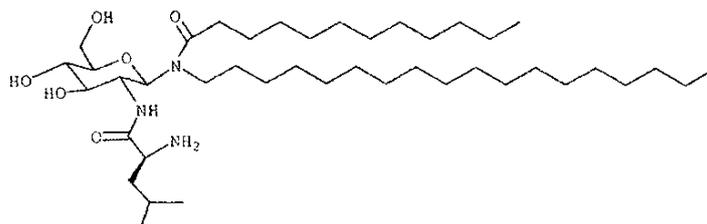
3. Una composición de la reivindicación 2, en la que el glucolípidio es un compuesto de fórmula II(b)



Fórmula II(b)

5 y el ácido débil es seleccionado de uno o de cualquier combinación de los siguientes ácidos débiles: ácido acético; ácido acetilsalicílico; ácido cítrico; ácido fórmico; ácido fumárico; ácido fluorhídrico; isocitrato; ácido maleico; ácido nicotínico; ácido fosfórico; ácido pirúvico; y ácido succínico.

4. Una composición de la reivindicación 3, en la que el glucolípidos es acetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanamida, que tiene una estructura de fórmula III:



Fórmula III

10 y el ácido débil es ácido acético.

5. Una composición de la reivindicación 2, en la que el ácido débil es seleccionado del grupo que consiste en: ácido acético; ácido acetilsalicílico; ácido cítrico, forma 1; ácido cítrico, forma 2; ácido cítrico, forma 3; ácido fórmico; ácido fumárico; ácido fluorhídrico; isocitrato; ácido maleico; ácido nicotínico; ácido fosfórico, forma 1; ácido pirúvico y ácido succínico.

15 6. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicho ácido débil está en una cantidad que es las siguientes veces mayor que el equivalente molar del glucolípidos;

- a) 1,25 veces mayor,
- b) 2,0 veces mayor,
- c) 2,5 veces mayor,
- 20 d) 2,7 veces mayor,
- e) 3,0 veces mayor,
- f) 5,0 veces mayor,

que la cantidad equivalente molar del glucolípidos.

7. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el alcohol es alcohol etílico.

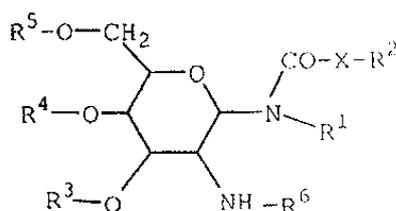
25 8. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicho tensioactivo no iónico es seleccionado de uno cualquiera o de una combinación del grupo que consiste en: monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, triestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán, trioleato de sorbitán, monolaurato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán y otros sorbitanos y polioxietilensorbitanos utilizados habitualmente en vacunas.

30 9. Una composición de la reivindicación 1, en la que el ácido débil es ácido acético y adicionalmente en la que el ácido acético está en una cantidad que es 2,0 veces mayor que la cantidad equivalente molar del glucolípidos.

10. Una composición de la reivindicación 1, en la que el ácido débil tiene un valor de pKa (el -log de Ka) entre 1,23 y 6,49 usando tablas o valores estándar.

35 11. Una composición que comprende:

- a) un glucolípidos de fórmula I; en el que la fórmula I es



en la que

R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno, o un radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos de carbono;

X es $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$ o $-\text{NH}-$;

5 R^3 , R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno, $-\text{SO}_4^{2-}$, $-\text{PO}_4^{2-}$, $-\text{CO}$ -alquilo C_{1-10} ;

R^6 es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo, L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxipropilo, L-iso-leucilo, L-leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitino, L-fenilalanilo, L-prolilo, L-serilo, L-treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o sus isómeros D; en una forma de sal, en la que la forma de sal deriva de un ácido débil;

10 b) un alcohol, en el que el alcohol es HO-alquilo C_{1-3} ;

c) un ácido débil, en el que el ácido débil

1) está en una cantidad desde 1,25 hasta 5,0 veces la cantidad del glucolípido, en equivalentes molares al glucolípido y

15 2) es cualquier ácido que tenga un valor de pKa (el $-\log$ de K_a) entre 1,0 y 9,5 utilizando las tablas o valores estándar;

d) un tensioactivo no iónico, en el que el tensioactivo no iónico es un agente que reduce la tensión superficial del material que se disuelve en él y tiene un componente que es hidrófobo y otro componente que es hidrófilo; y

20 e) un tampón acuoso, en la que el tampón adecuado es adecuado para uso en vacuna y puede mantener el pH de los demás ingredientes dentro de un intervalo de pH de 6 a 8, con la condición de que no se utilice NaCl más de 50 mM.

12. Una composición de la reivindicación 11, en la que el pH de la solución es ajustado a un pH relativamente constante en una solución acuosa de entre 6 y 7 y el tampón es seleccionado del grupo que consiste en tampones fosfato que tienen cualquiera o ambas de las sales monobásicas y dibásicas de fosfato de sodio y/o fosfato de potasio en la misma o en diferentes proporciones.

25 13. Una composición de la reivindicación 11, en la que dicho tampón es seleccionado del grupo de:

a) ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (también conocido como MES);

b) ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (también conocido como MOPS);

c) ácido N-[tris(hidroximetil)]-2-aminoetanosulfónico (también conocido como TES);

d) ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (también conocido como HEPES); y

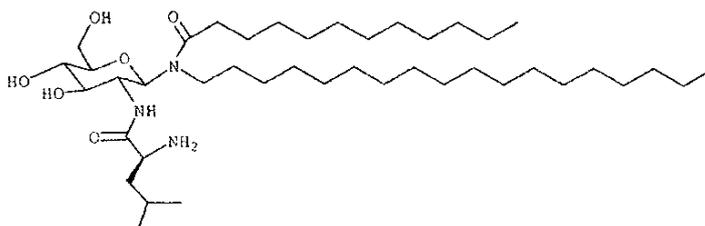
30 e) [tris(hidroximetil)metil]glicina (también conocida como TRIS);

o cualquier combinación de los mismos.

14. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende adicionalmente un antígeno seleccionado del grupo, o cualquier combinación de los mismos, que consiste en herpesvirus bovino vivo modificado, virus sincitial respiratorio bovino vivo modificado y virus paragripal tipo 3 vivo modificado.

35 15. Una composición que comprende:

a) acetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanamida, que tiene una estructura de fórmula III:



Fórmula III

- b) etanol;
- 5 c) ácido acético, en la que el ácido acético está en una cantidad de 1,25 a 5,0 veces la cantidad del glucolípid, en equivalentes molares al glucolípid;
- d) tensioactivo no iónico seleccionado de: monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, triestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán, trioleato de sorbitán, monolaurato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán;
- 10 e) un tampón acuoso en el que el pH de la solución es ajustado a un pH relativamente constante en una solución tamponada acuosa de entre 6 y 7, y el tampón se selecciona del grupo de:
- a) ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (también conocido como MES);
- b) ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (también conocido como MOPS);
- c) ácido N-[tris(hidroximetil)]-2-aminoetanosulfónico (también conocido como TES);
- 15 d) ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (también conocido como HEPES); y
- e) [tris(hidroximetil)metil]glicina (también TRIS);
- o cualquier combinación de los mismos;
- con la condición de que no se utilice NaCl más de 15 mM y:
- 20 f) un antígeno que consiste esencialmente en herpesvirus bovino vivo modificado, virus sincitial respiratorio bovino vivo modificado y virus paragripal tipo 3 vivo modificado.
16. Un procedimiento de preparación de una composición, que comprende mezclar conjuntamente lo siguiente:
- a) un glucolípid de fórmula I;
- b) un alcohol, en el que el alcohol es HO-alquilo C₁₋₃;
- c) un ácido débil orgánico, en el que el ácido débil
- 25 1) está en una cantidad desde 1,25 hasta 5,0 veces la cantidad del glucolípid, en equivalentes molares al glucolípid; y
- 2) es cualquier ácido que tenga un valor de pKa (el -log de Ka) entre 1 y 9,5 utilizando las tablas o valores estándar; y
- d) un tensioactivo no iónico.
- 30 17. Un procedimiento de preparación de una composición, que comprende mezclar conjuntamente lo siguiente:
- a) un glucolípid de fórmula I;
- b) un alcohol, en el que el alcohol es HO-alquilo C₁₋₃;
- c) un ácido débil orgánico, en el que el ácido débil
- 35 1) está en una cantidad desde 1,25 hasta 5,0 veces la cantidad del glucolípid, en equivalentes molares al glucolípid; y
- 2) es cualquier ácido que tenga un valor de pKa (el -log de Ka) entre 0,7 y 9,5 utilizando las tablas o valores estándar;
- d) un tensioactivo no iónico; y añadir después
- e) un tampón adecuado.